

**Expressionsstudien zur Funktion des Tumorsuppressorgens PTEN
beim Prostatakarzinom**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anke Brandt

aus Bremen

Düsseldorf

2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Frau Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora

Korreferent: Herr Prof. Dr. William Martin

Tage der mündlichen Prüfung: 23.06., 24.06. und 25.06.2003

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG.....	6
1) ZELLWACHSTUM.....	6
2) DIE ENTSTEHUNG VON TUMOREN.....	6
3) DIE PROSTATA.....	7
4) DAS PROSTATAKARZINOM.....	9
5) GRADING UND ENTWICKLUNGSSTADIEN VON PROSTATAKREBS.....	11
5.1) <i>Grading nach Gleason</i>	11
5.2) <i>Einteilung des Prostatakarzinoms in Stadien</i>	12
6) CHROMOSOMALE VERÄNDERUNGEN BEIM PROSTATAKARZINOM.....	13
7) PTEN.....	14
8) LNCAP.....	18
9) ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	19
II. MATERIAL.....	20
1) CHEMIKALIEN UND SONSTIGES MATERIAL.....	20
1.1) <i>Chemikalien</i>	20
1.2) <i>Biochemikalien</i>	21
1.3) <i>DNA-Marker</i>	21
1.4) <i>Antikörper</i>	21
1.5) <i>Enzyme</i>	22
1.6) <i>Vektoren</i>	22
1.7) <i>Radioisotope</i>	22
1.8) <i>Arrays</i>	22
1.9) <i>Kits</i>	22
2) VERBRAUCHSMATERIAL.....	23
3) GERÄTE.....	23
3.1) <i>Zentrifugen</i>	23
3.2) <i>PCR Maschinen</i>	23
3.3) <i>weitere Geräte</i>	24
4) MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN.....	24
4.1) <i>Medien und Puffer für Zellkulturen</i>	24
4.2) <i>Puffer und Lösungen</i>	24

5) GEFRORENE PROSTATATUMOREN.....	27
6) ZELLEN	27
7) PRIMER	27
8) SOFTWARE:.....	29
III. METHODEN	30
1) ARBEITEN MIT BAKTERIEN	30
1.1) Vermehrung der Vektoren durch Transformation/Minipräparation	30
1.2) Restriktionsanalyse zur Kontrolle der Plasmide.....	30
2) ZELLKULTUR	31
2.1) Kultivierung der Prostatakrebszelllinie LNCaP.....	31
2.2) Transfektion von Zellen.....	32
2.3) 5-Azacytidinbehandlung von Zellen.....	33
2.4) Induktion der transfizierten Zellen.....	34
2.5) β -Gal- und GFP-Assay	34
3) IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	35
3.1) Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)	35
3.2) Immunfluoreszenz	36
3.3) Immunhistochemie auf Gefrierschnitten für die Mikrodissektion.....	36
3.4) Immunocytochemie	37
3.5) Western Blot.....	38
4) LASER CAPTURE MIKRODISSEKTION	39
5) ISOLIERUNG UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	40
5.1) RNA-Isolierung aus mikrodissektierten Tumorzellen	40
5.2) Isolierung von RNA aus Tumorzelllinien.....	42
5.3) DNase-Behandlung der RNA aus Tumorzelllinien	42
5.4) Ethanolpräzipitation von RNA.....	43
5.5) Isolierung von DNA aus Tumoren und LNCaP-Zellen.....	43
5.6) Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	44
6) METHODEN ZUM AMPLIFIZIEREN VON RNA UND DNA.....	44
6.1) RT-PCR.....	44
6.2) RT-PCR mit dem Access RT-PCR System von Promega	45
6.3) SMART TM PCR cDNA Synthese	46
6.4) Long Distance PCR.....	47
6.5) Quantitative Realtime RT-PCR.....	48

6.6) <i>aRNA-Synthese mit dem Message Amp aRNA Kit (Ambion)</i>	51
7) KONTROLLE VON cDNA UND DNA AUF AGAROSEGELEN	52
8) SSCP-ANALYSE VON DNA AUS LNCAP-ZELLEN	53
9) SUBTRAKTIVE HYBRIDISIERUNG VON cDNA AUS TUMOREN	53
9.1) <i>Reinigung der LD-PCR für cDNA-Subtraktion</i>	53
9.2) <i>Subtraktive Hybridisierung</i>	54
10) EXPRESSIONSANALYSEN AUF cDNA-ARRAYS	58
10.1) <i>Reinigung der LD-PCR für die direkte Herstellung einer radioaktiven Sonde</i>	58
10.2) <i>Herstellung und Reinigung der radioaktiven Sonde aus cDNA</i>	59
10.3) <i>Herstellung radioaktiver Sonden aus RNA</i>	59
10.4) <i>Hybridisierung und Auswertung der Arrays</i>	60
IV. ERGEBNISSE LNCAP-ZELLEN	62
1) EXPERIMENTELLES VORGEHEN	62
2) VORUNTERSUCHUNG VON LNCAP	62
2.1) <i>Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)</i>	62
2.2) <i>SSCP-Analyse (single strand conformation polymorphism)</i>	63
3) TRANSFEKTION VON LNCAP-ZELLEN MIT DEM WILDTYP-PTEN-GEN	64
4) WESTERN BLOT	69
5) QUANTITATIVE REALTIME RT-PCR	70
6) ERGEBNISSE DER EXPRESSIONSANALYSE	72
7) VERGLEICH VON HUMAN CANCER ARRAYS UND HUMAN 3.6 ARRAYS	77
V. ERGEBNISSE PROSTATATUMOREN	79
1) EXPERIMENTELLES VORGEHEN	79
2) AUSWAHL DER TUMOREN UND DER ZU UNTERSUCHENDEN REGIONEN	79
3) ETABLIERUNG DER MIKRODISSEKTION	80
4) ETABLIERUNG DER RNA-ISOLIERUNG	81
5) cDNA-SUBTRAKTION	82
6) VERGLEICH DER ARRAY-ERGEBNISSE MIT RADIOAKTIVEN SONDEN AUS RNA UND cDNA (SMART)	83
7) FUNKTIONSANALYSE DES PTEN-PROTEINS	89
8) RNA-QUALITÄT	93
9) ERGEBNISSE DER ARRAYANALYSEN	94
10) ARNA	98

VI. DISKUSSION.....	100
VI.I LNCAP/„ <i>IN VITRO</i> “-ANALYSEN.....	100
1) EXPRESSION VON EXOGENEM PTEN IN LNCAP-ZELLEN	100
2) WACHSTUM PTEN-TRANSFIZIERTER ZELLEN.....	102
3) ERGEBNISSE DER ARRAY-ANALYSEN UND DER RT-PCR.....	103
4) AUSBLICK	109
VI.II PROSTATATUMOREN/„ <i>IN VIVO</i> “-ANALYSEN.....	110
1) cDNA-SUBTRAKTION.....	110
2) UMFANG DER PTEN-EXPRESSION IN TUMORZELLEN	110
3) NORMALISIERUNG DER C _T -WERTE DER QUANTITATIVEN REALTIME RT-PCR.....	112
4) SMART/LD-PCR/RNA-QUALITÄT	112
5) ARRAY-ANALYSEN	115
6) AUSBLICK	117
VII. ZUSAMMENFASSUNG	119
VIII. ANHANG.....	121
1) LITERATUR	121
2) ABKÜRZUNGEN.....	129

Paul von Hindenburg, geboren 1847, gestorben 1934; 1870 – 1911 Militärlaufbahn, 1914 Oberbefehlshaber im Ersten Weltkrieg, 1918 Übernahme der Obersten Heeresleitung (OHL), 1925 wird von Hindenburg zum Reichspräsidenten gewählt, 1932 gewinnt er bei seiner Wiederwahl gegen Adolf Hitler, 1933 beruft Hindenburg Hitler zum Reichskanzler.

Pablo Picasso, geboren 1881, gestorben 1973; Maler, Graphiker, Bildhauer; 1901 – 1904 „Blaue Periode“, 1905 – 1907 „Rosa Periode“, 1908 – 1917 ist Picasso Mitbegründer des Kubismus, 1925 beteiligt sich Picasso an der ersten Ausstellung der Surrealisten in Paris, 1949 wird Picassos Lithographie „die Taube“ für das Plakat zum Friedenskongress in Paris ausgewählt.

Roger Moore, geboren 1928; wollte eigentlich Maler werden, geht dann jedoch an die Royal Academy of Arts, um Schauspiel zu studieren. Nach dem Krieg jobbt er zunächst als Dressman und Verkäufer und nimmt verschiedene kleine Rollen an, 1953 bekommt er einen Vertrag in den USA und ist in mehreren Fernsehserien erfolgreich, 1973 gelingt ihm mit dem James-Bond-Film „Leben und sterben lassen“ der Durchbruch, sechs weitere James-Bond-Filme folgen.

Rudolph W. Giuliani, geboren 1944; Sohn italienischer Einwanderer in den USA, ist seit dem 11. September 2001 der ganzen Welt ein Begriff; als Angehöriger der Republikaner wird er bereits acht Jahre vorher zum Bürgermeister von New York gewählt, Anfang 2002 gibt er dieses Amt an einen Nachfolger weiter.

Auf den ersten Blick scheint diese vier Männer nichts zu verbinden. Aber es gibt eine Gemeinsamkeit, die sie mit Tausenden von weiteren Männern auf dieser Welt teilen: Sie leiden oder litten an Prostatakrebs. Dies ist kein Thema, über das man(n) gerne in der Öffentlichkeit redet. Viele Männer sind sich der Gefahr von Prostatakrebs nicht bewusst und versäumen es, sich um eine regelmäßige Krebsvorsorge zu kümmern. Betroffene halten sich für eine kleine, bemitleidenswerte Minderheit. Dabei ist Prostatakrebs bei Männern in den Vereinigten Staaten und in Europa die häufigste Krebsart und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache. Am Europäischen Krebsforschungsinstitut in Mailand wurde errechnet, dass die Häufigkeit des Prostatakarzinoms bis zum Jahr 2010 um etwa drei Prozent pro Jahr zunehmen wird. Um den Prostatakrebs wirkungsvoll bekämpfen zu können, sind zunächst tiefergehende Einblicke in die molekularen Prozesse von dessen Entstehung und Entwicklung sowie die mögliche Vererbung prädestinierender Krebsgene notwendig. Die Grundlagenforschung befindet sich auf dem richtigen Weg. In der Zwischenzeit liegt es an der Gesellschaft, das Thema „Prostatakrebs“ zu enttabuisieren und Vorsorgeuntersuchungen für jeden Mann ab einem gewissen Alter als normale Maßnahme zu etablieren, wie es bei gynäkologischen Untersuchungen von Frauen längst der Fall ist.

I. Einleitung

1) Zellwachstum

Körperzellen unterliegen normalerweise einer strikten Entwicklungskontrolle. Zellteilung, Differenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) sind präzise reguliert. Beim jungen Säugetier werden mehr Zellen gebildet als Zellen absterben, so dass das Körpergewicht zunimmt. Im erwachsenen Organismus stehen Bildung und Absterben von Zellen im Gleichgewicht. Einige adulte Zellen, wie die Epithelzellen des Dünndarms, werden sehr schnell erneuert. Sie haben eine mittlere Lebensdauer von nur wenigen Tagen. Demgegenüber haben menschliche Erythrozyten eine mittlere Lebensdauer von ca. 100 Tagen. Gesunde Leberzellen sterben nur sehr selten. Gehirnzellen gehen beim Erwachsenen langsam verloren und werden kaum oder gar nicht ersetzt (Darnell et al., 1990).

2) Die Entstehung von Tumoren

Die Entstehung von Tumoren lässt sich auf Veränderungen im Genom einer oder mehrerer Zellen innerhalb eines Gewebes zurückführen. Aufgrund verschiedener Mechanismen, z. B. Mutationen, Deletionen oder Amplifikationen von Genen, geht die Regulation des Zellwachstums verloren, und die betroffene Zelle beginnt, sich unkontrolliert zu teilen. Für diesen Vorgang sind immer mehrere unabhängige genetische Veränderungen innerhalb einer Zelle notwendig (Mehrstufenmodell der Tumorentstehung). Diese werden an die Tochterzellen weitergegeben.

Für die Entstehung von Krebs sind zwei Arten von Genen verantwortlich:

Protoonkogene sind normale zelluläre Gene, deren Aktivierung oder verstärkte Expression aktiv zum Wachstum des Tumors beiträgt. Ihre Aktivierung kommt durch Veränderungen in der Promotorregion, durch Amplifikation des kompletten Gens, durch Mutationen oder durch die verstärkte Expression aufgrund von Translokationen regulatorischer Elemente zustande. Dadurch werden die Protoonkogene zu *Onkogenen*. Onkogene sind dominant. Das bedeutet, dass eine Veränderung eines der beiden Allele ausreicht, um Entstehung und Wachstum von Tumoren zu fördern. Bei Protoonkogenen kann es sich beispielsweise um Wachstumsfaktoren wie TGF- α oder um Protein-Kinasen wie c-src handeln, die in die Signalkaskaden der Zellen eingreifen und ein verstärktes Wachstum der Zellen stimulieren.

Tumorsuppressorgene sind Gene, die in normalen Zellen z. B. Zellzyklus und Apoptose regulieren. Wird durch Deletionen einzelner Basen oder regulatorischer Einheiten oder durch den Verlust ganzer Allele die Bildung eines funktionellen Proteins unterbunden, so geht diese

Kontrolle verloren. Da Tumorsuppressorgene rezessiv sind, müssen immer beide Allele betroffen sein, damit sich der Verlust auf das Wachstum des Tumors auswirkt.

Wenn ein Tumor aus einer einzelnen mutierten Zelle hervorgegangen ist, so spricht man von einem *klonalen* Tumor. Klonale Tumoren liegen bei den meisten Krebserkrankungen vor (Mendelsohn et al., 2001). Möglich ist aber auch, dass am Anfang der Tumorentstehung parallel verschiedene entartete Zellen entstehen, von denen aber nur einzelne die Fähigkeit erwerben, invasiv wachsen zu können. Zu Beginn der Tumorentstehung kann es sich also um einen *polyklonalen* Tumor handeln (Jenkins et al., 1997). Obwohl die Metastasen eines Tumors in der Regel auf einen einzelnen Klon zurückzuführen sind, sind in unterschiedlichen Regionen eines Tumors weiterhin verschiedene Mutationen und Deletionen nachweisbar. Hier spricht man von der *Heterogenität* des Tumors. Diese Heterogenität ist bei Prostatatumoren besonders stark ausgeprägt.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von Tumoren:

Benigne Tumoren sind zum Beispiel Warzen. Sie sind in der Regel durch Bindegewebe umschlossen und stellen für den Patienten selten eine Gefahr dar. Eine Ausnahme bildet die Entwicklung von Tumoren in einem engen Raum wie dem Gehirn. Hier können sich auch benigne Tumoren lebensbedrohend auswirken.

Maligne Tumoren werden auch als *Krebs* bezeichnet. Sie können im fortgeschrittenen Stadium eingegrenzte Gewebereiche verlassen und metastasieren; wenn sie nicht rechtzeitig behandelt werden, führen sie bei den betroffenen Patienten in der Regel zum Tod.

3) Die Prostata

Neben Samenblasen und Cowperschen Drüsen gehört die Prostata zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes. Beim erwachsenen Mann wiegt sie etwa 20 g und hat die Größe einer Esskastanie. Ihre Aufgabe ist es, eine leicht alkalische Flüssigkeit zu sezernieren, die als Träger für die Samenfäden dient. Das Sekret besteht aus Phosphatasen und Spermidin und fördert die Beweglichkeit der Spermien.

Die Prostata besteht aus einem festen Gefüge, das von einer dünnen fibrösen Kapsel begrenzt ist. Die Basis liegt an der Blasenwand, die dorsale Fläche grenzt an das Rektum. Die hintere Harnröhre wird von der Prostata auf einer Länge von etwa 2,5 cm umgeben. Das Innere der Prostata enthält 30 bis 50 tubulo-alveoläre Drüsen, die in ein dichtes fibromuskuläres Stroma

und Bindegewebe eingelagert sind. Das Sekret wird über baumartig verzweigte Gänge abgeleitet (Netter, 1987).

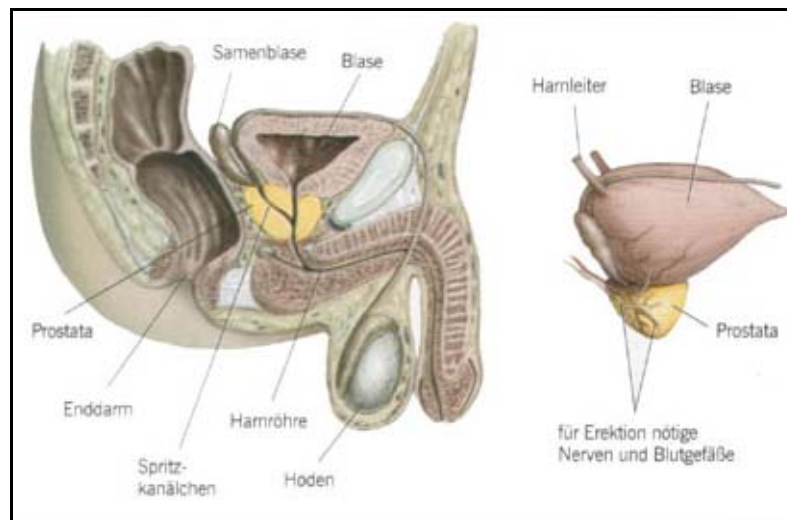


Abbildung I.1: Lage und Funktion der Prostata (entnommen aus Garnick und Fair, 1999)

Nach McNeal (1988) lässt sich die Prostata in vier verschiedene Zonen einteilen: die zentrale Zone, die Transitionalzone, die anteriore Zone und die periphere Zone (Abbildung I.2).

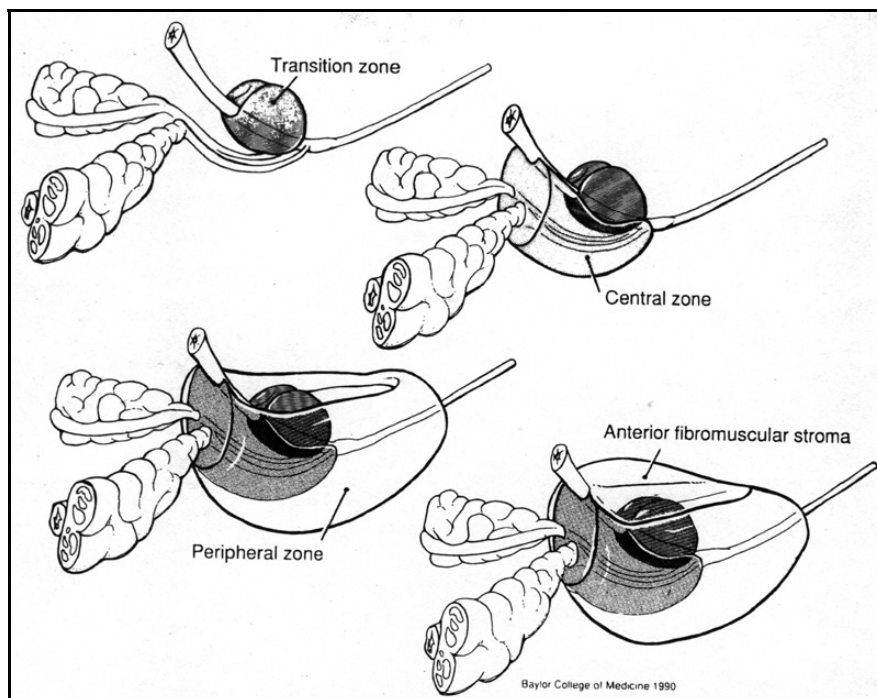


Abbildung I.2: Aufbau der Prostata nach McNeal (entnommen aus McNeal et al., 1988)

In der *Transitionalzone* kann es durch Proliferation der glatten Muskulatur und des Bindegewebes zur sogenannten Benigen Prostatahyperplasie (BPH) kommen. BPH ist die häufigste gutartige Erkrankung der Prostata. Sie entsteht vermutlich durch ein unausgeglichenes Verhältnis der Hormone Androgen und Östrogen und tritt häufig zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf. Die *periphere Zone* beherbergt 75 % des Drüsengewebes. Hier entstehen zwischen 70 und 90 % aller Prostatakarzinome (Sökeland et al., 2002).

4) Das Prostatakarzinom

Die *Inzidenz* (jährliche Neuerkrankungsrate) für das Prostatakarzinom liegt laut Hautmann und Huland (2001) in China bei 1,3, in Deutschland bei 30, bei weißen US-Amerikanern bei 60 und bei farbigen US-Amerikanern bei 95 Männern pro 100.000. In Deutschland rechnet man mit 31.500 neuen Fällen und 12.000 Todesfällen pro Jahr. Damit ist Prostatakrebs mit 18,7 % die häufigste Krebsart bei Männern vor Lungen- und Darmkrebs und mit 10,5 % die dritthäufigste krebssbedingte Todesursache (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002). Durch frühzeitigen Tod durch Prostatakrebs gehen den betroffenen Männern in Deutschland pro Jahr insgesamt 97.400 Lebensjahre verloren. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren, aber schon ab dem 50. Lebensjahr findet man bei jedem 10. Mann ruhende Karzinomzellen.

Beim Prostatakarzinom handelt es sich in der Regel um ein Adenokarzinom (Karzinom des drüsenbildenden Gewebes). Ausgangspunkt ist, wie oben bereits erwähnt, das Drüsengewebe der peripheren Zone. Dadurch ist der Tumor vom Mastdarm aus tastbar. Mit zunehmender Größe findet eine Infiltration des gesamten Prostataparenchyms statt. Nach und nach sind auch die Samenblasen, später der Harnleiter und der gesamte Beckenraum betroffen. Die Metastasierung erfolgt auf dem Lymph- und auf dem Blutweg und führt zu Metastasen in den Lymphknoten bzw. Knochen.

Vier verschiedene Karzinomtypen gilt es zu unterscheiden (Sökeland et al., 2002). Das *manifeste* Karzinom ist das häufigste urologische Malignom. Es tritt in der Regel nach dem 50. Lebensjahr auf. Beim *inzidentiellen* Karzinom handelt es sich um einen Tumor, der vom Pathologen zufällig bei der Untersuchung von BPH-Gewebe gefunden wird. Dieses Phänomen tritt bei 3 bis 5 % aller Benigen Prostatahyperplasien (BPH) auf. Bei Autopsien trifft der Pathologe bei 40 % der 50jährigen und bei über 60 % der 80jährigen auf das *latente* Karzinom. Zu Lebzeiten der betroffenen Männer ist es nicht auffällig geworden. Das *okkulte* Karzinom schließlich hat, obwohl rektale Befunde unauffällig sind, bereits zu einer Manifestation von Metastasen geführt.

Die *Ätiologie* des Prostatakarzinoms wird auf verschiedene Faktoren zurückgeführt:

1. Genetische Faktoren

Besonders bei einer Erkrankung, die bereits vor dem 50. Lebensjahr einsetzt, spielen genetische Faktoren eine Rolle. Die genetischen Faktoren beim Prostatakarzinom werden in Kapitel 6 ausführlicher betrachtet.

2. Hormonelle Faktoren

Ähnlich wie bei der Benigenen Prostatahyperplasie wird eine Störung des Östrogen/Androgen-Gleichgewichts als ein Grund für die Entstehung von Prostatakarzinomen gesehen. Als Beweis dafür lässt sich die Tatsache anführen, dass Männer, die bereits in ihrer Kindheit durch Krankheiten oder Unfälle kastriert wurden, kein Prostatakarzinom entwickeln können.

3. Diät und Umwelteinflüsse

Wie oben erwähnt, ist das Risiko eines Chinesen, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, deutlich geringer als das eines US-Amerikaners. Bei Chinesen, die in die USA eingewandert sind, erhöht sich die Inzidenz dagegen merklich. Dies lässt den Schluss zu, dass neben den genetischen Faktoren auch die Lebensumstände einen Einfluss auf das Entstehen von Prostatakrebs haben.

4. Infektionskrankheiten

Virale und venerische Entzündungen der Harnröhre werden ebenfalls als möglicher Auslöser des Prostatakarzinoms in Erwägung gezogen. Die Ergebnisse diesbezüglicher Studien sind jedoch kontrovers.

Die *Diagnose* eines Prostatakarzinoms lässt oft zu lange auf sich warten, weil sich in der Regel erst im fortgeschrittenen Stadium Probleme beim Wasserlassen, nächtlicher Harndrang oder Kreuzschmerzen einstellen. Regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen mit Hilfe von bildgebenden Verfahren oder durch Abtasten der Prostata vom Rektum aus sind deswegen ab einem bestimmten Alter sinnvoll. Außerdem lässt sich als diagnostischer Marker der PSA-Wert bestimmen. Beim Prostata-spezifischen Antigen (PSA) handelt es sich um ein 30 kDa großes Glykoprotein, das ausschließlich im Prostatagewebe gebildet wird und der Verflüssigung des Samens dient. Der PSA-Wert liegt beim Mann bis zum 50. Lebensjahr bei ca. 2,5 ng/ml und steigt mit fortschreitendem Alter stetig an. Beim Vorliegen eines Prostatakarzinoms oder einer Benigenen Prostatahyperplasie kann der PSA-Wert deutlich erhöht sein. 8 % aller Männer über 50 weisen einen leicht erhöhten PSA-Wert zwischen 4 und 10 ng/ml auf. Von diesen Männern besitzen etwa 25 % ein behandlungsbedürftiges

Prostatakarzinom. Bei PSA-Werten über 10 ng/ml sind es schon 42 bis 64 %. Allerdings sind bei 20 % aller diagnostizierten Prostatakarzinome die gemessenen PSA-Werte normal. Bei anderen Männern sind dagegen entzündliche Vorgänge der Grund für einen erhöhten PSA-Wert.

Je nach Alter des Patienten und Fortschritt des Prostatakarzinoms bieten sich verschiedene Methoden der *Behandlung* an. Ist das Karzinom nicht zu weit fortgeschritten und regional begrenzt, lässt es sich durch eine *radikale Prostatektomie* (Entfernung der gesamten Prostata) entfernen. Ein *Androgenentzug* durch Kastration führt zum Stillstand des Wachstums. In bis zu 80 % der Fälle kann es sogar zu einer Rückbildung kommen. Eine *Strahlentherapie* ist dann das Mittel der Wahl, wenn das Karzinom die Organgrenzen bereits überschritten hat. Bei älteren Patienten, deren Karzinom nicht zu weit fortgeschritten ist und für die eine der oben genannten Behandlungsmethoden eine zu große Belastung darstellen würde, reicht *kontrolliertes Abwarten* aus, da viele ältere Männer an Altersschwäche sterben, bevor das Prostatakarzinom zu Schwierigkeiten führt. Die Anwendung dieser Behandlungsmethoden wird allerdings von verschiedenen Ärzten unterschiedlich gewichtet. Während in Schweden ein Prostatakarzinom nur selten operiert wird, und oft zunächst kontrolliertes Abwarten die Methode der Wahl ist, greifen Ärzte in den USA oft zum Skalpell.

5) Grading und Entwicklungsstadien von Prostatakrebs

5.1) Grading nach Gleason

Das histologische Grading-System nach Gleason (1966) richtet sich nach den verschiedenen Wachstumsmustern des Prostatakarzinoms, die durch die abnehmende Differenzierung des Karzinoms und den Verlust der histologischen Architektur charakterisiert werden. Man unterscheidet ein vorherrschendes primäres Muster und ein weiteres sekundäres Muster, die beide wiederum in fünf Untergruppen aufgeteilt werden. Beide Muster werden über ein Punktesystem addiert. Dabei erhält das Karzinom mit der höchsten Differenzierung (frühes Krebsstadium) den geringsten Wert ($1+1=2$), mit zunehmendem Verlust von Differenzierung und histologischer Architektur steigt der Wert bis zu einem Krebsstadium höchster Malignität an ($5+5=10$).

Abbildung I.3 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Struktur des Karzinoms und dessen Bewertung.

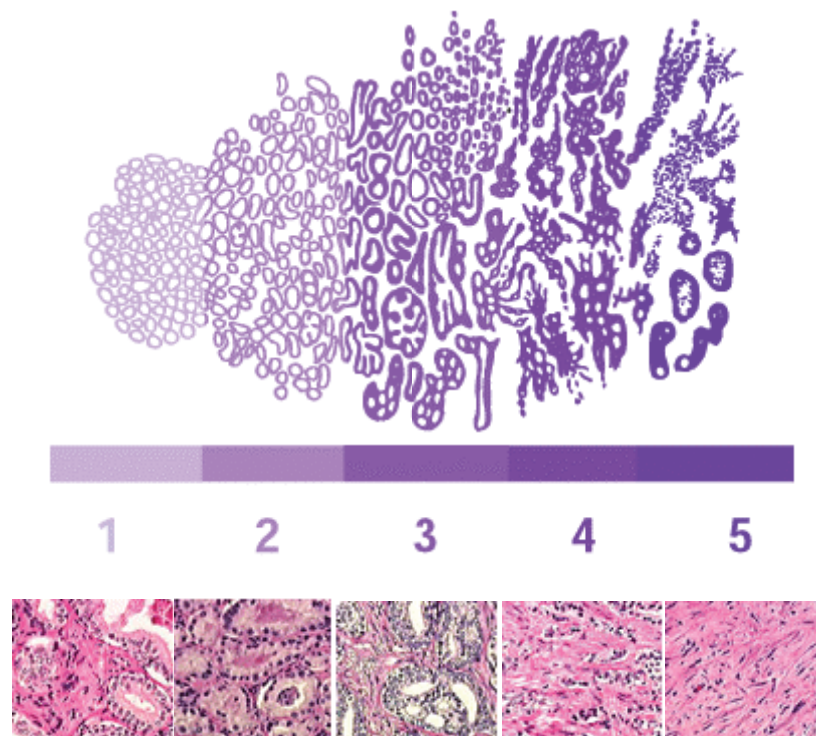


Abbildung I.3: Schematische Darstellung des Grading nach Gleason; jedem Muster ist das Bild eines entsprechenden Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Gewebeschnitts eines Prostatatumors zugeordnet. (entnommen aus [Centerhttp://www.upmccancercenters.com/cancer/prostate/gradingsystems.html](http://www.upmccancercenters.com/cancer/prostate/gradingsystems.html))

Die histologischen Wachstumsmuster sind dabei folgendermaßen charakterisiert:

Muster 1: sehr gut differenzierte, dicht gepackte, uniforme Drüsen in umschriebenen Haufen;

Muster 2: mäßiggradige Unterschiede in Größe und Form der Drüsen; stärkere Atypien in einzelnen Zellen; Struktur des Gewebes beginnt sich aufzulockern;

Muster 3: Unregelmäßigkeiten hinsichtlich Größe und Form der Drüsen nehmen zu; schmale Drüsen und einzelne Tumorzellen wachsen infiltrierend aus definierten Tumorherden heraus;

Muster 4: große, helle, diffus wachsende Zellen, die aber noch eine glanduläre Differenzierung aufweisen können;

Muster 5: Karzinome entsprechen niedrig differenzierten Formen, die ein solides oder diffuses Wachstum mit geringer oder fehlender Differenzierung der Drüsen aufweisen.

5.2) Einteilung des Prostatakarzinoms in Stadien

Je nach Ausbreitung der Krebszellen lassen sich Prostatakarzinome in vier Stadien unterteilen (Dhom et al., 1980):

Stadium	Unterstadium
Stadium T1 Mikroskopisch kleiner Tumor, der auf die Prostata beschränkt ist. Die Drüse fühlt sich beim Abtasten normal an.	T1a : Der Tumor wurde in Prostatagewebe entdeckt, das aus anderen Gründen als Krebsverdacht entnommen wurde; weniger als 5% des Präparats sind bösartig. T1b : Ähnlich T1a, aber mehr als 5% des Präparats sind bösartig. T1c : Tumor wurde in einer Biopsie entdeckt, die wegen eines erhöhten PSA-Spiegels entnommen wurde; er kann weniger ausgedehnt sein als beim Stadium T1b.
Stadium T2 Ertastbarer Tumor, der sich auf die Prostata beschränkt.	T2a : Der Tumor nimmt weniger als die Hälfte eines Drüsenlappens ein. T2b : Der Tumor nimmt mehr als die Hälfte eines Drüsenlappens ein. T2c : Der Tumor hat beide Lappen befallen.
Stadium T3 Der Tumor hat begonnen, sich über die Kapsel der Prostata hinweg auszubreiten.	T3a : Tumor, der über die Prostata hinausreicht. T3b : Der Tumor ist in die Samenbläschen eingebrochen.
Stadium T4 Der Tumor ist mit der Umgebung verwachsen und hat sich deutlich über die Prostata hinaus in die umgebenden Strukturen ausgebreitet (z. B. in Blasenhal, Rektum, Muskulatur und Beckenwand).	

Tabelle I.1: Stadieneinteilung beim Prostatakarzinom

6) Chromosomale Veränderungen beim Prostatakarzinom

Mit Hilfe von LOH (loss of heterozygosity)-Analysen, CGH (comparative genomic hybridisation) und klassischen zytogenetischen Untersuchungen konnte eine große Zahl unterschiedlicher chromosomaler Veränderungen in Prostatakarzinomen nachgewiesen werden (Isaacs et al., 1994; Roylance et al., 1997). Diese Aberrationen sind in Abbildung I.4 zusammengefasst. Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 und dem langen Arm von Chromosom 16 stellen die häufigsten Veränderungen dar (Isaacs et al., 1994). Einige der Veränderungen wie die Deletion von Genen im Bereich 8p werden mit der Initiation der Tumorgenese in Verbindung gebracht, da sie in 60 bis 80 % der primären Prostatakarzinome auftreten (Sauter et al., 1998). Andere erfolgen fast ausschließlich in späten Tumorstadien, wie zum Beispiel die Deletion des Bereiches 7q31.1. Der Verlust dieses Segments korreliert

mit dem Fortschreiten des Tumorstadiums und mit einem erhöhten Metastasierungspotential (Lara et al., 1999).

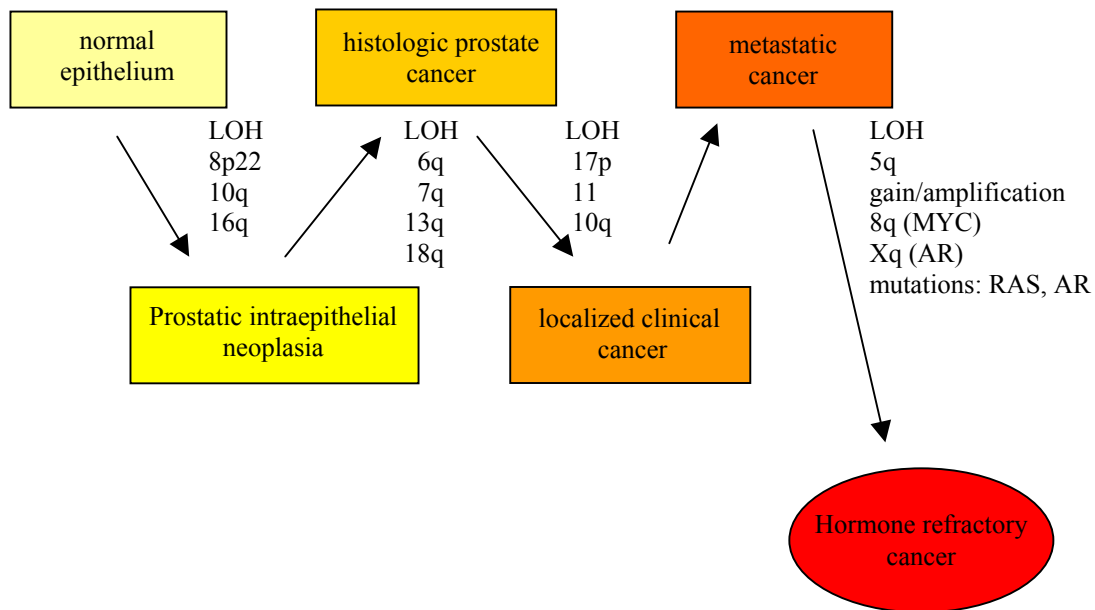


Abbildung I.4: Modell für die Karzinogenese bei Prostatakrebs nach Royer-Pokora (unveröffentlichte Abbildung). Je nach Fortschritt des Tumorstadiums treten Deletionen, Amplifikationen und Mutationen auf unterschiedlichen Chromosomen auf. AR = Androgenrezeptor

Ein weiteres Beispiel für eine „späte“ Deletion ist der Verlust der Region 10q23 – 26 (Steck et al., 1995; Leube et al., 2002). Diese Region spielt für die vorliegende Doktorarbeit eine zentrale Rolle, da sie das *PTEN*-Gen beherbergt, dessen Funktion in Prostatatumoren im Rahmen dieser Arbeit intensiv untersucht werden sollte.

Zusätzlich zu diesen genetischen Veränderungen sind inzwischen Regionen bekannt, die mit einer familiären Disposition für Prostatakrebs in Verbindung gebracht werden. 1996 wurde z. B. die erste betroffene Region, HPC1, entdeckt (Smith et al., 1996). HPC1 steht für hereditary prostate cancer, wobei der Begriff „hereditär“ aussagt, dass der entsprechende Tumor in drei aufeinanderfolgenden Generationen jeweils vor dem 55. Lebensjahr diagnostiziert wurde. Als verantwortliches Gen innerhalb der HPC1-Region vermutet man inzwischen das *RNaseL*-Gen (Rokman et al., 2002). Außerdem wurden fünf weitere Kandidatenregionen publiziert.

7) PTEN

Das Tumorsuppressorgen *PTEN* wurde 1997 zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen entdeckt. Die Veröffentlichung von Li et al. erschien als erste im März 1997 in Science. Hier wurde der bisher geläufigste Name „*PTEN*“ (Phosphatase and TENSin homolog deleted on chromosome

TEN) geprägt. Im April 1997 beschrieben Steck et al. in Nature Genetics das gleiche Gen unter dem Namen *MMAC1* (Mutated in Multiple Advanced Cancers). Schließlich ist *PTEN* auch unter dem Namen *TEP1* (TGF-regulated and Epithelial cell enriched Phosphatase; Li et al., Cancer Research, Juni 1997) bekannt.

Die Entdeckung von *PTEN* lässt sich auf ein gehäuftes Auftreten von LOH (loss of heterozygosity) im Bereich 10q22 – 26 des Chromosoms 10 bei einer Vielzahl von Tumoren zurückführen (Steck et al., 1997). Betroffen sind neben Prostata Tumoren (Ittmann et al., 1996; Cairns et al., 1997) unter anderem Melanome, Glioblastome sowie Nieren-, Brust- und Lungenkrebs (Li et al., Science, 1997; Myers et al., 1997; Hong et al., 2000). Das Tumorsuppressorgen *PTEN* wurde daraufhin durch Representational Difference Analysis (RDA; Li et al., Science, 1997) und Hybridisierungen mit Markern aus der Region sowie Northern Blot (Steck et al., 1997) auf die Region 10q23.3 eingegrenzt. Keimzellmutationen von *PTEN* führen zur Cowden-Krankheit und zum Bannayan-Zonana-Syndrom (Tsou et al., 1997). Patienten leiden unter der Bildung unterschiedlicher gutartiger Tumoren (Hamartome) und einem erhöhten Risiko, an bösartigen Tumoren zu erkranken (Di Cristofano et al., 2000). Das *PTEN*-Gen besteht aus 9 Exons und ist insgesamt 46.825 bp groß. Die Transkription führt zu unterschiedlich langen mRNA-Species, was auf das Vorhandensein von mehreren Polyadenylierungssignalen hindeutet (Hamilton et al., 2000).

Eine Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei PTEN um eine Phosphatase handelt, die von Exon 5 codiert wird. Biochemische Experimente zeigten wenig später, dass eine Lipidphosphatase bzw. eine bispezifische Phosphatase (Serin/Threonin, Tyrosin) vorliegt. Das Protein besitzt außerdem eine 175 Aminosäuren lange Domäne, die Homologie zu Tensin und Auxilin, Proteinen des Zytoskeletts, aufweist (Li et al., Science, 1997; Steck et al., 1997; Myers et al., 1997). Viele Mutationen in *PTEN*, die mit der Bildung von Tumoren in Verbindung gebracht werden, liegen innerhalb oder nahe der Phosphatase-Domäne.

In frühen Stadien von Prostata Tumoren ist das *PTEN*-Gen in der Regel intakt, was bedeutet, dass *PTEN* nicht mit der Initiation von Tumoren in Verbindung gebracht werden kann. In späten Tumorstadien und Metastasen hingegen findet man vermehrt Deletionen und damit die Inaktivierung des *PTEN*-Gens. Daraus kann man schließen, dass der Verlust von *PTEN* für Wachstum und Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle spielt.

PTEN ist in mehreren Signaltransduktionswegen aktiv, die inzwischen teilweise recht gut erforscht sind. Der scheinbar wichtigste davon ist der sogenannte AKT-Kinase-Signaltransduktionsweg.

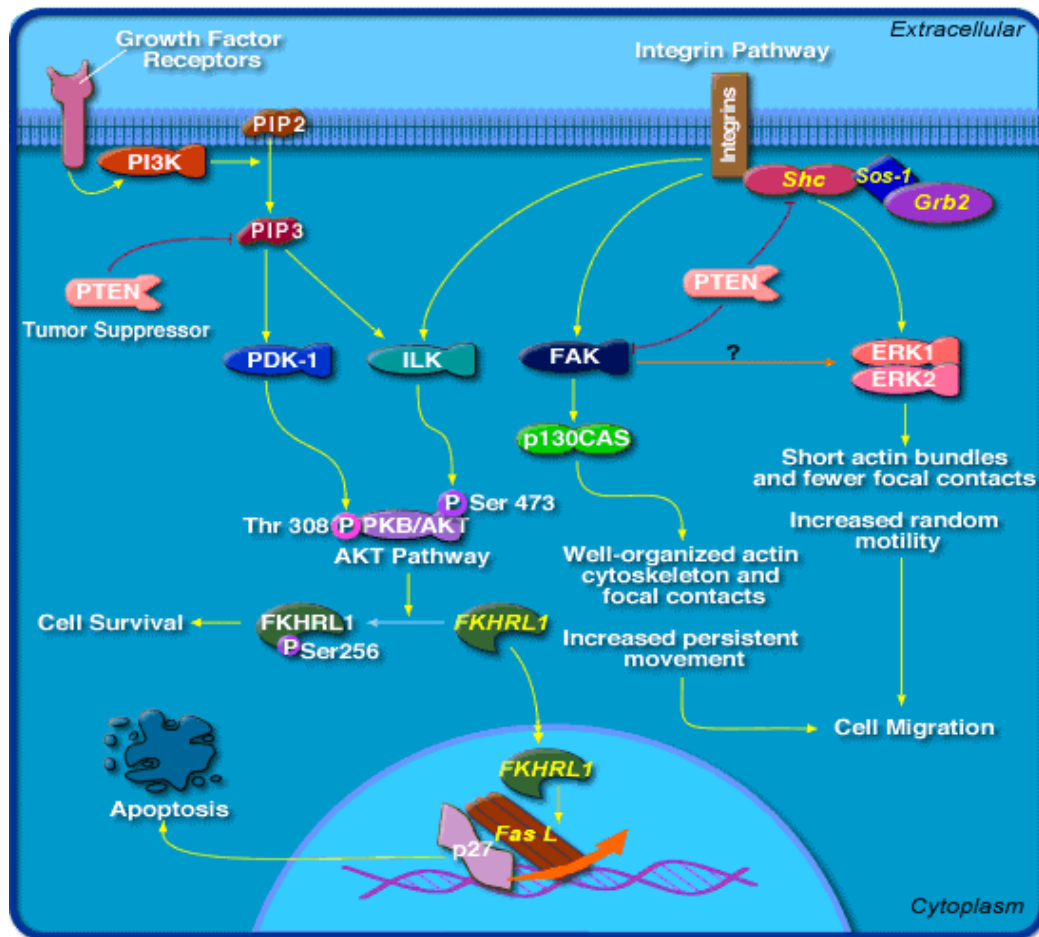


Abbildung I.5: Funktion des Tumorsuppressors PTEN im AKT-Kinase- und im Integrin-vermittelten Signaltransduktionsweg (entnommen aus <http://cgap.nci.nih.gov/Pathways>)

PI3K = Phosphatidylinositol-3OH-kinase, PIP₃ = Phosphoinositol-3-phosphat, PDK-1 = 3'-phosphoinositide-dependent kinase, FKHRL1 = proapoptotischer Transkriptionsfaktor, FAK = Focal Adhesion Kinase, Shc = Src homology 2 containing protein, Grb2 und Sos = MAP (mitogen activated protein) Kinasen, ERK1/2 = extra-cellular signal-regulated kinase.

Die Tumorsuppressoraktivität von PTEN wird nämlich vor allem der Fähigkeit zugeschrieben, Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (PIP₃) an Position 3 zu dephosphorylieren (siehe Abbildung I.5). Dadurch wird die Aktivität von Protein Kinase B (AKT/PKB), die ihrerseits durch PIP₃ reguliert wird, verringert (Di Cristofano et al., 2000). AKT ist eine Serin/Threonin Protein Kinase, die der Zelle lebenserhaltende Signale vermittelt. Sie kommt in Säugerzellen in drei Isoformen vor. Alle drei enthalten eine zentrale Kinase-Domäne, deren Funktion durch die Phosphorylierung von Thr 308 aktiviert werden kann. Ein weiterer maßgeblicher Ort der Phosphorylierung liegt nahe dem C-Terminus bei Ser 473. Beide sind für die vollständige Aktivität von AKT wichtig.

Im AKT-Signaltransduktionsweg laufen folgende Prozesse ab (Blume-Jensen et al., 2001):

An der inneren Membran wird PIP₂ durch die Phosphatidylinositol-3OH-Kinase (PI3K) zu PIP₃ phosphoryliert. PIP₃ interagiert mit AKT und wird so in räumliche Nähe zur

3'-Phosphoinositide-dependent Kinase (PDK1) gebracht, die vermutlich mit AKT einen Dimer bildet (Abbildung I.6). Bei der Interaktion zwischen PIP_3 und AKT kommt es zu einer Konformationsänderung von AKT, so dass Thr 308 und Ser 473 gut zugänglich sind. Thr 308 wird nun von PDK1, die eine etwa zehnfach höhere Affinität zu PIP_3 besitzt als AKT, phosphoryliert und damit aktiviert.

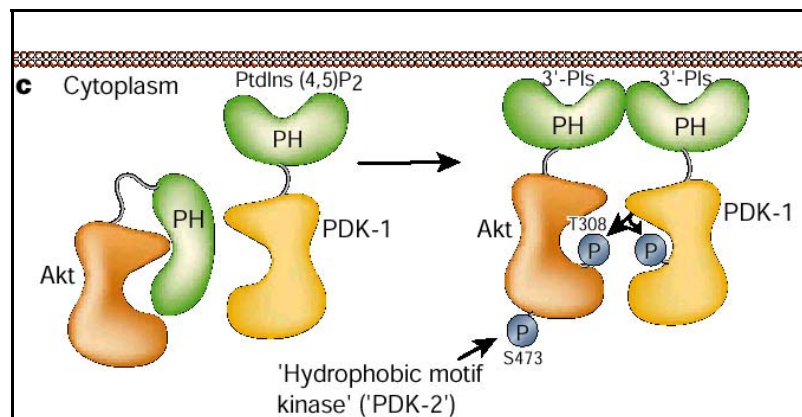


Abbildung I.6: Interaktion (Dimerbildung) der AKT-Kinase und von PDK1 an der inneren Membran und Phosphorylierung von AKT durch PDK1 (entnommen aus Blume-Jensen et al., 2001).

Bisher sind in Säugerzellen 13 verschiedene Substrate von AKT bekannt. Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

1. Substrate, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind;
2. Substrate, die bei der Regulation von Zellwachstum, Proteinsynthese, Glykogen-Metabolismus und Zellzyklusregulierung eine Rolle spielen.

Zu der ersten Gruppe gehört der in Abbildung I.5 dargestellte Transkriptionsfaktor FKHRL1, ein Mitglied der Forkhead-Familie. Wird FKHRL1 von AKT phosphoryliert, so geht er eine Bindung mit dem Protein 14-3-3 ein und wird so im Cytoplasma zurückgehalten. Wird seine Phosphorylierung durch das Vorhandensein von PTEN und damit durch die fehlende Aktivität von AKT verhindert, so wandert er in den Kern und schaltet dort proapoptotische Gene wie den FAS-Liganden an. Es kommt zur Apoptose (Brunet et al., 1999). Verlust von PTEN führt zu verstärkter Proliferation, verminderter Apoptose und erhöhter Angiogenese in Tumoren.

Überexpression von Wildtyp-*PTEN* bewirkt eine Verminderung von Zellwanderung („cell spreading“) und eine Einschränkung der Bildung von „fokal adhesions“. Das liegt daran, dass PTEN die Tyrosin-Phosphorylierung der Focal Adhesion Kinase (FAK) reduziert und damit ihre Aktivität mindert (Tamura et al., 1998). FAK ist ein wichtiger Bestandteil der Integrin-vermittelten Regulation von interzellulären Kontakten, der Wanderung von Zellen, z. B. bei

metastasierenden Tumoren, und gegebenenfalls des Zellwachstums. Hohe Aktivität von FAK führt zu einer Bindung an p130^{CAS}. Dieser Komplex aktiviert weitere Signaltransduktionswege und führt schließlich dazu, dass die betroffene Zelle den Kontakt zur Extrazellulären Matrix verliert und damit resistent gegenüber Apoptose wird. Außerdem kommt es zur Zellwanderung. Dieser Tendenz wirkt PTEN entgegen.

Der dritte in Abbildung I.5 dargestellte Signaltransduktionsweg geht von SHC (Src homology 2-containing protein) aus. PTEN dephosphoryliert SHC und hemmt dadurch die MAP- (mitogen activated protein) Kinase-Signalkaskade, die über GRB2 und SOS zu ERK (extracellular signal-regulated kinase) führt (Gu et al., 1998). Ebenso wie der FAK-Signaltransduktionsweg ist der MAP-Kinase-Weg an der Regulation interzellulärer Kontakte, an Migration und Invasion von Zellen beteiligt.

PTEN spielt auch bei der embryonalen Entwicklung eine Rolle (Podszypania et al., 1999). Eine Untersuchung an Mäusen ergab, dass eine schwache Expression von PTEN mittels Immunhistochemie bereits am Tag acht postcoitum in Rückenmark, Herz, Epidermis und einem breiten Spektrum weiterer Organe nachweisbar ist. Von Tag 11 bis Tag 16 ist die Expression deutlich erhöht. Blastocysten, bei denen beide Allele von *PTEN* deletiert sind, scheinen sich zwar bis zum dritten Tag postcoitum normal zu entwickeln, die Mäuseembryonen weisen jedoch ab dem sechsten Tag morphologische Störungen auf.

8) LNCaP

Die Zelllinie LNCaP wurde 1977 von J.S. Horoszewicz et al. aus einer Biopsie des linken supraklavikulären Lymphknotens eines 50 Jahre alten Mannes etabliert, der an metastasierendem Prostatakrebs erkrankt war (Horoszewicz, 1980). Die Zellen sind sensitiv gegenüber 5-Alpha-Dihydrotestosteron, sie sind aber nicht Hormon-abhängig (Horoszewicz et al., 1983). LNCaP-Zellen wachsen nicht in einer homogenen Schicht (Monolayer), sondern bilden Kolonien. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 60 Stunden. Der Karyotyp ist hypotetraploid. Die Chromosomenzahl variiert zwischen 76 und 91 (Horoszewicz et al., 1983) und besteht aus einem vierfachen Chromosomensatz einschließlich Geschlechtschromosomen und verschiedenen Markerchromosomen (Gibas et al., 1984). Die Injektion von LNCaP-Zellen in Nacktmäuse führt zur Bildung von Tumoren (Horoszewicz et al., 1983).

Da es bei Prostatakrebs häufig zu chromosomalen Deletionen in der Region 10q23-26 kommt, die unter anderem das Tumorsuppressorgen *PTEN* enthält, wurde dieser Bereich auch bei LNCaP-Zellen eingehend untersucht (Ford et al., 1998). Dabei wurde eine nicht-reziproke

Translokation von 10q24 auf Chromosom 4 gefunden (Vlietstra et al., 1998). *PTEN* ist nur noch auf zwei von vier Chromosomen 10 vorhanden, die beiden anderen Kopien wurden bei der Translokation auf Chromosom 4 deletiert. Die beiden verbliebenen Gene weisen eine Leseraster-Mutation in Exon 1 auf. Dabei handelt es sich um eine Deletion in Codon 6 von AAA zu A (Li et al., Science, 1997).

9) Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass das *PTEN*-Gen bei Wachstum und Metastasierung von Prostatatumoren eine wichtige Rolle spielt. Wie im Abschnitt 7 beschrieben, ist die Funktion von PTEN innerhalb des AKT-Kinase-Signaltransduktionsweges bereits relativ gut untersucht, und auch seine Beteiligung an weiteren Signaltransduktionswegen steht außer Frage.

Das Ziel dieser Arbeit war es, weitere Gene aufzuzeigen, die durch Präsenz oder Verlust von *PTEN* in Prostatakarzinomen (*in vivo*) sowie in der Prostatakrebszelllinie LNCaP (*in vitro*) reguliert werden. Dazu sollten die Expressionsmuster von PTEN-positiven und PTEN-negativen Tumordrüsen „*in vivo*“ mittels cDNA-Array-Technologie miteinander verglichen werden. Als Ausgangsmaterial standen gefrorene Prostatatumoren zur Verfügung, aus denen zunächst Gefrierschnitte hergestellt werden sollten. Zur Identifizierung der PTEN-positiven und -negativen Tumorregionen wurden die Gefrierschnitte immunhistochemisch gefärbt und anschließend mikrodisektiert. Da auf diese Weise keine für die Hybridisierung von Arrays ausreichende RNA-Menge gewonnen werden konnte, musste die RNA außerdem mit Hilfe der SMART-Technologie (Clontech) amplifiziert werden.

Zusätzlich sollte die Funktion von PTEN „*in vitro*“ untersucht werden. Dazu sollte die Prostatakrebszelllinie LNCaP, die selbst kein PTEN-Protein aufweist, mittels eines induzierbaren Vektorsystems mit dem Wildtyp-*PTEN*-Gen transfiziert werden. Die Expressionsmuster von *PTEN*- und nicht-*PTEN*-haltigen LNCaP-Zellen sollten ebenfalls mit Hilfe von cDNA-Arrays untersucht werden. Eine Amplifikation der RNA war hier nicht notwendig.

Der Einsatz von LNCaP-Zellen ist insofern gegenüber der Verwendung von Tumormaterial vorteilhaft, als damit ein klar definiertes System zur Verfügung steht. Bei der Untersuchung von Prostatatumoren kann das Ergebnis durch die Heterogenität des Tumors verfälscht werden. Jedoch ist auch die Untersuchung von Tumoren unerlässlich, da die Epithel-Stroma-Interaktion (Zell-Zell-Interaktion) im Prostatatumor eine wichtige Rolle spielt. Dieser Einfluss geht bei der Verwendung einer Zellkultur verloren.

II. Material

1) Chemikalien und sonstiges Material

1.1) Chemikalien

Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidiniumisothiocyanat	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Shandon, Pittsburgh, PA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	ICN, Aurora, OH, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxidplätzchen	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform (für RNA/DNA Isolierung)	Roth, Karlsruhe
Phosphate buffered detergent (PBD)	Oncor, Gaithersburg, MD, USA
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Serna, Heidelberg
Tris Base	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
X-gal	Sigma, Taufkirchen
Xylol	Merck, Darmstadt

1.2) Biochemikalien

Agar	DIFCO, Detroit, MI, USA
Agarose	Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Agarose (NuSieve)	BMA, Rockland, ME, USA
Antifade	Oncor, Gaithersburg, MD, USA
5-Azacytidine 50x Hybri-Max®	Sigma, Taufkirchen
Biorad Protein Assay	Biorad, München
Blocking Reagent 6	Boehringer, Mannheim
DAKO® Peroxidase Blocking Reagent	DAKO, Carpinteria, CA, USA
DAKO® Protein Block	DAKO, Carpinteria, CA, USA
DAKO® Antibody Diluent	DAKO, Carpinteria, CA, USA
DAKO® EnVision+™, Peroxidase, Rabbit	DAKO, Carpinteria, CA, USA
DAKO® EnVision+™, Peroxidase, Mouse	DAKO, Carpinteria, CA, USA
DAKO® DAB Chromogen Tabletten	DAKO, Carpinteria, CA, USA
DAPI (200 ng/ml)	Oncor, Gaithersburg, MD, USA
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (100 mM Solution)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Microsystems, Nussloch
Eindeckmedium (Immu-Mount)	Shandon, Pittsburgh, PA, USA
ExpressHyb Hybridization Solution	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Fischgelatine	Sigma, Taufkirchen
GenePORTER 2 Transfection Reagent	PeqLab, Erlangen
GeneSHUTTLE-20	Quantum, Montreal, Kanada
Glycogen (20mg/ml)	Roche, Mannheim
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Human Cot I DNA (1mg/ml)	Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Lachsspermien-DNA	Sigma, Taufkirchen
LIPOFECTAMINE™ 2000 Reagent	Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Oligo dT-Primer (16-18)	Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Protein-Referenz Gamma Globulin (1,56 µg/ µl)	Biorad, München
Random Primer	Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt
RNASEOUT™ Recombinant	Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Ribonuclease Inhibitor	
10% Tris-Hcl Gel	Biorad, München
Trypton	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA

1.3) DNA-Marker

pUC-Mix	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Lambda/Eco 130 I-Marker	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Ready Load 1 kb-Leiter	Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe

1.4) Antikörper

Rabbit-Anti-PTEN (polyklonal)	Zymed, Berlin
Anti-Flag M2 (monoklonal)	Sigma, Taufkirchen
Anti-α-Tubulin (monoklonal)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Akt-P (polyklonal)	Cell Signalling (NEB), Frankfurt

1.5) Enzyme

DNase (1U/μl)	Boehringer, Mannheim
Klenow (Exonuclease-free; 10 U/μl)	USB, Cleveland, OH, USA
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Reverse Transkriptase (SUPERScript™ II, 200 U/μl)	Gibco/BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase (5 U/μl) (rekombinant)	Gibco/BRL/Life Technologies, Karlsruhe

Restriktionsenzyme:

Bgl II	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
BssH II	Boehringer, Mannheim
Hind III	Boehringer, Mannheim
Hpy188 I	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Pvu I	Boehringer, Mannheim
Rsa I	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Sca I	Boehringer, Mannheim
Xba I	Boehringer, Mannheim

1.6) Vektoren

pIND (SP1)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pIND (SP1) GFP	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pIND (SP1) Flag/PTEN	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA/ K. Yamada (Davies et al., 1998)
pVgRXX	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

1.7) Radioisotope

Desoxyribonucleosid 5'-[³² P]-Triphosphate	New England Nuclear (NEN), Boston, MA, USA
Desoxyribonucleosid 5'-[³³ P]-Triphosphate	ICN Biomedicals, Eschwege

1.8) Arrays

Atlas™ Human Cancer 1.2 cDNA Expression Arrays	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Atlas™ Human I bis III cDNA Expression Arrays (3.6)	Clontech, Palo Alto, CA, USA

1.9) Kits

Access RT-PCR System	Promega, Madison, WI, USA
Advantage® 2 LD-PCR Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Atlas SMART™ Probe Amplification Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA
β-Gal Staining Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Enhanced Avian RT-PCR Kit	Sigma, Taufkirchen
MessageAmp™ aRNA Kit	Ambion, Austin, TX, USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
qPCR™ Core Kit	Eurogentec, Seraing, Belgien

Quick Prep[®] Micro mRNA Purification Kit
 PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit
 RNeasy[®] Mini Kit
 SMART[™] PCR cDNA Synthesis Kit
 StrataPrep[®] Total RNA Microprep Kit
 TA Cloning Kit
 TaqMan[®] Gold RT-PCR Kit

Pharmacia Biotech, Freiburg
 Clontech, Palo Alto, CA, USA
 Qiagen, Hilden
 Clontech, Palo Alto, CA, USA
 Stratagene, La Jolla, CA, USA
 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
 PE Biosystems, Boston, MA, USA

2) Verbrauchsmaterial

Blaukappröhrchen (Falcon)

CapSure Transfer Film
 Deckgläschen
 Einwegkanülen (20Gx11/2)
 Einwegspritzen (1 ml)
 Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1 ml)
 Fixogum
 Glaswaren
 Haushaltsfolie
 Hybridisierungsofen, -röhren
 Nunc Lab-Tek Chamber Slides
 Objektträger
 Pasteur-Pipetten
 PCR-Streifen
 PCR-Platten (optical 96-well)
 Pipetten (steril; 5 ml, 10 ml, 25 ml)
 Pipetten (20 µl, 200 µl, 1 ml)
 Pipetten (2,5 µl, 10 µl)
 Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1 ml)
 Pipettenspitzen gestopft (20 µl, 200 µl)
 Röntgenfilme (X-Omat AR 5)
 Stickstoff
 Weißkappenröhrchen (10 ml)
 Whatman-Papier
 Zellkulturflaschen Nunc EasyFlask (75 cm²)
 Zellkulturschalen Nunclon[™] Δ(92 x 17 mm)

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
 Arcturus, Mountain View, CA, USA
 Shandon, Pittsburgh, PA, USA
 Terumo Europe, Leuven, Belgien
 Dahlhausen, Köln
 Eppendorf, Hamburg
 Marabu, Tamm
 Schott, Mainz
 Melitta, München
 Bachofer, Reutlingen
 Nalge Nunc, Naperville, IL, USA
 Engelbrecht, Edermünde
 Brand, Wertheim
 ABI, Foster City, CA, USA
 ABI, Foster City, CA, USA
 Corning, New York, USA
 Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
 Eppendorf, Hamburg
 Dr. Kleef, Bonn
 Biozym, Hess. Oldendorf
 Kodak, Stuttgart
 Linde, München
 Greiner, Frickenhausen
 Schleicher & Schüll, Dassel
 NUNC, Wiesbaden
 NUNC, Wiesbaden

3) Geräte

3.1) Zentrifugen

Eppendorfszentrifuge (5415D)
 Tischzentrifuge (Z 200 M/H)
 Kühlzentrifuge (Z 233 MK)

Eppendorf, Hamburg
 Hermle, Wehingen
 Hermle, Wehingen

3.2) PCR Maschinen

Gene Amp 2400
 PTC-200

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
 MJ-Research, Waltham, MA, USA

ABI PRISM 7700
Sequence Detection System

Applied Biosystems, Foster City, CA,
USA

3.3) weitere Geräte

Blotting System Mini-V 8-10
Fluoreszenzmikroskop
Kryostat
Laser Capture Mikrodissektionsgerät PixCell II
Multiphor II System (SSCP)
Phosphorimager (FLA-3000)
Spektrophotometer Ultrospec 2000

Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Zeiss, Jena
Leica Microsystems, Nussloch
Arcturus, Mountain View, CA, USA
Pharmacia Biotech, Freiburg
FUJI, Kanagaba, Japan
Pharmacia Biotech, Freiburg

4) Medien, Puffer und Lösungen

4.1) Medien und Puffer für Zellkulturen

Penicillin/Streptomycin
(10000 U/ml – 10000 µg/ml)
G418 Lösung (50 mM)
ZeocinTM
Fötale Kälberserum(FCS)
L-Glutaminsäure (200 mM)
Ponasterone A
RPMI 1640 Medium
Trypsin-EDTA (1x)

GibcoBRL/Life Technologies, Karlsruhe

PAA Laboratories, Linz
Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Biochrom KG, Berlin
Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe
Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Biochrom KG, Berlin
Gibco BRL/Life Technologies, Karlsruhe

PBS
(Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

140 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄
1 mM KH₂PO₄
1 mM MgCl₂
1 mM CaCl₂
PBS ohne MgCl₂ und CaCl₂

PBS-d

4.2) Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Ladepuffer

100 mM EDTA (pH 7,5)
1 % SDS
50 % Glycerin
500 µl Bromphenolblau-Lösung
2 % FCS
2 % BSA
0,2 % Fischgelatine
in 1x PBS gelöst
1 Spatelspitze Bromphenolblau
in 10 ml Wasser lösen
eine Tablette in 10ml TBS-Puffer lösen

Blocking-Lösung
(Immunfluoreszenz)

Bromphenolblau-Lösung

DAB-Lösung

DNase I-10x Puffer	100 mM Tris pH 7,5 25 mM MgCl ₂ 5 mM CaCl ₂
5x First Strand Buffer (GibcoBRL/Life Technologies)	250 mM Tris-HCl (pH 8.3) 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂
GITC-Puffer (RNA-Isolierung)	5,25 M Guanidiniumisothiocyanat 50 mM Tris-HCl pH 6,4 20 mM EDTA 1 % Triton X-100
(Prä-)Hybridisierungslösung für 8 Arrays	40 ml Express Hyb Lösung (Clontech) 240 µl Salmon testes DNA 40 µl Cot I DNA
LB ⁽⁺⁾ -Medium (pH 7,5) für einen Liter	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 10 ml 1M MgSO ₄ -Lösung
LB-Platten Low Salt LB (pH 7,5) für einen Liter	15 g Agar in 1 L LB-Medium 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar
Lösung A (SSCP-Analyse)	100 ml Ethanol absolut 5 ml 96% Essigsäure mit H ₂ O auf 1 L auffüllen
Lösung B, 10x (SSCP-Analyse)	5 g AgNO ₃ in 500 ml H ₂ O
Lösung C (SSCP-Analyse)	4,5 g NaOH 0,03 g NaBH ₄ 1,2 ml Formaldehyd mit H ₂ O auf 300 ml auffüllen
Lösung D, 10x (SSCP-Analyse)	37,5 g Na ₂ CO ₃ in 500 ml H ₂ O
Natriumacetat pH 4.6 (für RNA)	2 Mol/l Natriumacetat
Natriumacetat pH 5.2 (für DNA)	3 Mol/l Natriumacetat
Natriumphosphatpuffer (1 M; pH 6,5)	103,5 g NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O 29,25 g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O auf 1 L mit Wasser auffüllen
PBS-T (pH 7,5)	80 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM NaCl 0,1 % Tween 20
PCR Puffer (10x)	100 mM Tris-HCL pH 9,0 1 % Triton X-100
Ponceau S	200 mM Tris-HCl pH 8,4 200 mM KCl 0,1 % Ponceau S
Proteinase K-Puffer	5 % Essigsäure 10 mM Tris-HCl pH 7,8 5 mM EDTA 0,5 % SDS

RIPA-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1 % TritonX 100 1 % SDS 5 mM EDTA
RT-Puffer (5x, Gibco BRL)	250 mM Tris-HCl pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 5 % SDS (w/v) 20 % Glycerin 200 mM DTT in 10 mM Natriumphosphatpuffer
2x SDS-Ladepuffer (Western Blot)	0,5 ml Ladepuffer
SOC-Medium	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
SSC	0,15 M NaCl 0,015 M Na-Citrat
STET-Puffer	1 M Tris-HCl pH 8.0 250 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 8 % Saccharose
Reinigungslösung („Stripping“ Puffer) (pH 2,5; Western Blot)	0,2 M Glycin 0,5 M NaCl
TE (pH 7,5)	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
TBE (10x, pH 7,5)	0,25 M EDTA 0,7 M Borsäure 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
TBS (1x, pH 7,4) für einen Liter	8 g NaCl 0,2 g KCl 3 g Tris
TNE	10 mM Tris-HCl (pH 8) 10 mM NaCl 0,1 mM EDTA
Waschlösung I für Arrays	2 x SSC 1 % SDS
Waschlösung II für Arrays	0,5x SSC 1 % SDS
Western Blot Laufpuffer	1x Transferpuffer 1 % SDS
Western Blot Transfer-Puffer (10x)	250 mM Tris-Base 1,9 M Glycin 5 g NaCl 10 g Hefeextrakt 16 g Trypton
2x YT-Medium (pH 7) für einen Liter	

5) gefrorene Prostatatumoren

Tumor-Nummer	Alter des Patienten	Stadium des Tumors	Gleason-Grad	Operationsmethode
P 16	78y	T 3-4	G 2	tur
P 27	56y	T 2	G 2	aut
P 53	?	?	?	?
P129	52y	T2	G2	lap
P306	62y	T3	G3	lap

Tur = Transurethrale Resektion der Prostata; lap = Laparatomie mit radikaler Prostatektomie; aut = Autopsie

6) Zellen

LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate; siehe Einleitung)

7) Primer

(die Primer waren entweder in den verwendeten Kits enthalten oder wurden von der Firma MWG bestellt)

Sequenzierung des PTEN-Vektors:

pIND-MCS-Fwd: 5'-GAG AAA GAA GAA CTC ACA CAC AGC-3'
Schmelztemperatur 61,0°C

pIND-BGH-Rev: 5'-CAA CTA GAA GGC ACA GTC GAG G-3'
Schmelztemperatur 62,1°C

pIND-SP1: 5'-GTT TAG CTT GTT CAG CTG CG-3'
Schmelztemperatur 57,3 °C

PTEN Ex9 cDNA Rev: 5'-AAG TTG AAC TGC TAG CCT CTG-3'
Schmelztemperatur 57,9°C

Amplifikation der in LNCaP-Zellen mutierten Region von PTEN:

PTEN Ex1 WT: 5'-CCA GAC ATG ACA GCC ATC ATC AAA-3'
Schmelztemperatur 61,0°C

PTEN Ex1 Mut: 5'-CCC AGA CAT GAC AGC CAT CAT CAG-3'
Schmelztemperatur 64,4°C

PTEN Ex4 Rev: 5'-CGG TGT CAT AAT GTC TTT CAG CAC-3'
Schmelztemperatur 61,0°C

Flag-Primer Fwd: 5'-ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT G-3'
Schmelztemperatur 60,3°C

genomische Primer PTEN:

PTEN Ex1 Fwd: 5'-CCA TGT GGA AGT TAC CTT TTA-3'

Schmelztemperatur 64,2°C

PTEN Ex1 Rev: 5'-ACT ACG GAC ATT TTC GCA TC-3'

Schmelztemperatur 55,3°C

GAPDH-Primer:

GAPDH RT 5' (Ralph): 5'-GTT CCA ATA TGA TTC CAC CCA TG-3'

Schmelztemperatur

GAPDH RT 3' (Ralph): 5'-TCA GGT CCA CCA CTG ACA CGT TG-3'

Schmelztemperatur

G3PDH 5' (Clontech): 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'

Schmelztemperatur 59,4°C

G3PDH 3' (Clontech): 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

Schmelztemperatur 59,4°C

Primer für Smart und LD-PCR:

SMART II Oligonucleotide (Clontech/MWG): 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA
GTA CGC GGG-3'

cDNA Synthesis (CDS) Primer (Clontech/MWG): 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC
AGA GTA CT₍₃₀₎N₋₁N-3'

(N=A, C, G, T; N₋₁=A, G, C)

LD-PCR Primer (Clontech/MWG): 5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT-3'

Primer für RT-PCR zum Verifizieren der Array-Ergebnisse:

E2F1 Fwd. : 5'-GGG TCT GGC TAC CGC TAG GAG G-3'

Schmelztemperatur 67,7 °C

E2F1 Rev. : 5'-GAA GTG CTC TCA CCG TCC TAC ACG-3'

Schmelztemperatur 66,1 °C

Siah2 Fwd. : 5'-TTT GCC TAC AGA CTG GAG TTG AAT GG-3'

Schmelztemperatur 63,2 °C

Siah2 Rev. : 5'-ACG GAA GTC ACA TCA TGG ACA ACA TG-3'

Schmelztemperatur 63,2 °C

Survivin Fwd. : 5'-AGA AAG TGC GCC GTG CCA TCG AGC-3'

Schmelztemperatur 67,8 °C

Survivin Rev. : 5'-CAC TGT TAC CAG CAG CAC CCG CTG-3'
Schmelztemperatur 67,8 °C

Desmocollin Fwd. : 5'-AAA TTG CAG AGT GGG CAC TAC TGT GG-3'
Schmelztemperatur 64,8 °C

Desmocollin Rev. : 5'-AGT ACG AGT AAA TGT TGG CAA GTG GTC-3'
Schmelztemperatur 63,4 °C

LR11 Fwd. : 5'-AAG GCC AAA GCC ATC AAC CAG ACT G-3'
Schmelztemperatur 64,6 °C

LR11 Rev. : 5'-CTA CAC GGA CCA GAA ACA AAT ACT GC-3'
Schmelztemperatur 63,2 °C

TLK1 Fwd. : 5'-GAT TAC GCC TCG GGC ACT TTA CAA C-3'
Schmelztemperatur 64,6 °C

TLK1 Rev. : 5'-TCC TGT TCA TGA TAT TCT GCC AAA GTC-3'
Schmelztemperatur 61,9 °C

8) Software:

Aida Image Analyzer
Array-Auswertung

BASreader (Phosphorimager)
Excel Tabellenkalkulation
Photoshop Bildbearbeitung
Word Textverarbeitung

Raytest, Straubenhardt
M. Beier (Institut für Humangenetik,
Universität Düsseldorf)
Raytest, Straubenhardt
Microsoft
Adobe
Microsoft

III. Methoden

1) Arbeiten mit Bakterien

1.1) Vermehrung der Vektoren durch Transformation/Minipräparation

Um ausreichende Mengen der Vektoren für die Transfektion von LNCaP-Zellen zur Verfügung zu haben, wurden diese zunächst in Bakterien transformiert und vermehrt. Dazu wurde ein TA Cloning Kit (Invitrogen) benutzt. Die Top 10 F'-Bakterien (50 µl) wurden aufgetaut, 2 µl β-Mercaptoethanol (0,5 M) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden etwa 50 ng eines Konstruktes zugesetzt, wiederum vorsichtig gemischt und der Reaktionsansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die eigentliche Aufnahme des Konstruktes wurde durch einen Hitzeschock von 90 Sekunden im 42°C warmen Wasserbad herbeigeführt. Nach der Zugabe von 450 µl SOC-Medium (Raumtemperatur) wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C und 225 rpm im Schüttler inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt begann die Expression der in den Vektoren vorhandenen Ampicillin- bzw. Zeocin-Resistenz. Nun konnten je 50 µl bzw. 100 µl der Suspension auf Antibiotika-haltigen LB-Platten ausgestrichen werden, so dass während einer Inkubation über Nacht bei 37°C resistente Kolonien heranwuchsen.

Am nächsten Tag wurden von den Platten einzelne Kolonien gepickt und in 1,5 ml 2x YT-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Die Bakterien wuchsen über Nacht heran, so dass sich am folgenden Tag die Plasmide isolieren ließen. Dazu wurde die Kultur in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und 30 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurde das Medium komplett entfernt und das Sediment in 0,5 ml STET-Puffer und 40 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) resuspendiert. Anschließend wurden die Gefäße 90 Sekunden in kochendes Wasser getaucht. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten und 13.000 g wurde der Überstand abgenommen und durch Zugabe von 40 µl 3 M NaOAc und 0,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert. Anschließend ließen sich die Plasmide durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 13.000 g aussedimentieren. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl RNase A-Lösung (333 ng/ µl) aufgenommen.

1.2) Restriktionsanalyse zur Kontrolle der Plasmide

Um zu kontrollieren, ob nach der oben beschriebenen Vermehrung der Plasmide auch tatsächlich das richtige Plasmid vorlag, wurde jeweils eine Probe aus der Plasmid-Lösung mit einem Restriktionsenzym behandelt. Aus dem induzierbaren Konstrukt wurde dazu das klonierte Gen mit Hilfe von Hind III und Xba I wieder ausgeschnitten (Plasmid: 5 kb, Insert:

1,3 kb). PVgRXX wurde mit Hilfe von Hind III untersucht, das innerhalb dieses Vektors zwei Schnittstellen besitzt und ihn in ein großes Fragment (8,47 kb) und ein kleines Fragment (339 bp) teilt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen: 1 µl Y⁺/Tango-Puffer, 1 µl Plasmidlösung, 0,5 µl Hind III (10 U/µl), 0,5 µl Xba I (10 U/µl) und 7 µl Wasser. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ladepuffer gestoppt und auf einem 1 %-Agarosegel überprüft.

Ebenso wurde auch das induzierbare Konstrukt pIND (SP1)-Flag/*PTEN* überprüft. Dazu wurden jeweils 0,5 µl der Enzyme BssH II, Bgl II und Sca I (alle 10 U/ µl) verwendet. Der übrige Reaktionsansatz bestand aus 1 µl Y⁺/Tango-Puffer, 1 µl Plasmidlösung und 6,5 µl Wasser. Die Inkubation im Wasserbad und die Kontrolle auf einem Agarosegel wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Fragmentgrößen sind im Ergebnisteil (IV., Abschnitt 3) dargestellt.

2) Zellkultur

2.1) Kultivierung der Prostatakrebszelllinie LNCaP

Alle für die Kultivierung von LNCaP-Zellen notwendigen Lösungen wurden bei 4°C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Fallstrom-Sterilbank durchgeführt.

Die adhärent wachsende Prostatakrebszelllinie LNCaP wurde in 20 bis 30 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM Glutaminsäure und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin in Gewebekulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 oder 175 cm² gehalten. Die Zellen wuchsen bei 37°C zu konfluenten Einzelschichten heran und wurden anschließend passagiert. Dazu wurde das Medium abgegossen, die Zellen wurden zweimal mit sterilem PBS-d gewaschen und mit Hilfe von 1 ml bis 2 ml Trypsinlösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Da sich LNCaP-Zellen nur langsam vermehren, betrug die Verdünnung nur 1:3.

Ein Vorrat an Zellen wurde eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurde eine große Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² mit Trypsin behandelt und die Zellen wurden in einem Falconröhrchen mit 5 ml Medium ohne Antibiotika aufgenommen. Die Zellen wurden bei 1.200 g zentrifugiert und das Sediment in 1 ml Gefriermedium (RPMI 1640 mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen abgefüllt und zunächst ca. eine Stunde auf Eis

abgekühlt. Danach wurden die Röhrchen über Nacht auf -20°C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2) Transfektion von Zellen

Um die Auswirkung der Expression von exogenem *PTEN* auf die Genexpression bei LNCaP zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem induzierbaren Vektor pIND (SP1) von Invitrogen transfiziert (No et al., 1996). Dieser Vektor enthielt die Flag-gekoppelte *PTEN*-cDNA. Im Falle der Negativkontrolle enthielt er keine humane cDNA. Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem Vektor pVgRXR transfiziert, der für die Induktion von pIND (SP1) mit Hilfe des Hormons Ecdyson notwendig ist. Der *PTEN*-haltige Vektor wurde von Professor K. Yamada (Davies et al., 1998) zur Verfügung gestellt.

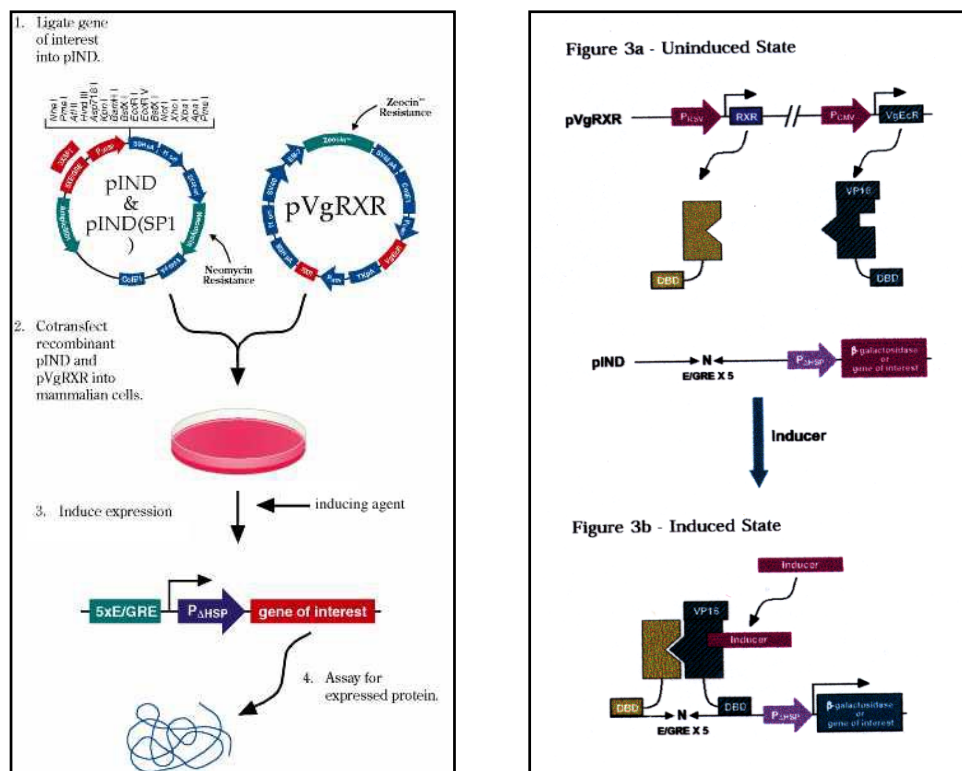


Abbildung III.1: Prinzip des durch Ecdyson induzierbaren Systems (entnommen aus www.invitrogen.com; Handbuch „Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System“)

Bei dem pIND-Vektor handelt es sich, wie bereits erwähnt, um einen induzierbaren Vektor. Er wird zusammen mit dem pVgRXR-Vektor in die Zellen transfiziert. Beide Vektoren und ihre Funktionsweise sind in Abbildung III.1 dargestellt. PVgRXR exprimiert kontinuierlich den Ecdyson-Rezeptor (VgEcR) und den Retinoid X Rezeptor (RXR). Bei VgEcR handelt es sich um einen modifizierten Rezeptor aus Drosophila. Er erkennt und bindet eine bestimmte Region des Glucocorticoid-Response-Elements (E/GRE) auf dem pIND (SP1)-Vektor. RXR

ist bei Säugern der homologe Rezeptor zu USP (ultraspiracle), dem natürlichen Partner des Ecdyson-Rezeptors bei Drosophila. Er erkennt eine andere Region von E/GRE. In eukaryontischen Zellen kommt es normalerweise nicht zur Dimerbildung der beiden Rezeptoren. In Anwesenheit des Ecdyson-Analogs Ponasteron A jedoch bildet sich über eine Bindestelle ein synthetisches Hybrid, das an das Glucocorticoid-Response-Element (E/GRE) bindet und die Expression des in die Multiple Cloning Site klonierten Gens induziert.

Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine (LF) 2000 von Gibco. Dabei handelt es sich um eine Kombination mehrerer neutraler und kationischer Lipide, die mit dem zu transfizierenden Vektor Liposomen/DNA-Komplexe bilden. Für die Transfektion von Zellen in einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser wurden 28 µl LF2000 mit 1,4 ml RPMI-Medium ohne Zusätze gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In weitere 1,4 ml Medium wurden 28 µg Vektor, also 14 µg pIND (SP1) und 14 µg pVgRXR, gegeben, und beide Lösungen wurden miteinander gemischt. Um eine Komplexbildung zwischen DNA und LF2000 zu erlauben, erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Schließlich wurde die Vektor/LF2000-Lösung mit 10 ml Medium mit FCS und Glutaminsäure auf die Zellen gegeben, und diese 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden die Kulturen anschließend aufgeteilt, und weitere 24 Stunden später begann durch die Zugabe der Antibiotika G418 und Zeocin die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen. Zunächst wurde untersucht, welche Antibiotikakonzentration sich für die Selektion am besten eignete. Dazu wurden die Antibiotika in Konzentrationen von jeweils 250 mg/ml, 125 mg/ml und 62,5 mg/ml eingesetzt und die Zellen über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet. Während bei 250 mg/ml bereits nach fünf Tagen fast alle Zellen abgestorben waren, zeigte eine Konzentration von 62,5 mg/ml nur wenig Einfluss auf die Zellen. Die Selektion mit jeweils 125 mg/ml pro Antibiotikum ergab einzelne Kolonien von transfizierten Zellen, so dass diese Konzentration bei allen folgenden Experimenten verwendet wurde. Nach etwa drei Wochen war eine Selektion der transfizierten Zellen abgeschlossen, und die Zellen konnten weiter verarbeitet werden.

2.3) 5-Azacytidinbehandlung von Zellen

Wenn ein Gen durch die Methylierung seines Promotors inaktiviert ist, kann die Transkription dieses Gens durch Behandlung der Zellen mit 5-Azacytidin reaktiviert werden (Sorm et al., 1964; Ginder et al., 1983). Diese Behandlung wurde bei den transfizierten LNCaP-Zellen durchgeführt. Dazu wurde der Inhalt eines Röhrchens 5-Azacytidine 50x Hybri-Max® in

10 ml Zellkulturmedium gelöst und diese Lösung in Aliquots von jeweils 1 ml aufgeteilt. Ein Aliquot ergab in 50 ml Medium/FCS/Glutamin eine Endkonzentration von 10 μ M. Die transfizierten Zellen wurden 96 h damit inkubiert, bevor sie in weiteren Experimenten eingesetzt wurden. Die übrigen Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

2.4) Induktion der transfizierten Zellen

Um die Expression des Flag-*PTEN*-Konstruktes zu induzieren, wurde das Hormon Ponasteron A, das zu den Ecdysonen gehört, in 100 % Ethanol gelöst und in einer Endkonzentration von 5 μ M zum Medium der Zellen gegeben. 20 bis 24 Stunden nach der Zugabe konnten die Zellen geerntet und die RNA isoliert werden.

2.5) β -Gal- und GFP-Assay

Um zu untersuchen, ob die Induktion des Flag-*PTEN*-Konstruktes erfolgreich verlief und der Transaktivator (VgEcR/RXR) aktiv war, wurde ein β -Gal- und GFP-Assay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zusätzlich mit einem pIND (SP1)-Vektor transfiziert, der das β -Galactosidase-Gen enthielt, sowie mit einem Konstrukt, das kontinuierlich das Green Fluorescence Protein (GFP) exprimierte. Anschließend wurde die Expression von pIND (SP1) induziert und das Vorhandensein von β -Galactosidase mit Hilfe des β -Gal Staining Assays von Invitrogen nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläschen oder direkt auf einem Objektträger gezüchtet, mit PBS gewaschen und mit einer formaldehydhaltigen Fixierlösung (im Kit enthalten) 10 Minuten fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte der β -Galactosidase-Nachweis entsprechend der Anleitung durch eine Färbelösung der folgenden Zusammensetzung: 11,4 ml PBS, 625 μ l X-Gal-Lösung (20 mg/ml in Dimethylformamid) und jeweils 125 μ l Lösung 1, 2 und 3 (die Zusammensetzung dieser Lösungen wurde vom Hersteller nicht angegeben). Diese Färbelösung wurde auf die Zellen gegeben, und diese wurden 0,5 bis 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zellen, in denen β -Galactosidase exprimiert wurde, erschienen im Lichtmikroskop leuchtend blau. Schließlich wurden die Zellen mit Fluoreszenzmedium von DAKO eingedeckelt und die Expression von GFP mit dem Licht einer Quecksilberlampe mit einer Wellenlänge von 475 nm sichtbar gemacht. Beide Expressionsraten konnten anschließend verglichen werden.

3) Immunologische Methoden

3.1) Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH)

Die für diese Untersuchung notwendigen *PTEN*- und Telomer-Sonden wurden von Frau B. Leube zur Verfügung gestellt. Während die direkt markierte *PTEN*-Sonde von der Firma ONCOR erworben wurde, waren die Telomer-Sonden mit Hilfe von PACs selbst hergestellt und wurden über einen Anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert. Die Präparierung der Chromosomen aus LNCaP-Zellen wurde in der diagnostischen Abteilung des Instituts durchgeführt.

Als Vorbereitung für die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung wurden zunächst „Super Frost“-Objektträger in eisgekühltem Methanol (-20°C) eingelegt. Nach mehreren Stunden wurden sie entnommen, getrocknet, und das Chromosomen-Sediment wurde aufgetropft. Es folgten ein Trockenschritt von 24 Stunden bei Raumtemperatur und das Entwässern des Präparates in 70 % eisgekühltem Ethanol über Nacht. Nach anschließendem Trocknen konnte mit der eigentlichen Hybridisierung begonnen werden.

Dazu wurden 150 bis 200 µl frische Denaturierungslösung bestehend aus 70 % Formamid und 2x SSC auf die Chromosomen aufgetropft und der Objektträger mit einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt. Nach einer Inkubation von 3 Minuten bei 72°C wurde das Deckgläschen entfernt, der Objektträger mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Gleichzeitig wurden 10 µl eines Sondengemisches (z. B. 5 µl *PTEN*-Sonde und 5 µl einer Telomersonde) 5 Minuten bei 72°C denaturiert und nach dem Trocknen auf die fixierten Chromosomen aufgetragen. Der Objektträger musste wiederum mit einem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt und diesmal mit Fixogum abgedichtet werden. Nach einem Denaturierungsschritt von 90 Sekunden bei 72°C im Wasserbad fand die Hybridisierung über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer statt. Anschließend wurden die Objektträger dreimal 5 Minuten bei 37°C in 2x SSC / 0,2 % Tween und dreimal 5 Minuten bei 42°C in 0,05x SSC gewaschen, mit 200 – 300 µl „Blocking Reagent 6“ (Boehringer) betropft, mit einem Deckglas bedeckt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit 1 µl Anti-Digoxigenin-Antikörper in 100 µl Blocking Reagent mit 0,2 µl Avidin-Cy3 von ca. 60 Minuten Dauer bei 37°C im Wasserbad, um die Telomersonde zu detektieren. Nachdem der Objektträger dreimal in 2x SSC/0,2 % Tween gewaschen worden war, wurde mit 500 µl DAPI-Lösung gegengefärbt. Dazu wurde der Objektträger ohne Deckglas drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mehrmals kurz in Wasser gewaschen. Um das Trocknen zu beschleunigen, wurde der Objektträger geschwenkt, anschließend mit Antifade (ONCOR) eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Für die direkt markierte *PTEN*-

Sonde war keine Detektion mit einem Antikörper notwendig. Hier wurde der Objektträger nach der Hybridisierung der Sonde 2 Minuten bei 72°C mit 0,4x SSC gewaschen, 2 Minuten mit 500 µl PBD (phosphate buffered detergent) inkubiert und nochmals kurz mit 2x SSC gewaschen. Gegenfärbung und Eindeckeln erfolgten wie oben beschrieben.

3.2) Immunfluoreszenz

Um die Expression von exogenem PTEN in transfizierten LNCaP-Zellen nachzuweisen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Dazu wuchsen die LNCaP-Zellen auf Objektträgern. 24 Stunden nach der Induktion durch Ponasteron A wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden gründlich mit PBS gewaschen. Danach mussten die Objektträger mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur trocknen. Anschließend konnten sie bei -20°C aufbewahrt werden. Vor der eigentlichen Immunfluoreszenz wurden die Zellen 10 Minuten bei -20°C in Aceton fixiert, kurz in PBS rehydriert und die unspezifischen Bindungen durch Inkubation in Blocking-Lösung (2 % FCS, 2 % BSA, 0,2 % Fischgelatine in 1x PBS) 30 Minuten abgesättigt. Nach kurzem Waschen in PBS wurde der primäre Antikörper (Anti-Flag oder Anti-PTEN) im Verhältnis 1:50, 1:100 und 1:500 in Blocking-Lösung verdünnt und 200 µl der Lösung eine Stunde lang auf die Zellen gegeben. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen anschließend 30 Minuten in einer 1:40- bzw. einer 1:100-Verdünnung des sekundären, FITC-markierten Antikörpers inkubiert. Nachdem die Objektträger nochmals in PBS gewaschen, leicht getrocknet und mit Fluoreszenzmedium (DAKO) eingedeckelt worden waren, konnten sie unter dem Fluoreszenzmikroskop (Wellenlänge 490 nm) ausgewertet werden.

3.3) Immunhistochemie auf Gefrierschnitten für die Mikrodissektion

Für die Untersuchung der Prostatatumoren wurden zunächst mit einem Kryostat der Firma Leica ca. 10 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Jeweils zwei Gefrierschnitte wurden auf einen RNase-freien Objektträger gezogen, der zuvor mehrere Stunden in Formaldehyd eingelegt und anschließend vier Stunden über 200 °C erhitzt worden war. Jeweils zwei Objektträger mit Gefrierschnitten wurden in ein 50 ml Falconröhrchen gesteckt und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Während der gesamten Herstellung der Gefrierschnitte wurden Gewebelöcke und Schnitte ausschließlich auf Trockeneis gelagert und transportiert.

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung von Gefrierschnitten wurden diese direkt aus dem -80°C-Schrank in ein Falconröhrchen mit Aceton überführt und dort zwei Minuten fixiert. Danach trockneten die Schnitte innerhalb weniger Sekunden bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden sie 10 Sekunden in TBS (pH 7,4) gespült, ebenso nach jedem weiteren in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeitsschritt (Ausnahme: Alkoholreihe). Alle für die Immunhistochemie verwendeten Agenzien stammten von der Firma DAKO und wurden direkt vor dem Gebrauch mit 2 µl RNase-Inhibitor pro 100 µl Lösung versetzt. Zunächst wurden die Gefrierschnitte jeweils 5 Minuten mit drei Tropfen einer Lösung zum Inhibieren der Endogenen Peroxidasen (enthält Wasserstoffperoxid und 15 mM Natriumazid) bzw. zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen (0,25 % Casein, Trägerprotein und 15 mM Natriumazid in PBS) inkubiert. Dadurch sollte der unspezifische Hintergrund auf ein Minimum reduziert werden. Danach wurden 150 µl einer 1:75-Verdünnung des primären Antikörpers Anti-PTEN (ZYMED Laboratories Inc.; Konzentration der Stammlösung 2 µg/µl) in Antikörper-Verdünnungsmedium auf die Schnitte gegeben und 8 Minuten inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper und schließlich mit DAB-Lösung (1 mg/ml in Tris-Puffer mit 0,02 % Wasserstoffperoxid) ebenfalls 8 Minuten lang. Anschließend wurde die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (10 Sekunden) durchgeführt. Da die Gefrierschnitte für die Mikrodissektion nur verwendet werden konnten, wenn sie kein Wasser mehr enthielten, wurden sie in einer Alkoholreihe entwässert. Dabei wurden sie der Reihe nach 2 Minuten in 70 % Ethanol, 2 Minuten in 95 % Ethanol, 3 Minuten in 100 % Ethanol und 3 Minuten in 100 % Xylol getaucht. Nachdem die Schnitte einige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet waren, konnten sie für die Mikrodissektion verwendet werden.

3.4) Immuncytochemie

Die Vorbereitung der transfizierten LNCaP-Zellen erfolgte bis einschließlich zur Fixierung der Zellen in Aceton genau so, wie es in Abschnitt 3.2 für die Immunfluoreszenz beschrieben wurde. Für die eigentliche Immuncytochemie wurden die gleichen Lösungen und Antikörper benutzt wie für die Immunhistochemie. Auf die Zugabe von RNase-Inhibitor wurde allerdings verzichtet. Die Antikörper (Anti-PTEN, Zymed; Anti-AKT-P, Cell Signalling) wurden in Verdünnungen von 1:75 und 1:100 eingesetzt. Die Inkubationszeiten entsprachen denen der Immunhistochemie. Lediglich die Zeit zum Blockieren der endogenen Peroxidasen und zum Absättigen der unspezifischen Bindungen wurde auf 15 Minuten ausgedehnt. Nach der Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Objektträger für wenige Minuten getrocknet und anschließend mit zwei Tropfen Eindeckmedium (Immu-Mount, Shandon) und einem großen Deckglas eingedeckelt.

3.5) Western Blot

24 Stunden nach Induktion der transfizierten LNCaP-Zellen wurde aus den Zellen Protein für eine Western Blot-Untersuchung gewonnen. Dazu wurde das Medium von den adhären wachsenden Zellen abgegossen und die Zellen gründlich mit PBS-d gewaschen. Anschließend ließen sie sich durch Zugabe von 250 µl RIPA-Buffer lysieren und mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche lösen. Das Lysat wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, 5 Minuten bei 95°C erhitzt und mit einer Spritze homogenisiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 8000 g und Raumtemperatur wurde der proteinhaltige Überstand in ein frisches Gefäß überführt.

Um die Proteinkonzentration der Proben festzustellen, musste zunächst eine Kalibrierkurve nach Bradford hergestellt werden. Dazu wurde Bradford-Reagenz gefiltert und 200 µl mit je 800 µl einer definierten Proteinlösung vermischt, die zuvor durch Verdünnen der Stammlösung von Biorad (1,56 µg/µl) hergestellt worden war. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde im Spektrophotometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm festgestellt. Auf diese Weise wurden zwischen vier und sechs Proteinkonzentrationen zwischen 1 µg/ml und 25 µg/ml vermessen. Mit Hilfe der sich aus diesen Punkten ergebenden Kalibrierkurve wurden die Konzentrationen der Probelösungen bestimmt, nachdem die Extinktionen ebenfalls nach der Methode von Bradford ermittelt worden waren. Anschließend wurden die Proteinlösungen mit einem Volumen Ladepuffer (5 % SDS, 200 mM DTT, 20 % Glycerin, 0,5 ml konz. Bromphenolblau-Lösung in 10 mM Natriumphosphatpuffer) versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein 10 % Tris-HCl-Polyacrylamid Mini-Gel aufgetragen. Pro Spur wurden dabei 20 µg Protein verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laufpuffer (1 % SDS, 250 mM Tris, 1,9 M Glycin) zunächst 20 Minuten bei 60V, danach bei 100V so lange, bis die Front des Bromphenolblau-Markers das untere Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurden die Proteine mit einem Blotting-System von Biorad auf eine Protran-Membran geblottet (100V für 2 bis 3 Stunden auf Eis) und der Transfer durch fünfminütiges Färben der Membran mit Ponceau S-Lösung überprüft.

Vor der Inkubation mit Antikörpern wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt, indem die Membran mindestens eine Stunde in 5 % Magermilchpulver in PBS-T geschüttelt wurde. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C (Anti-PTEN, Anti-AKT-P) oder eine Stunde lang bei Raumtemperatur (Anti-Flag, Anti- α -Tubulin). Die verwendete Konzentration war je nach Antikörper unterschiedlich: Anti-PTEN 1:50, 1:100, 1:250, Anti-AKT-P 1:500, Anti-Flag 1:100, 1:500, 1:1000, Anti- α -Tubulin

1:200, 1:500. Verdünnt wurden die primären Antikörper in 5 % Magermilchpulver/PBS-T. Um die nicht gebundenen Antikörper möglichst sorgfältig zu entfernen, wurde die Membran zunächst kurz mit PBS-T gespült. Es folgten zwei Waschschrte von 15 und 10 Minuten mit PBS-T auf dem Schüttler. Der sekundäre Antikörper wurde 1:5000 in PBS-T verdünnt und die Membran eine Stunde in dieser Lösung inkubiert. Die Membran wurde wie oben beschrieben gewaschen. Anschließend konnte der sekundäre Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits detektiert werden. Dazu wurden jeweils 2 bis 3 ml (je nach Größe der Membran) der beiden ECL-Detektionslösungen vermischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde die Lösung abgegossen, die verbliebene Flüssigkeit am unteren Ende der Membran abgetupft und die Membran in eine Klarsichtfolie gewickelt und in eine Kassette gelegt. Nun wurde für unterschiedlich lange Zeiten (1 Minute, 5 Minuten, 60 Minuten) ein Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak) auf die Membran gelegt und anschließend entwickelt, bis die spezifischen Protein-Banden optimal detektierbar waren.

Um die Membran weitere Male verwenden zu können, wurde sie zunächst kurz mit PBS-T gespült und dann zweimal 10 Minuten in PBS-T gewaschen. Die gebundenen Antikörper ließen sich durch die fünfminütige Behandlung mit einer Reinigungslösung („Stripping“ Puffer) entfernen. Es folgte ein Waschschrte von 15 Minuten, dann konnte die Membran erneut mit 5 % Magermilchpulver/PBS-T abgesättigt werden. Eine Membran konnte insgesamt dreimal verwendet werden.

4) Laser Capture Mikrodissektion

Um die Expressionsmuster von PTEN-positiven und PTEN-negativen Prostata-Tumorzellen verlässlich untersuchen zu können, bedarf es einer Methode, mit der man aus einem Gefrierschnitt ganz gezielt einzelne Zellen oder Tumor-Drüsen isolieren kann. Nur so lässt sich eine Verfälschung der Ergebnisse durch normale Zellen oder durch Kontamination von PTEN-negativen Zellen durch PTEN-positive Zellen (oder umgekehrt) verhindern.

Als Lösung dieses Problems bietet sich die Laser Capture Mikrodissektion an. Das in dieser Arbeit angewendete Gerät wurde am National Institute of Health (USA) entwickelt (Emmert-Buck et al., 1996; Bonner et al., 1997) und wird von der Firma Arcturus Engineering aus Kalifornien vertrieben. Bei der Mikrodissektion wird auf einen Gewebeschnitt ein transparenter steriler Plastikfilm (sogenannter Transfer-Film) gelegt und das ganze unter einem Mikroskop betrachtet. Der Transfer-Film besteht aus dem thermoplastischen Material Ethylen-Vinyl-Acetat. Die zu untersuchenden Zellen werden nun gezielt mit einem Infrarot-Laser „beschossen“. Es kommt wenige Millisekunden lang zu einer Erwärmung bis 90°C, und

der Film schmilzt. Dabei verkleben die Zellen mit dem Film und lassen sich anschließend aus dem Gewebeschnitt herauslösen, wenn der Film angehoben wird (Abb. III.2). Die Energie des Lasers ist so gering ($< 50 \text{ mW}$), dass DNA, RNA und Proteine in den Zellen keinen Schaden nehmen. Außerdem bleibt die Morphologie der Zellen erhalten. Je nach Größe der zu mikrodissektierenden Region lassen sich für den Laser drei verschiedene Einstellungen wählen.

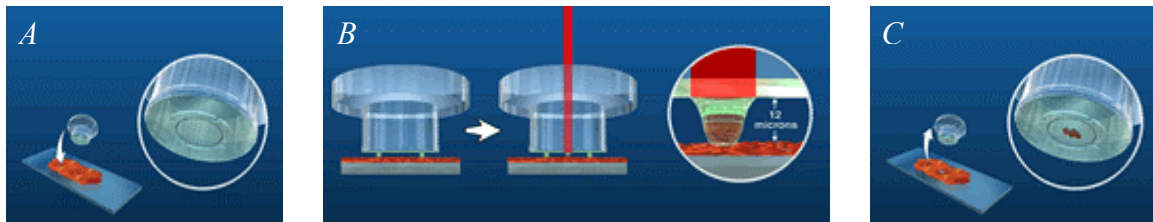


Abbildung III.2: A: Aufsetzen des Caps auf den Gefrierschnitt, B: Die Energie des Laser führt dazu, dass der Transfer-Film mit den darunter befindlichen Zellen verschmilzt, C: Abheben der Zellen auf dem Cap.

Zur Vorbereitung für die Mikrodissektion müssen die Schnitte nach der Färbung oder immunhistochemischen Behandlung anhand der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Alkoholreihe gut entwässert werden. Nach der Mikrodissektion können die „Caps“, auf denen der Transfer-Film aufgezo-gen ist, auf ein 0,5 ml Eppendorfgefäß mit Lysepuffer aufgesteckt werden, und das ganze lässt sich auf den Kopf stellen. Der Lysepuffer löst die mikrodissektierten Zellen wieder von der Folie, und RNA oder DNA können isoliert werden.

5) Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

5.1) RNA-Isolierung aus mikrodissektierten Tumorzellen

Zur Isolierung von RNA aus mikrodissektierten Tumorzellen wurden zunächst verschiedene Methoden ausprobiert, um eine optimale Ausbeute an RNA erreichen zu können. Schließlich erwies sich die Verwendung des Strata Prep Kits (Absatz 5.1.4) als beste Lösung.

5.1.1) RNA-Isolierung mit Guanidiniumisothiocyanat (GITC) -Puffer:

100 μl GITC-Puffer wurden in ein 0,5 ml-Eppendorfgefäß gefüllt, das Cap mit den mikrodissektierten Zellen aufgesteckt und das Eppendorfgefäß ca. drei Minuten lang auf den Kopf gestellt, so dass alle Zellen benetzt waren und die Zellmembranen durch den GITC-Puffer lysiert wurden. Nach kurzem Abzentrifugieren erfolgte eine Extraktion mit einem Volumen Phenol/Chloroform, um die Zelltrümmer zu entfernen, und eine Präzipitation mit 1 μl Glycogen als Trägerstoff, 65 μl 2 M Natriumacetat (pH 4,6) und 425 μl Ethanol. Die präzipitierte RNA wurde in 100 μl Wasser resuspendiert und anschließend 90 Minuten bei 37°C mit 4 μl DNase I (10 U/ μl) behandelt. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem 12 μl

DNase-Puffer und 4 µl RNase Out Ribonuklease-Inhibitor. Es folgte wieder eine Extraktion mit einem Volumen Phenol/Chloroform sowie eine Präzipitation mit Ethanol. Die so behandelte RNA konnte in einer cDNA-Synthese eingesetzt werden.

5.1.2) RNA-Isolierung mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Die Isolierung von RNA aus mikrodisezierten Zellen mit dem RNeasy Mini Kit entspricht der weiter unten beschriebenen RNA-Isolierung aus der Tumorzelllinie LNCaP (Kapitel 5.2). Es wurde lediglich ein kleineres Volumen RLT-Puffer, nämlich 250 µl, benutzt.

5.1.3) Isolierung von mRNA mittels Quick Prep[®] Micro mRNA Purification Kit

Für dieses Verfahren wurden die Zellen zunächst in 400 µl GITC-Puffer lysiert, die Suspension durch mehrmaliges Aufziehen auf eine Spritze (20 G Kanüle) homogenisiert, die Probe mit 800 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) verdünnt und die Zelltrümmer bei 13.000 g eine Minute sedimentiert. Danach wurde pro RNA-Probe 1 ml Oligo dT-Cellulose-Suspension (25 mg/ml in Puffer mit 0,15 % Kathon CG/ICP Biocide) in ein Eppendorfgefäß gefüllt, eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die RNA-Lösung auf die Oligo dT-Cellulose pipettiert und drei Minuten lang gemischt. Nach kurzem Abzentrifugieren (13.000 g) konnte der Überstand entfernt und die Cellulose fünfmal mit 1 ml „High Salt“ Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl) gewaschen werden. Es folgten zwei Waschschrte mit je 1 ml „Low Salt“ Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl). Anschließend wurde die Cellulose in 300 µl „Low Salt“ Puffer suspendiert und auf eine Säule (Micro Spin Column) übertragen, 5 Sekunden zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl „Low Salt“ Puffer (der Puffer wurde auf die Säule gegeben und diese wenige Sekunden zentrifugiert) konnte die mRNA zweimal mit jeweils 200 µl erwärmtem (65°C) Elutionspuffer eluiert werden. Die Lösung wurde einige Minuten auf Eis abgekühlt und das Volumen durch Präzipitation mittels Ethanol eingeengt.

5.1.4) Isolierung von RNA mittels StrataPrep[®] Total RNA Microprep Kit

Als vierte Möglichkeit zur Isolierung von Gesamt-RNA aus mikrodisezierten Tumorzellen wurde das StrataPrep[®] Total RNA Microprep Kit von Stratagene verwendet. Dabei wurde das Cap mit den Zellen auf ein 0,5 ml Eppendorfgefäß mit 100 µl Lysepuffer (GITC-haltig; mit 1 µl 14,2 M β-Mercaptoethanol) gesteckt und das Gefäß mehrmals invertiert, so dass sich die Zellen vom Transferfilm lösen konnten. Um die Zellen aufzuschließen, wurde die Suspension

etwa zehnmal auf eine Spritze (20 G Kanüle) aufgezogen und wieder herausgedrückt. Das so entstandene Lysat wurde mit einem Volumen von 100 µl 70 % Ethanol versetzt, gut gemischt und auf eine Säule (Silika-haltige Matrix) aufgetragen. Die Flüssigkeit ließ sich durch einen Zentrifugationsschritt (13.000 g) von 30 Sekunden eluieren. Anschließend wurde die Säule einmal mit 600 µl „Low-Salt“ Waschpuffer gewaschen, um Proteine, Lipide, DNA und Salze zu entfernen. Nach einminütigem Trockenzentrifugieren bei 13.000 g wurde eine DNase-Lösung bestehend aus 25 µl DNase Digestion Buffer und 5 µl RNase-freier DNase (9 U/µl) auf die Säule aufgetragen und diese 15 Minuten bei 37°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit 500 µl „High Salt“ Puffer und 600 µl bzw. 300 µl „Low Salt“ Puffer. Nach erneutem Trocknen der Säule ließ sich die RNA zweimal durch Auftragen von je 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) und einem anschließenden einminütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 g von der Säule eluieren. Zur Zusammensetzung der Waschpuffer und des DNase-Puffers wurden von der Firma Stratagene keine näheren Angaben gemacht.

5.2) Isolierung von RNA aus Tumorzelllinien

Die Isolierung von gesamter RNA aus Tumorzelllinien erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Dazu wurden die Zellen aus jeweils einer Zellkulturschale (75 cm² Wachstumsfläche) mit Trypsin abgelöst, in ein Falconröhrchen mit 10 ml Medium mit 10 % FCS gegeben und bei 4°C und 1.200 g 6 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 600 µl RLT-Puffer (GITC-haltig; mit 6 µl 14,5 M β-Mercaptoethanol) versetzt. Um die Zellen aufzuschließen, wurde die Suspension etwa zehnmal auf eine Spritze (20 G Kanüle) aufgezogen und wieder herausgedrückt. Das so entstandene Lysat wurde mit einem Volumen von 600 µl 70 % Ethanol versetzt und auf eine RNeasy-Säule (Silika-Gel-Matrix) aufgetragen. Puffer und Ethanol ließen sich durch einen Zentrifugationsschritt von 30 Sekunden bei 13.000 g eluieren. Anschließend wurde die Säule einmal mit 700 µl Puffer RW1 und zweimal mit 500 µl Ethanol-haltigem Puffer RPE gewaschen, um Proteine, Lipide, DNA und Salze zu entfernen. Danach wurde die RNA zweimal durch Auftragen von je 50 µl DEPC-Wasser auf die Säule und einem anschließenden einminütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 g eluiert. Zur Zusammensetzung der Puffer wurden von der Firma Qiagen keine näheren Angaben gemacht.

5.3) DNase-Behandlung der RNA aus Tumorzelllinien

Um eine Verfälschung der Ergebnisse bei der Reversen Transkription der aus der Zelllinie LNCaP gewonnenen RNA durch DNA-Kontamination auszuschließen, wurde die RNA mit

RNase-freier DNase behandelt. Dazu wurden 100 µl RNA-Lösung mit 12 µl DNase-Puffer (100 mM Tris pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂), 5 µl RNase-Inhibitor und 5 µl DNase (10 U/µl) versetzt und 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Enzym und die angefallenen Nukleotide ließen sich durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernen. Anschließend wurde die RNA mit Ethanol präzipitiert (siehe 5.4). Um zu kontrollieren, ob die DNA vollständig entfernt worden war, wurde die RNA ohne vorherige reverse Transkription in eine spezifische PCR eingesetzt.

5.4) Ethanolpräzipitation von RNA

RNA in wässriger Lösung wurde nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion bzw. zum Einengen des Volumens mit Ethanol präzipitiert. Dazu wurde die RNA-Lösung mit 1/2 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4.6 und 4,25 Volumina Ethanol versetzt. Bei der Fällung sehr geringer RNA-Mengen, z. B. aus mikrodisektierten Zellen, wurde außerdem 1 µl Glycogen (20 mg/ml) als Träger zugesetzt. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurde die RNA 30 Minuten bei 4°C und 13.000 g abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, und nochmals 20 Minuten zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes und dem Trocknen bei Raumtemperatur wurde das Sediment in einem geringen Volumen (20 - 40 µl) DEPC-Wasser aufgenommen.

5.5) Isolierung von DNA aus Tumoren und LNCaP-Zellen

Um DNA aus PTEN-positiven Tumorregionen zu gewinnen, wurden zunächst wie oben in den Abschnitten 3.3 und 4 beschrieben Immunhistochemie und Mikrodisektion durchgeführt. Nach der Mikrodisektion wurde das entsprechende Cap auf ein 0,5 ml-Eppendorfgefäß gesteckt, das 30 µl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS) sowie 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) enthielt. Das Eppendorfgefäß wurde auf den Kopf gestellt, so dass die Flüssigkeit das Cap vollständig benetzte. Der Proteinase K-Verdau der Tumorzellen erfolgte bei 55°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K bei 68°C 30 Minuten inaktiviert und der Reaktionsansatz eine weitere Stunde bei 65°C inkubiert. Die so erhaltene DNA konnte direkt in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden.

Für die Isolierung von DNA aus LNCaP-Zellen wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin geerntet, mit PBS gewaschen, und das Sediment in 500 µl Proteinase K-Puffer mit 10 µl Proteinase K aufgenommen. Auch hier erfolgte der Verdau bei 55°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Lösung zweimal mit einem äquivalenten Volumen an Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend durch Zugabe von einem Volumen NH₄OAc

und vier Volumina 100 % Ethanol präzipitiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die DNA abzentrifugiert, und das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen konnte die DNA je nach Menge in 50 bis 200 µl TE-Puffer aufgenommen werden.

5.6) Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration genomischer DNA und die der durch LD-PCR gewonnenen cDNA wurde im Spektrophotometer gemessen. Dabei entspricht eine $OD_{260}=1$ bei einem Lichtweg von 1 cm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Da die Absorptionsbereiche von DNA und Proteinen bei dieser Wellenlänge überlappen, kann man von einer Protein-freien DNA-Präparation nur dann ausgehen, wenn der Quotient OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

Die RNA-Konzentration wurde ebenso wie die DNA-Konzentration über die optische Dichte im Spektrophotometer vermessen. Hier gilt, dass eine $OD_{260}=1$ einer RNA-Konzentration von 35 µg/ml entspricht.

6) Methoden zum Amplifizieren von RNA und DNA

6.1) RT-PCR

Um verschiedene Möglichkeiten der RNA-Isolierung aus sehr geringen Zellzahlen zu vergleichen, wurde zunächst auf verschiedene Arten RNA aus 10.000 mikrodisektierten Zellen präpariert (siehe Abschnitt 5.1) und die Ausbeute mit Hilfe einer reversen Transkription und einer spezifischen PCR mit GAPDH-Primern überprüft. Dazu wurde die RNA jeweils in 10 µl sterilem Wasser aufgenommen und mit 4 µl 5x RT-Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$; Gibco BRL), 2 µl dNTPs (je 10 mM, Amersham), 2 µl Oligo dT-Primern (Gibco BRL) und 1 µl DTT (0,1 M, Gibco BRL) vermischt. Der Reaktionsansatz wurde 5 Minuten bei 65°C denaturiert und 5 Minuten auf 37°C äquilibriert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl RNase Out und 1 µl Reverser Transkriptase (Superscript II, 200 U/µl, Gibco BRL). Die Reverse Transkription erfolgte 2 Stunden lang bei 37°C.

Aus der so gewonnenen cDNA wurden 10 µl in eine spezifische PCR eingesetzt. Der Ansatz setzte sich außerdem aus 2,5 µl 10x Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl; Gibco BRL), 1,8 µl $MgCl_2$ (100 mM), 2 µl Primer-Mix (GAPDH, 10 ng/µl), 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 6,2 µl Wasser und 0,5 µl Taq-Polymerase (rekombinant; Gibco BRL) zusammen.

Die PCR selbst bestand aus folgendem Programm:

40 Zyklen	94°C - 2 Minuten	cDNA/Primer-Denaturierung
	94°C - 30 Sekunden	Denaturierung
	65°C - 30 Sekunden	Binden der Primer
	72°C - 2 Minuten	Verlängerung der Transkripte
	72°C - 7 Minuten	abschließende Verlängerung der Transkripte
	4°C unendlich	

Die PCR wurde im Thermocycler Gene Amp 2400 (Applied Biosystems) durchgeführt.

Der Erfolg der PCR wurde anschließend auf einem Agarosegel (1%) überprüft.

6.2) RT-PCR mit dem Access RT-PCR System von Promega

Das Access RT-PCR System von Promega bietet die Möglichkeit, Erststrangsynthese und spezifische PCR in einem Ansatz zu vereinigen. Dabei darf die Menge der eingesetzten RNA zwischen 1 pg und 1 µg variieren. Die RNA wurde mit 5 µl AMV/Tfl 5x Reaction Buffer, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 50 pmol pro Primer, 1 µl 25 mM MgSO₄, 1 µl AMV Reverse Transcriptase (5 U/µl) und 1 µl Tfl DNA Polymerase (5 U/ µl) versetzt und mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Volumen von 25 µl gebracht. Erststrangsynthese und spezifische PCR bestanden aus den folgenden Schritten:

40 Zyklen	48°C - 45 Minuten	Reverse Transkription
	94°C - 2 Minuten	AMV-RT-Inaktivierung
		Denaturieren von RNA/cDNA/Primern
	94°C - 30 Sekunden	Denaturierung
	60°C - 1 Minute	Binden der Primer
	68°C - 2 Minuten	Verlängerung der Transkripte
	68°C - 7 Minuten	abschließende Verlängerung der Transkripte
	4°C unendlich	

Die RT-PCR wurde im Thermocycler Gene Amp 2400 (Applied Biosystems) durchgeführt. Je nach Schmelzpunkt der eingesetzten Primer konnte die Bindungstemperatur der Primer höher oder niedriger liegen. War genügend RNA als Ausgangsmaterial vorhanden, so reichten etwa 35 Zyklen der spezifischen PCR aus.

6.3) SMARTTM PCR cDNA Synthese

Zur Gewinnung von cDNA aus RNA aus mikrodisektierten Zellen wurde das SMARTTM PCR cDNA Kit von Clontech verwendet. „SMART“ steht für „Switch Mechanism At 5'-end of RNA Template“ (Chenchik et al., 1998). Die SMART-Methode verspricht auch bei geringen Mengen an Ausgangsmaterial eine gute Ausbeute an cDNA. Dabei werden am Ende der Erststrangsynthese durch die Transferaseaktivität der Reversen Transkriptase noch einige Nukleotide, hauptsächlich Desoxycytidin, an das 3'-Ende des neu entstandenen Stranges angehängt. An diese Sequenz bindet das SMARTTM Oligonukleotid, und die Zweitstrangsynthese kann beginnen. Auf diese Weise erhält man doppelsträngige cDNA, deren Länge der gesamten Länge der mRNA entspricht (Abbildung III.3).

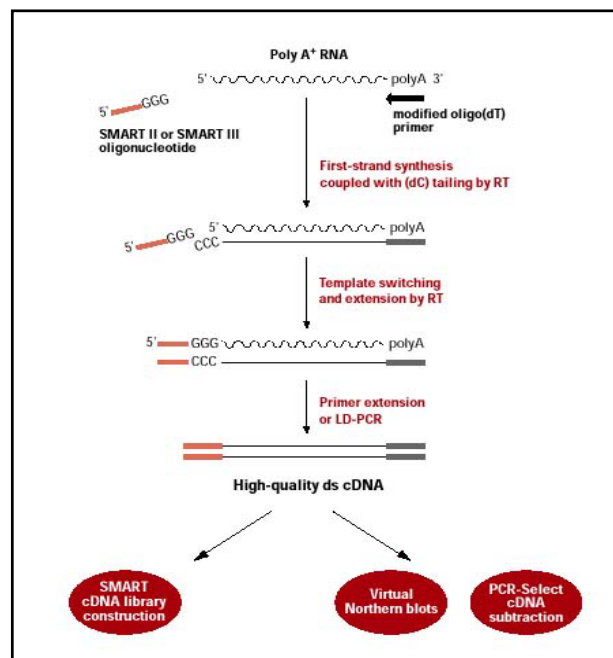


Abbildung III.3: Funktionsweise der Smart-Methode (entnommen aus www.clontech.de; „SMART PCR cDNA Synthesis Kit User Manual“).

Die cDNA-Synthese-Reaktion setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

1 - 3 µl RNA (0,05 - 1 µg Gesamt-RNA), 1 µl cDNA Synthese Primer (10 µM), 1 µl SMART Oligonukleotid (10 µM) und so viel Wasser, dass das gesamte Volumen 5 µl betrug. Die einzelnen Bestandteile wurden gut gemischt, zentrifugiert und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden bei Raumtemperatur 2 µl 5x „First Strand“ Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 30 mM MgCl₂), 1 µl DTT (20mM), 1 µl 50x dNTP-Mix (10mM) und 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben, gut gemischt, und das Gemisch in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß zwei Stunden bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden 40 µl TE-Puffer (pH 7.6) zugefügt und die Reverse Transkriptase durch

siebenminütiges Erhitzen auf 72°C inaktiviert. Für die Reverse Transkription wurde der Thermocycler PTC-200 (MJ-Research) verwendet. Die auf diese Weise gewonnene cDNA ließ sich durch „Long distance“-PCR (LD-PCR) weiter vermehren und anschließend für die cDNA-Subtraktion und zur Hybridisierung von Arrays einsetzen.

6.4) Long Distance PCR

Um cDNA von möglichst vollständiger Länge zu erhalten, wurde zur Vermehrung der mit Hilfe des SMART-Kits gewonnenen cDNA das Advantage[®] cDNA-PCR-Kit von Clontech benutzt (Barnes et al., 1994). Dabei erhält man durch die Verwendung von zwei verschiedenen DNA-Polymerasen längere amplifizierte Fragmente, eine geringere Fehlerrate und eine höhere Ausbeute als bei einer herkömmlichen PCR. Außerdem soll das Ergebnis genau die Zusammensetzung der RNA widerspiegeln.

Der Reaktionsansatz der LD-PCR setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 74 µl ddH₂O, 10 µl 10x Advantage 2 PCR-Puffer (400 mM Tricine-KOH, pH 9,2, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37,5 µg/ml Rinderserumalbumin), 2 µl 50x dNTP-Mix (10 mM), 2 µl PCR Primer (10 µM), 10 µl cDNA (aus Abschnitt 6.3) und 2 µl 50x DNA-Polymerase Mix (Clontech). Das PCR-Programm sah wie folgt aus:

95°C - 1 Minute	
95°C - 15 Sekunden	23 - 29 Zyklen
65°C - 30 Sekunden	
68°C - 6 Minuten	
68°C - 10 Minuten	
4°C - unendlich	

Die LD-PCR wurde im Thermocycler Gene Amp 2400 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen wurde dabei individuell für jeden Versuch festgestellt. Dazu wurden zunächst je drei Ansätze für 23 Zyklen im Thermocycler inkubiert. Danach wurden zwei Ansätze im Kühlschrank bei 4°C gelagert, während aus dem dritten eine Probe von 10 µl entnommen wurde. Die PCR wurde mit dem restlichen Ansatz für mindestens neun weitere Zyklen fortgeführt, wobei nach jeweils drei Zyklen eine weitere Probenentnahme von jeweils 10 µl erfolgte. Alle Proben wurden nebeneinander auf einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt, so dass man die Menge an gebildetem Produkt nach 23, 26, 29 und 32 Zyklen vergleichen konnte. Die optimale Anzahl wurde festgestellt, und die zwei gelagerten Ansätze wurden für

die entsprechende zusätzliche Anzahl an Zyklen inkubiert. Die optimale Zyklenzahl war dadurch definiert, dass ein deutliches Signal sichtbar war. Die PCR sollte sich in der exponentiellen Phase befinden und die Verteilung der Produkte durfte sich noch nicht in Richtung der längeren cDNAs verschoben haben (siehe Abbildung III.4).

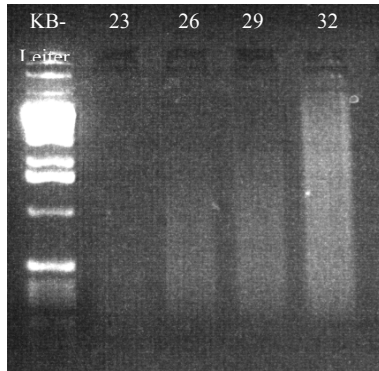


Abbildung III.4: Kontrolle einer LD-PCR auf einem 1,2 %-Agarosegel. Die Proben, die nach 23, 26, 29 und 32 Zyklen entnommen wurden, sind nebeneinander aufgetragen. Nach 23 Zyklen ist noch keine cDNA sichtbar. Nach 32 Zyklen dagegen ist die Verteilung der PCR-Produkte bereits in Richtung der langen cDNAs hin verschoben. Die optimale Zyklenzahl liegt zwischen 26 und 29 Zyklen. Eine Anzahl von 26 oder 27 Zyklen erscheint ausreichend, da das Signal bei 26 Zyklen bereits recht deutlich ist.

6.5) Quantitative Realtime RT-PCR

Um die unterschiedlichen Intensitäten der Expression von *PTEN* in *PTEN*-positiven und -negativen Regionen von Prostatatumoren sowie in transfizierten LNCaP-Zellen mit und ohne *PTEN*-Konstrukt quantitativ erfassen zu können, wurde eine Realtime TaqManTM RT-PCR etabliert. Diese Methode beruht auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase. Neben den beiden spezifischen Primern kommt bei dieser Art von PCR eine fluorogene Sonde zum Einsatz, die im Amplikon zwischen den beiden Primern bindet. An ihrem 5'-Ende trägt die Sonde einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluoreszein-Derivat), während das 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) markiert und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch die räumliche Nähe zum Quencher und dem daraus resultierenden Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der Verlängerung des Transkriptes wandert die Taq-Polymerase den Matrizen-Strang entlang und trifft auf die Sonde. Diese wird aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität vom 5'-Ende her abgebaut, so dass der Reporter-Farbstoff freigesetzt wird. Da nun kein Fluoreszenz-Energietransfer mehr stattfinden kann, bewirkt eine Anregung durch Licht die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkten steigt die Menge an fluoreszierendem, freien Reporterfarbstoff also mit jedem PCR-Zyklus an. Ab einem bestimmten Schwellenwert (C_T -Wert) ist eine Fluoreszenz und damit das Vorhandensein von Transkripten nachweisbar. Die TaqMan-Methode ist in Abbildung III.5 dargestellt.

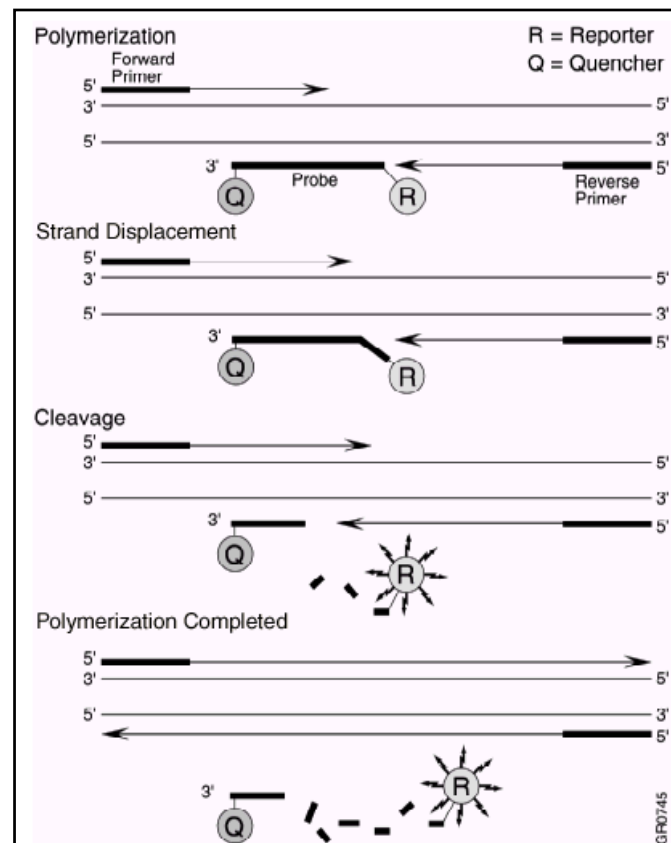


Abbildung III.5: Quantitative Realtime PCR nach der TaqMan-Methode;

R = Reporterfarbstoff, Q = Quencherfarbstoff (www.appliedbiosystems.com; TaqMan Gold RT-PCR Kit).

Zunächst wurde 1 µg RNA aus transfizierten, induzierten LNCaP-Zellen bzw. RNA aus 10.000 mikrodisezierten Tumorzellen mit Hilfe des TaqMan Gold RT-PCR-Kits (PE Biosystems) revers transkribiert. Der Reaktionsansatz (50 µl Gesamtvolumen) enthielt neben der RNA 5 µl 10x Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3), 11 µl 25 mM MgCl₂, 10 µl dNTP-Mix (25 mM), 2,5 µl Random-Hexamere (d(N)₆; 0,5 M), 1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl; PE Biosystems) sowie 1,25 µl Reverse Transkriptase (50 U/ µl) und die jeweils erforderliche Menge Wasser. Zu Beginn der Reaktion erfolgte das Binden der Random-Hexamere (10 Minuten bei 25°C), gefolgt von der eigentlichen reversen Transkription (30 Minuten bei 48°C). Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt.

Die quantitative PCR erfolgte mit Hilfe des qPCR Core Kit (Eurogentec) auf einem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System. Zur Analyse der LNCaP-RNA wurden 5 µl 10x Puffer (keine näheren Angaben vom Hersteller), 5 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl dNTP-Mix (5 mM), 3 µl *PTEN*-Primer (Endkonzentration 300 nM) und 1 µl *PTEN*-Sonde (Endkonzentration 100 nM) bzw. 1 µl Aktin-Primer/Sonde-Gemisch (PE Biosystems) mit 1 µl cDNA, 0,25 µl Hot GoldStar Taq-Polymerase (5 U/ µl) und 32,75 µl Wasser gemischt und die PCR-Reaktion im ABI 7700 durchgeführt. Der PCR-Zyklus bestand aus den folgenden Schritten:

50 °C – 2 Minuten	
95 °C – 10 Minuten	Aktivierung der Taq-Polymerase
95 °C – 15 Sekunden	40 Zyklen
60 °C – 1 Minute	
50 °C – unendlich	

Zur Untersuchung der Expression in Tumoren wurde die entsprechende PCR in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Dabei wurden je 5 µl cDNA eingesetzt.

Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit Aktin-Primern und einer Aktin-spezifischen Sonde durchgeführt. Diese Kontrolle sollte sicherstellen, dass etwa gleiche RNA- bzw. cDNA-Mengen in die Realtime RT-PCR eingesetzt worden waren. Die für *PTEN* erhaltenen C_T -Werte wurden mit den C_T -Werten für Aktin normalisiert.

Die Berechnung, mit deren Hilfe sich nach der vergleichenden C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) das Verhältnis der *PTEN*-mRNA-Mengen in transfizierten LNCaP-Zellen mit und ohne *PTEN*-Konstrukt bzw. in *PTEN*-positiven und -negativen Tumorregionen ermitteln lässt, sieht folgendermaßen aus:

Da die PCR eine exponentiell verlaufende Reaktion ist, lässt sie sich mathematisch wie folgt beschreiben:

$$Y = X (1 + E)^n$$

Dabei ist Y die Menge an hergestelltem Amplifikat, X die Startkopienzahl zu Beginn der PCR, E die Effizienz und n die Anzahl der PCR-Zyklen. Diese Gleichung lässt sich zum Zeitpunkt des Überschreitens des Schwellenwerts (C_T -Wert) für die Zielsequenz als $X_T = X_0 * (1 + E_X)^{C_{T,X}} = \text{konst.}$

ausdrücken. Entsprechend der oberen Gleichung ist X_T die Anzahl der hergestellten Zielsequenzmoleküle zum Zeitpunkt C_T , X_0 steht für die Startkopienzahl, E_X für die Effizienz der Zielsequenz-Amplifikation und $C_{T,X}$ steht für den Schwellenwert (Threshold) der Zielsequenz. Die Zielsequenz ist in diesem Fall *PTEN*.

Eine entsprechende Gleichung lässt sich für die Amplifikation der Referenzsequenz (Aktin) aufstellen, wenn man X durch R ersetzt. Um das Verhältnis der beiden Sequenzen zu ermitteln, wird X_T durch R_T dividiert. Wenn außerdem die Effizienzen der beiden Reaktionen gleich sind, was bei kleinen Fragmenten unter 150 bp und zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR der Fall sein sollte, ergibt sich folgende Gleichung:

$$X_0/R_0 * (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \quad \text{oder} \quad X_N * (1 + E)^{\Delta C_T} = K.$$

X_N steht dabei für den normalisierten Wert der Zielsequenz (Zielsequenz bezogen auf Referenzsequenz), ΔC_T beinhaltet den Unterschied an Zyklen beim Erreichen des Schwellenwerts für Zielsequenz und Referenz. Löst man diese Gleichung nach X_N auf und dividiert anschließend durch den X_N -Wert des Kalibrators (für LNCaP-Zellen ist der Kalibrator z. B. der Wert für pIND (Zellen ohne *PTEN*-Konstrukt)), so erhält man die Gleichung

$$X_{N,X}/X_{N,Kb} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}.$$

Da die Effizienz der Amplifikation von Zielsequenz und Referenz zu Beginn der exponentiellen Phase in beiden Fällen als 100 % angenommen werden kann, ergibt sich schließlich die Gleichung, mit der sich die RNA-Verhältnisse zwischen zwei Proben berechnen lassen:

$$X_{N,kal} = 2^{-\Delta\Delta C_T}.$$

6.6) aRNA-Synthese mit dem Message Amp aRNA Kit (Ambion)

Das Verfahren der antisense-RNA (aRNA)-Synthese wurde 1990 von Dr. James Eberwine entwickelt (Van Gelder et al., 1990). Es besteht aus einer reversen Transkription mit einem Oligo(dT)-Primer, der einen T7-Promotor enthält, und einer anschließenden *in vitro*-Transkription der cDNA mit Hilfe einer T7 RNA-Polymerase. Auf diese Weise lässt sich von einer mRNA eine große Anzahl an aRNA-Kopien herstellen.

Für die Amplifikation der aus mikrodisezierten Tumorzellen gewonnenen RNA wurde zunächst doppelsträngige cDNA hergestellt. Dazu wurde die RNA mittels Strata Prep Kit gereinigt, mit Ethanol gefällt, und das RNA-Sediment in sterilem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 1 µl T7 Oligo(dT)-Primer wurde der Reaktionsansatz mit Wasser auf ein Volumen von 12 µl gebracht. RNA und Primer wurden 10 Minuten bei 70°C denaturiert, abzentrifugiert und mit einem Master-Mix, bestehend aus 2 µl 10x „First Strand“ Puffer, 1 µl Ribonuklease Inhibitor und 4 µl dNTP-Mix, gemischt. Nach einer Inkubation von 2 Minuten bei 42°C wurde 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben und die Synthese 2 Stunden bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde direkt zur Zweitstrang-Synthese übergegangen.

Für die Zweitstrang-Synthese wurden bei Raumtemperatur 63 µl steriles Wasser, 10 µl „Second Strand“ Puffer, 4 µl dNTP-Mix, 2 µl DNA Polymerase und 1 µl RNaseH direkt zur Erststrang-Synthese gegeben und die Ansätze 2 Stunden bei 16°C inkubiert. Die Reinigung der cDNA erfolgte mit Hilfe der im Kit enthaltenen Säulen. Dazu wurden die Säulen in ein Eppendorfgefäß gesetzt und für 5 Minuten mit 100 µl „cDNA Binding“ Puffer equilibriert. Jede Probe wurde mit 250 µl „cDNA Binding“ Puffer gemischt, auf die Säule gegeben und

eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 650 µl Waschpuffer und einem Zentrifugationsschritt von einer Minute zum Trocknen der Säulen wurde die cDNA zweimal mit 50 µl warmem (50°C) Nuklease-freiem Wasser eluiert und mit Ammoniumacetat präzipitiert.

Die aRNA-Synthese wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die cDNA wurde in 8 µl sterilem Wasser aufgenommen, jeweils 2 µl dATP, dCTP, dGTP und dUTP (je 75 mM), 2 µl 10x Puffer und 2 µl T7 Enzym-Mix wurden dazugegeben. Die aRNA-Synthese erfolgte 6-14 Stunden lang bei 37°C und schloss nach Zugabe von 2 µl DNaseI mit einer Inkubation über 30 Minuten ab. Die Reinigung der aRNA erfolgte über die oben genannten Säulen. Dazu wurden die Säulen wiederum in ein Eppendorfgefäß gesetzt und 5 Minuten mit 100 µl „aRNA Binding“ Puffer equilibriert. Jede Probe wurde mit 78 µl aRNA Elutionspuffer, 350 µl „aRNA Binding“ Puffer und 250 µl 70% Ethanol gemischt, auf die Säule gegeben und eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 650 µl Waschpuffer und einem Zentrifugationsschritt von einer Minute zum Trocknen der Säulen wurde die aRNA zweimal mit 50 µl warmen (50°C) aRNA Elutionspuffer eluiert und anschließend bei -80°C gelagert. Zur Zusammensetzung der Puffer und zu den Enzymaktivitäten liegen von der Firma Ambion leider keine näheren Angaben vor.

7) Kontrolle von cDNA und DNA auf Agarosegelen

Um cDNA aus PCR, LD-PCR und RT-PCR sichtbar zu machen, oder die bei einer Behandlung von DNA mit Restriktionsenzymen entstandenen Fragmente zu überprüfen, wurden die entsprechenden Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt. Für ein kleines Gel wurde Agarose abgewogen (z. B. 0,5 g für ein 1 %iges Gel) und zu 50 ml TBE-Puffer gegeben. Die Suspension wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die gesamte Agarose gelöst hatte. Anschließend wurde die Lösung kurz gekühlt und 3 µl einer konzentrierten Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) hinzugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde die Agarose in den Gelschlitten gegossen und ein Kamm mit der gewünschten Anzahl an Zähnen aufgesteckt. Nachdem die Agarose abgekühlt und erstarrt war (nach ca. 30 Minuten) wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Kammer gelegt und die Proben in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 Volt mindestens eine Stunde lang. Auf einem UV-Tisch konnte die DNA mit Hilfe des Ethidiumbromid sichtbar gemacht und die vorhandenen Banden gegebenenfalls fotografiert werden.

8) SSCP-Analyse von DNA aus LNCaP-Zellen

Die SSCP-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism) ist eine Methode, mit deren Hilfe sich Mutationen in einem DNA-Strang nachweisen lassen. Sie beruht darauf, dass ein DNA-Strang entsprechend seiner Sequenz eine bestimmte Konformation einnimmt. Kommt es innerhalb der Sequenz zu einer Mutation, so ändert sich die Konformation. Im nativen Gel lassen sich diese DNA-Stränge gemäß ihrer Konformation und ihrem Molekulargewicht auftrennen. Bereits eine Änderung einer einzelnen Base kann durch ein verändertes Laufverhalten sichtbar gemacht werden.

Zunächst wurden je 10 ng DNA aus menschlichem Blut und DNA aus LNCaP-Zellen in eine spezifische PCR (Zusammensetzung und PCR-Programm in Abschnitt 6.1 beschrieben; Bindungstemperatur der Primer „PTEN Ex1 Fwd/Rev“: 51 °C) eingesetzt. Die spezifischen Primer waren so gewählt, dass Exon 1 des *PTEN*-Gens, in dem sich bei LNCaP-Zellen eine Mutation befinden sollte, amplifiziert wurde. Durch Vergleich mit der menschlichen DNA sollte sichergestellt werden, dass bei den verwendeten LNCaP-Zellen tatsächlich eine Mutation in Exon 1 vorhanden war.

Für die SSCP-Gelelektrophorese wurde das Multiphor II System (Pharmacia) bei konstanter Temperatur (15°C) verwendet. Das 8 % Polyacrylamid-Gel setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 9 ml 40 % Polyacrylamid Stammlösung (1:29 oder 1:49), 4,5 ml 10x TBE, 11,25 ml 40 % Glycerol, 19 ml H₂O, 139 µl 10 % APS und 75 µl TEMED. Das Gel wurde auf einer Folie gegossen und musste vor der Verwendung mindestens eine Stunde polymerisieren. 3 bis 5 µl der DNA-Proben wurden mit 10 µl bzw. 12 µl Ladepuffer vermischt, 10 Minuten bei 94°C im Heizblock denaturiert und anschließend kurz auf Eis gekühlt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE bei 150 Volt über Nacht.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Stränge mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel zweimal 3 Minuten in Lösung A (10 % Ethanol, 0,5 % Essigsäure) inkubiert, um die DNA zu fixieren. Die eigentliche Färbung erfolgte durch eine Inkubation von 10 Minuten Dauer in Lösung B (0,1 % Silbernitrat in Wasser) und anschließendes Entwickeln von 20 Minuten in Lösung C (siehe Material). Um die Färbung zu fixieren wurde das Gel abschließend 5 Minuten in Lösung D (siehe Material) inkubiert.

9) Subtraktive Hybridisierung von cDNA aus Tumoren

9.1) Reinigung der LD-PCR für cDNA-Subtraktion

Um die in der LD-PCR erhaltene cDNA auf die cDNA-Subtraktion vorzubereiten, wurden beide Ansätze einer Probe kombiniert, mit 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

extrahiert und das Volumen der wässrigen Phase mit Hilfe von n-Butanol auf 40 bis 70 µl eingeengt. Dazu wurden 700 µl n-Butanol zur cDNA-Lösung gegeben, gut geschüttelt und die beiden Phasen durch einen fünfminütigen Zentrifugationsschritt (8.000 g) wieder getrennt. Eine bestimmte Wassermenge aus der wässrigen Phase löste sich dabei im n-Butanol und ließ sich zusammen mit diesem entfernen, so dass das Volumen der cDNA-Lösung abnahm.

Die anschließende Reinigung der cDNA erfolgte mittels einer CHROMA SPIN Säule (Clontech). Dabei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, das ausschließlich von der Zeit abhängig ist. Die Säule wurde zunächst mehrmals invertiert, um die Matrix zu resuspendieren, und mit 1,5 ml TNE-Puffer gewaschen. Danach konnte die cDNA-Lösung langsam aufgetropft und erst mit 25 µl TNE, dann mit 150 µl TNE-Puffer nachgewaschen werden. Die Elution der cDNA erfolgte mit 320 µl TNE-Puffer, der in einem Eppendorfgefäß aufgefangen wurde. Vor der weiteren Bearbeitung wurden 5 µl des Eluats auf einem Agarosegel auf das Vorhandensein von cDNA überprüft. Anschließend wurde die cDNA mit Ammoniumacetat und Ethanol aus der Lösung präzipitiert, um für die weitere Verarbeitung ein kleineres Volumen zu erreichen.

9.2) Subtraktive Hybridisierung

Mit Hilfe der Subtraktiven Hybridisierung lassen sich zwei mRNA-Populationen miteinander vergleichen und diejenigen Gene herausuchen, die nur in einer der beiden Populationen exprimiert werden (Diatchenko et al., 1996). Dazu wird zunächst aus der vorliegenden RNA cDNA hergestellt. Die zu untersuchende cDNA wird als „tester“ bezeichnet. Die cDNA, mit der der „tester“ verglichen werden soll, nennt sich „driver“. „tester“- und „driver“-cDNA werden hybridisiert. In beiden Populationen vorhandene Sequenzen bilden Doppelstränge, die im Laufe des Versuchs entfernt werden. Übrig bleiben einzelsträngige Sequenzen, die nur im „tester“ vorhanden sind. Diese lassen sich mittels PCR amplifizieren und durch Sequenzanalyse oder Hybridisierung von Arrays näher untersuchen. Die Methode der Subtraktiven Hybridisierung ist in Abbildung III.6 dargestellt.

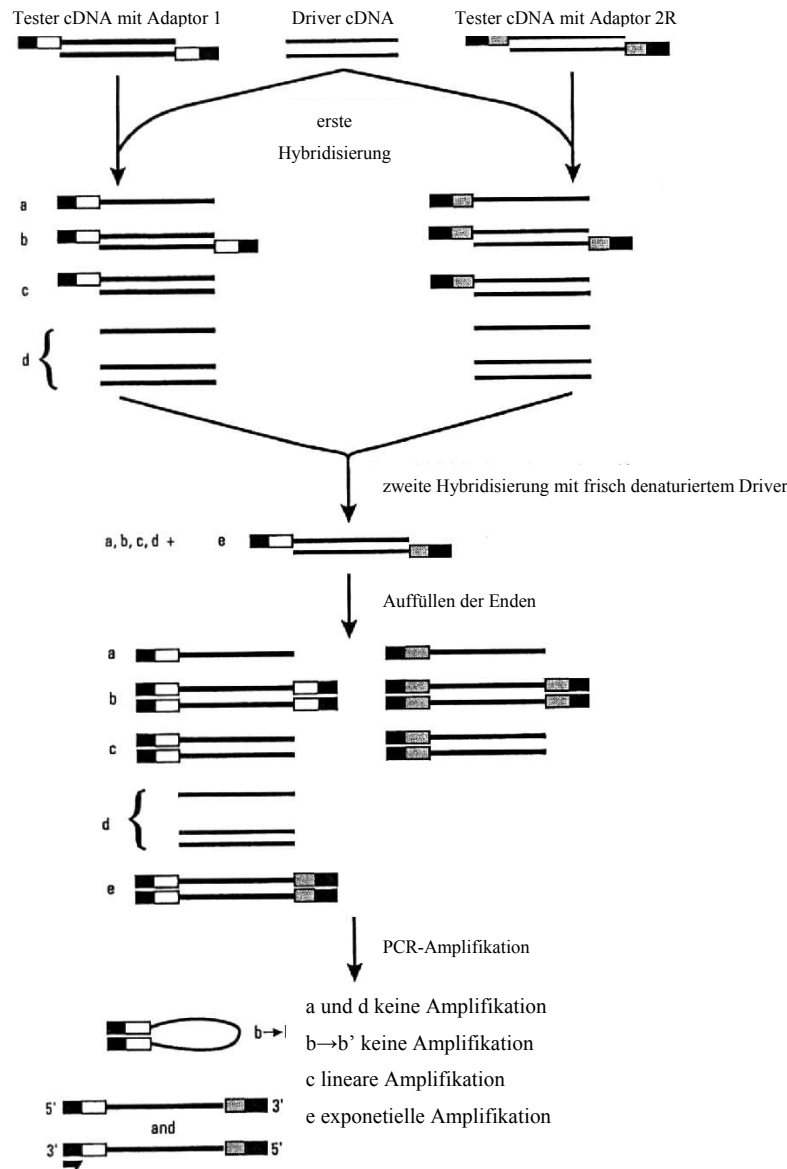


Abbildung III.6: Schema der Subtraktiven Hybridisierung (entnommen aus www.clontech.com; „CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit“ Handbuch).

9.2.1) Restriktion

Die cDNA-Synthese, Amplifikation und Reinigung erfolgten wie oben beschrieben mit dem SMART-Kit, über LD-PCR und mit Hilfe von CHROMA SPIN Säulen. Das cDNA-Sediment wurde in 50 µl Wasser aufgenommen, 6 µl davon wurden als Kontrolle beiseitegelegt und 43,5 µl zusammen mit 5 µl 10x Rsa I Restriktionspuffer und 1,5 µl Rsa I (10u/ µl) 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform und eine Präzipitation mit Ammoniumacetat und Ethanol. Das Sediment wurde anschließend in 5,5 µl Wasser gelöst.

Alle weiteren Schritte wurden zusätzlich zur eigenen cDNA-Probe mit der Kontroll-DNA durchgeführt, die im cDNA-Subtraktionskit enthalten war. Auf diese Weise ließ sich feststellen, ob eventuell auftretende Fehler auf die Methode an sich oder auf die eigene cDNA-Probe zurückzuführen waren.

9.2.2) Ligation

Nach der Behandlung mit Rsa I war die Präparation der cDNA, die als „driver“ dienen sollte, abgeschlossen, und die cDNA konnte zunächst eingefroren werden. Für die „tester“-cDNA war eine weitere Modifikation nötig. In zwei verschiedenen Ansätzen wurde an die durch Rsa I entstandenen glatten Enden jeweils einer von zwei unterschiedlichen Adaptern ligiert. Dazu wurde 1 µl cDNA mit 5 µl sterilem Wasser verdünnt. 2 µl dieser verdünnten DNA wurden mit 2 µl Adapter I bzw. Adapter II und 6 µl Master-Mix bestehend aus 3 µl Wasser, 2 µl 5x Ligationspuffer (250 mM, Tris-HCl pH 7.8, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,25 mg/ml BSA) und 1 µl T4-Ligase (400 U/ µl) gemischt. Aus diesen beiden Ansätzen wurden 2 µl herausgenommen und in einem dritten Eppendorfgefäß kombiniert. Dabei handelt es sich um eine negative Kontrolle aus unsubtrahierter DNA. Sie diente nach Abschluss der Subtraktion zum Vergleich mit den subtrahierten Proben. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde sie durch Zugabe von 1 µl EDTA/Glycogen beendet und die Ligase durch einen Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 72°C inaktiviert.

9.2.3) Kontroll-PCR

Die Effizienz der Ligation ließ sich durch eine PCR kontrollieren, deren einer Primer innerhalb der Adapter liegt (PCR Primer 1). Als zweiter Primer diente eine Sequenz, die komplementär zum GAPDH-Gen war. Zusätzlich wurde eine Sequenz innerhalb des GAPDH-Gens amplifiziert. Beim Vergleich der Intensität beider Banden auf einem 1 %-Agarosegel sollte die Primer1/GAPDH-Bande mindestens 25 % der GAPDH-Bande betragen. Das bedeutet, dass bei mindestens 25 % der cDNA die Ligation des Adapters erfolgreich verlaufen ist.

Der Reaktionsansatz für diese Kontroll-PCR setzte sich aus je 1 µl „tester 1“ oder „tester 2“ (mit Adapter I oder II ligierte cDNA), je 1 µl GAPDH 3'-Primer (10 µM) und PCR Primer 1 bzw. 1 µl GAPDH 5'-Primer (beide 10 µM), 18,5 µl Wasser, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 0,5 µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix zusammen. Beide GAPDH-Primer waren im Kit der Firma Clontech enthalten. Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

94°C - 30 Sekunden	20 Zyklen
94°C - 10 Sekunden	
65°C - 30 Sekunden	
68°C - 2,5 Minuten	
4°C - unendlich	

Die PCR wurde im Thermocycler Gene Amp 2400 (Applied Biosystems) durchgeführt. Waren die oben beschriebenen Bandenintensitäten vorhanden, erfolgte die eigentliche Subtraktion in zwei Schritten.

9.2.4) Hybridisierung

Bei der ersten Hybridisierung wurden jeweils 1,5 µl „driver“-cDNA mit 1,5 µl Adapter 1–„tester“ oder Adapter 2–„tester“ sowie 1 µl 4x Hybridisierungspuffer (zur Zusammensetzung wurden von der Firma Clontech keine Angaben gemacht) gemischt, mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt, bei 98°C eine Minute denaturiert und anschließend 6 bis 12 Stunden bei 68°C hybridisiert. Für die zweite Hybridisierung wurden beide Proben kombiniert und 1 µl frisch denaturierte „driver“-cDNA zusammen mit 1 µl 4x Hybridisierungspuffer und 2 µl Wasser hinzugefügt. Die zweite Hybridisierung erfolgte bei 68°C über Nacht. Nach Zugabe von 200 µl Verdünnungspuffer wurde der Ansatz weitere 7 Minuten bei 68°C inkubiert und anschließend bei -20°C eingefroren.

9.2.5) Amplifikation der subtrahierten cDNA

Schließlich wurde die differentiell exprimierte cDNA im Rahmen einer „nested“-PCR selektiv amplifiziert. Vor der ersten PCR wurden die PCR-Ansätze 5 Minuten bei 75°C inkubiert, um die Lücken auf dem einem Adapters gegenüberliegenden Strang mit der entsprechenden homologen Sequenz zu füllen (siehe Abbildung II.6, Mitte). Anschließend durchliefen die Reaktionsansätze, die sich aus 1 µl subtrahierter cDNA, 19,5 µl Wasser, 2,5 µl 10x PCR Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl PCR-Primer 1 (10 µM) und 0,5 µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix zusammensetzten, folgendes Programm:

94°C - 25 Sekunden	27 Zyklen
94°C - 10 Sekunden	
66°C - 30 Sekunden	
72°C - 1,5 Minuten	
72°C - 10 Minuten	
4°C - unendlich	

Die PCR wurde im Thermocycler Gene Amp 2400 (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei erfolgreich verlaufener PCR, die auf einem 2 % Agarosegel kontrolliert wurde, erfolgte die weitere Amplifikation mit „nested“-Primern. Dazu wurden 3 µl der primären PCR mit 27 µl Wasser verdünnt. 1 µl davon wurde mit 18,5 µl Wasser, 2,5 µl 10x PCR Puffer, 1 µl Nested PCR Primer 1 (10 µM), 1 µl Nested PCR Primer 2 (10 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 0,5 µl 50x Advantage cDNA Polymerase Mix gemischt und unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

94°C - 25 Sekunden	27 Zyklen
94°C - 10 Sekunden	
68°C - 30 Sekunden	
72°C - 1,5 Minuten	
72°C - 10 Minuten	
4°C - unendlich	

Auch hier wurde der Thermocycler Gene Amp 2400 (Applied Biosystems) verwendet. 8 µl der Reaktion wurden auf einem Agarosegel kontrolliert. Es sollten mehrere unterschiedlich starke Banden sichtbar sein, die aus differentiell exprimierter cDNA bestehen.

10) Expressionsanalysen auf cDNA-Arrays

10.1) Reinigung der LD-PCR für die direkte Herstellung einer radioaktiven Sonde

Die Aufreinigung der mittels LD-PCR amplifizierten cDNA erfolgte mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen entsprechend der beigefügten Anleitung:

Die cDNA-Lösung wurde mit 5 Volumina Puffer PB gemischt, auf die Säule aufgetragen und eine Minute bei 12.000 g zentrifugiert. Um Proteine und Salze zu entfernen, wurden 750 µl Puffer PE aufgetragen, die Flüssigkeit eine Minute lang abzentrifugiert (12.000 g) und die Säule durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (12.000 g) eine Minute getrocknet. Um eine

maximale Ausbeute zu erhalten, wurde die DNA zweimal durch Auftragen von jeweils 25 µl Elutionspuffer und anschließendes Zentrifugieren (1,5 Minuten) bei 12.000 g von der Säule eluiert.

10.2) Herstellung und Reinigung der radioaktiven Sonde aus cDNA

Zur Herstellung einer radioaktiven Sonde wurden 500 ng bis 600 ng cDNA verwendet. Diese wurden mit 2 µl der zum Human Cancer 1.2 Array zugehörigen CDS Atlas 1.2 Primer bzw. der entsprechenden Primer der Human 3.6 Arrays versetzt und mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl bzw. 30 µl (je nach Konzentration der cDNA) gebracht. Anschließend wurde das Primer/cDNA-Gemisch 10 Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert und bei Raumtemperatur wieder abgekühlt.

In der Zwischenzeit wurden in einem zweiten Eppendorfgefäß 3 µl bzw. 4 µl 10x Markierungspuffer (500 mM HEPES-KOH pH 7.8, 100 mM MgCl₂), 3 µl bzw. 4 µl dNTP-Mix (je 10 mM) ohne dCTP und 3 µl bzw. 4 µl [$\alpha^{33}\text{P}$]-dCTP gemischt. Diese Mischung wurde zwei Minuten bei 50°C vorgewärmt. Danach wurden das cDNA/Primer-Gemisch sowie 1 µl Klenow (10 U/µl; USB) zugefügt und der Reaktionsansatz 30 Minuten bei 50°C im Heizblock inkubiert.

Die Aufreinigung erfolgte über Nucleo Spin-Säulen (Silika-Matrix) von Clontech. Die radioaktive Sonde wurde mit NT2-Puffer auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt, auf die Säule aufgetragen und eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule dreimal mit 350 µl NT3-Puffer durch Auftragen der Flüssigkeit und einen einminütigen Zentrifugationsschritt (12.000 g) gewaschen. Eluieren ließ sich die Sonde in zwei Schritten mit jeweils 100 µl NE-Puffer. Dabei wurde jeweils 1,5 Minuten zentrifugiert (12.000 g). Vor dem Zentrifugieren wurde die Säule jeweils zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die radioaktive Intensität der Sonde wurde mit Hilfe eines Geigerzählers abgeschätzt. Zur Zusammensetzung der Puffer wurden von der Firma Clontech keine näheren Angaben gemacht.

10.3) Herstellung radioaktiver Sonden aus RNA

Für die Herstellung von radioaktiven Sonden aus RNA wurden je 1 µg RNA mit 2 µl spezifischen CDS-Primern versetzt und das Gesamtvolumen mit Wasser auf 8 µl erhöht. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 5 Minuten bei 70°C denaturiert und für wenige Minuten auf Eis gekühlt. Danach wurden 5 µl 5x Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Clontech), 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dGTP; 125 µM

dCTP), 4 µl ^{33}P -markiertes dCTP, 1 µl DTT (0,1 M) und 2 µl RNase-Inhibitor (Gibco BRL) hinzugegeben. Nachdem das Gemisch kurz bei 40 °C im Heizblock erwärmt worden war, wurden 1 µl MMLV Reverse Transkriptase aus dem zu den Clontech-Arrays gehörigen Kit sowie 1 µl Superscript II (200 U/µl) dazupipettiert und der ganze Ansatz gut gemischt. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Reversen Transkriptasen ließen sich bessere Ergebnisse erzielen als mit der Reversen Transkriptase von Clontech allein. Die Reverse Transkription erfolgte 5 Stunden lang bei 40°C im Heizblock. Die Reinigung der Sonden wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

10.4) Hybridisierung und Auswertung der Arrays

Vor der Zugabe der radioaktiven Sonde wurden die Filter 30 bis 60 Minuten mit Smart Blocking Solution/SSC in ExpressHybTM Hybridization Solution (Clontech) bei 68°C im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Anschließend wurde die Sonde fünf Minuten bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis gekühlt und direkt zur Prähybridisierungslösung gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 68°C.

Am nächsten Tag (nach ca. 24 h) wurden die Arrays dreimal 30 Minuten bei 68°C mit Waschlösung I und einmal 30 Minuten bei 68°C mit Waschlösung II gewaschen. Danach war mit dem Geigerzähler in der Regel nur noch schwache Radioaktivität auf den Arrays messbar. Die Membranen wurden kurz zwischen zwei Lagen Whatman-Papier trockengetupft und in Frischhaltefolie gewickelt. Anschließend wurde ca. 72 Stunden lang eine Phosphorimager-Platte (Screen) aufgelegt und die Kassette mit Arrays und Platte während dieser Zeit in einer Bleibox gelagert, um die natürliche Hintergrundstrahlung weitestgehend abzuschirmen.

Zum Auswerten wurde die Phosphorimager-Platte im Phosphorimager gescannt und die Intensität der einzelnen Spots mit Hilfe der Aida Image Analyzer Software (Raytest) bewertet und aufgelistet. Dazu wurde zuerst die zu den Human Cancer bzw. Human 3.6 Arrays gehörige Schablone (Grid) auf den Array gelegt und so die Lage der cDNA-Spots auf den Arrays eingegrenzt. Mit Hilfe einer Liste konnte das Programm nun jedem Spot entsprechend seiner Position den richtigen Namen zuordnen und die Intensitäten messen. Zusätzlich wurde nach der Methode der „weighted image regions“ für jeden Array die Hintergrundstrahlung definiert. Diese wurde direkt von der gemessenen Intensität jedes Spots abgezogen. Für die weitere Bearbeitung und Auswertung wurden die Werte in Excel-Tabellen übertragen. Anschließend erfolgte für jeden Array eine Normalisierung der Werte. Eine weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe eines von Herrn M. Beier (Institut für Humangenetik, Universität Düsseldorf) geschriebenen Programms, das die Intensitäten eines Spots, die in

mehreren Wiederholungen gemessen wurden, vergleicht. Je nach Übereinstimmung der Werte wurden die untersuchten Gene in Gruppen sortiert. Gleichzeitig wurde eine Clusteranalyse durchgeführt und farblich angezeigt, welche RNA-Proben bzw. cDNA-Proben übereinstimmende bzw. ähnliche Expressionsmuster zeigen.

IV. Ergebnisse LNCaP-Zellen

1) Experimentelles Vorgehen

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Doktorarbeit sollte die differentielle Expression der Zielgene des Tumorsuppressorgens *PTEN* in der Prostatakrebszelllinie LNCaP untersucht werden. LNCaP-Zellen enthalten einen tetraploiden Chromosomensatz (Gibas et al., 1984). *PTEN* ist nur noch auf zwei von vier Chromosomen 10 vorhanden, die beiden anderen Kopien wurden bei der Translokation auf Chromosom 4 deletiert. Die beiden verbliebenen Gene weisen eine Frameshift-Mutation in Exon 1 auf (Vlietstra et al., 1998). Dabei handelt es sich um eine Deletion in Codon 6 von AAA zu A (Li et al., Science, 1997). Das PTEN-Protein ist nicht vorhanden.

Die Zellen wurden mit dem induzierbaren Vektorsystem pIND (SP1)/pVgRXX transfiziert (No et al., 1996). In einem Fall enthielt der Vektor die Wildtyp-cDNA von *PTEN* (in Abbildungen und Tabellen „PTEN“ genannt), im anderen Fall war kein Gen in den Vektor kloniert („pIND“ abgekürzt). 24 Stunden nach der Induktion durch Ponasteron A wurden die Zellen geerntet, und die RNA wurde isoliert. Während der reversen Transkription wurde die entstehende cDNA mit ³³P-dCTP markiert, und diese Sonden wurden auf Human Cancer- und Human 3.6-Arrays von Clontech hybridisiert.

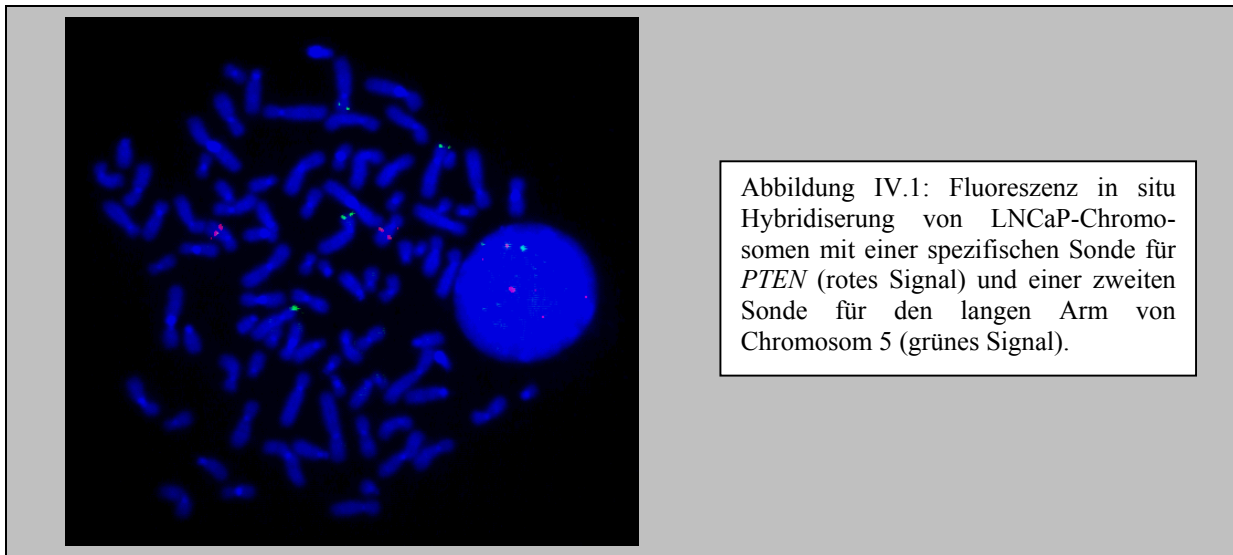
2) Voruntersuchung von LNCaP

LNCaP-Zellen besitzen einen tetraploiden Chromosomensatz (Gibas et al., 1984). Dieser ist jedoch instabil, so dass in verschiedenen Laboratorien unterschiedliche Varianten existieren. Bevor mit den Transfektionsexperimenten mit LNCaP-Zellen begonnen wurde, wurde deshalb mit Hilfe von *Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)* sichergestellt, dass bei der vorliegenden Zelllinie zwei der vier Exemplare von Chromosom 10 eine totale Deletion der *PTEN*-Region enthielten. Außerdem wurde mittels Mutationsanalyse auf *SSCP*-Gelen (*Single Strand Conformation Polymorphism*) gezeigt, dass die beiden verbliebenen *PTEN*-Gene eine Mutation in Exon 1 aufwiesen (siehe Einleitung, Abschnitt 8). Beide in der Literatur beschriebenen Veränderungen konnten bestätigt werden.

2.1) Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Abbildung IV.1 zeigt die Untersuchung der Metaphase-Chromosomen mit FISH mit einer terminalen Sonde für 5p und einer spezifischen Sonde für *PTEN*. Im ersten Teil der Abbildung sieht man deutlich, dass Chromosom 5 als Beispiel für ein unverändertes Chromosom viermal vorliegt (grüne Signale für 5pter), dass man jedoch nur zwei Signale für

PTEN auf Chromosom 10 erhält (rot). Die Analyse mit Sonden für 10q und 10p ergab, dass LNCaP zwar vier Chromosomen 10 besitzt, dass auf zwei Chromosomen die 10q-Region aber vollständig fehlt. Sie ist stattdessen auf Chromosom 4 nachweisbar (keine Abbildung). Bei diesem Translokationsvorgang ging das *PTEN*-Gen jedoch verloren.



2.2) SSCP-Analyse (single strand conformation polymorphism)

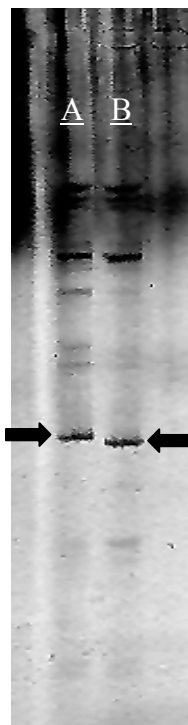


Abbildung IV.2: SSCP-Analyse
A = PCR aus Blut-DNA
B = PCR aus LNCaP-DNA

Bei der molekulargenetischen Charakterisierung von LNCaP-Zellen wurde herausgefunden, dass in Exon 1 des *PTEN*-Gens eine Mutation vorliegt (Li et al., Science, 1997). In Codon 6 ist die Sequenz AAA zu A deletiert. Um nachzuweisen, dass in den verwendeten Zellen tatsächlich eine Mutation vorlag, wurde eine SSCP-Analyse durchgeführt. Dazu wurde jeweils das gesamte Exon 1 aus DNA aus Blut und LNCaP-Zellen mit Hilfe von spezifischen Primern amplifiziert, und die auf dem Gel nachweisbaren Banden wurden verglichen. Dabei sieht man deutlich, dass die unterste der vorhandenen Banden, die jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet ist, bei LNCaP-Zellen etwas weiter gewandert ist als die entsprechende Bande der Blut-DNA (Abbildung IV.2). Es muss also eine Deletion eines oder mehrerer Nukleotide oder eine Mutation innerhalb von Exon 1 vorliegen.

3) Transfektion von LNCaP-Zellen mit dem Wildtyp-*PTEN*-Gen

Um eine optimale *Transfektion* der Prostatakrebs-Zelllinie LNCaP zu gewährleisten, wurden LNCaP-Zellen zunächst mit einem GFP-Konstrukt unter Anwendung verschiedener Transfektions-Agenzien transfiziert. Nach 24 Stunden wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen festgestellt. Am besten schnitt bei diesem Vergleich das Transfektionsagens „Lipofectamine“ von Gibco BRL/Life Technologies ab. Die Transfektionsrate lag hier bei 80 %. Die beiden anderen Transfektionsagenzien Gene Shuttle-20 (Quantum) und Gene PORTER 2 (PeqLab) ergaben eine Transfektionsrate von 50 bis 60 %.

Anschließend wurden die LNCaP-Zellen mit Hilfe von Lipofectamine nun mit dem induzierbaren Vektor pIND (SP1) mit und ohne *PTEN*-Insert und dem Vektor pVgRXR transfiziert. Nach der Antibiotikaselektion und der Induktion der Expression durch Ponasteron A wurde aus einem Teil der Zellen RNA isoliert und eine *RT-PCR* mit *PTEN*-spezifischen Primern durchgeführt. Dabei wurde ein Primer so gewählt, dass er genau auf der in LNCaP-Zellen mutierten Region lag. Der Primer sollte nur Wildtyp-cDNA amplifizieren und auf diese Weise eine Unterscheidung zwischen Wildtyp- und mutierter cDNA möglich machen, da LNCaP-Zellen zwar kein funktionelles PTEN-Protein enthalten, jedoch eine mRNA mit einer Deletion in Exon 1 vorhanden ist. Trotz mehrerer Wiederholungen zeigte die RT-PCR immer wieder das gleiche Ergebnis: Die RNA aus *PTEN*-transfizierten LNCaP-Zellen und solchen, die nur das leere Konstrukt enthielten, ergab Banden gleicher Intensitäten. Das zeigt, dass es mit Hilfe dieser Primer nicht gelingen konnte, die Expression von Wildtyp-*PTEN* nachzuweisen, weil die Bindung an die entsprechende Region in Exon 1 zu unspezifisch war.

Ein anderer Teil der Zellen wurde nach der Induktion der PTEN-Expression über eine Woche lang beobachtet. Eigentlich sollte durch die Expression von exogenem *PTEN* der AKT-Kinase-Weg blockiert und damit die Apoptose oder Anoikis der LNCaP-Zellen eingeleitet werden (Di Cristofano et al., 2000; Brunet et al., 1999). Die Zellen zeigten jedoch innerhalb von 96 Stunden keine Anzeichen von Zelltod.

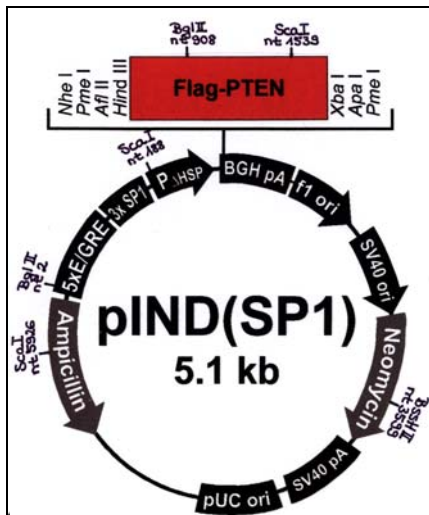
Schließlich wurden die induzierten Zellen auf Objektträgern ausgestrichen, mit Aceton fixiert und einer *Immunocytochemie* mit PTEN-spezifischen Antikörpern unterzogen. Trotz Verwendung verschiedener Fixierungsmethoden, Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten konnte eine spezifische Färbung der Zellen nicht erreicht werden. Zunächst gingen wir davon aus, dass die Induktion der *PTEN*-Expression durch 5 µM Ponasteron A nur unzureichend gewesen war und wiederholten die Induktion mit der doppelten Menge

Ponasteron A-Lösung. Doch das Ergebnis blieb das gleiche. Weder waren Anzeichen von Apoptose zu entdecken, noch ließen sich die Zellen mit einem PTEN-spezifischen Antikörper anfärben.

Als weitere mögliche Ursache wurde vermutet, dass das *PTEN*-Gen, der Promotor oder eine essentielle Region auf dem pVgRXR-Konstrukt bei der Integration der Vektoren in die genomische DNA der LNCaP-Zellen beschädigt worden war. Um dieses Problem zu umgehen, wurde der Vektor vor der Transfektion mit Pvu I *linearisiert* und die Transfektion mit den linearen Vektoren wiederholt. Pvu I schneidet den Vektor innerhalb des Ampicillin-Resistenzgens, das nur während der Vermehrung des Konstruktes in *E. coli* eine Rolle spielt. Durch die Linearisierung wird die Bildung von Konkatameren möglich. Auf diese Weise erfolgt immer eine Integration mehrerer Vektoren am Stück, und die Funktionalität einiger Vektoren bleibt erhalten. Doch wieder konnte keine PTEN-Expression beobachtet werden.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem vorliegenden Konstrukt wirklich um den induzierbaren Vektor pIND (SP1) mit kloniertem *PTEN*-Gen handelte, wurde eine *Restriktionsanalyse* mit drei verschiedenen Enzymen durchgeführt. Entsprechend der Restriktionskarte, die die Firma Invitrogen auf ihrer Homepage zur Verfügung stellt, und anhand der Sequenz des *PTEN*-Gens konnten Anzahl und Größe der zu erwartenden Fragmente festgelegt werden (siehe Abbildung IV.3 A). Wie man in Abbildung IV.3 B sieht, sind diese Fragmente auf einem 3%-Agarosegel tatsächlich nachweisbar.

Zusätzlich wurden Promotor, die klonierte cDNA und die Region in 3'-Richtung vom klonierten Gen (insgesamt ca. 2 kb) sequenziert, um mögliche Punktmutationen zu detektieren. Die Sequenzanalyse zeigte keine Auffälligkeiten. Das induzierbare *PTEN*-Konstrukt schien folglich funktionsfähig zu sein.



Folgende Fragmente waren bei der durchgeführten Restriktionsanalyse des induzierbaren *PTEN*-Konstruktes mit den Enzymen Bgl II, BssH II und Sca I zu erwarten:

2327 bp
1892 bp
720 bp
633 bp
453 bp
186 bp

Abbildung IV.3 A: links: Restriktionskarte des Vektors pIND (SP1) mit *PTEN*-cDNA; rechts: bei der Restriktion erwartete Fragmentgrößen.

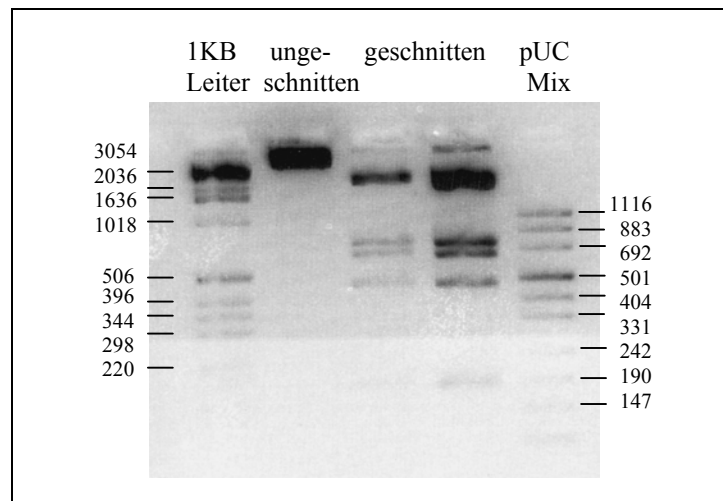


Abbildung IV.3 B: Agarosegel, auf dem der Vektor nach der Restriktion mit Bgl II, BssH II und Sca I mit dem ungeschnittenen Vektor verglichen und die Größen der entstandenen Fragmente kontrolliert wurden; um alle Banden deutlich sehen zu können, wurden verschiedene Mengen des Restriktionsansatzes aufgetragen; die sichtbaren Banden entsprechen den in Abbildung 3 A aufgelisteten Fragmenten.

Um die korrekte Funktion des Helfer-Vektors pVgRXR sicherzustellen und gleichzeitig die Transfektionsmethode nochmals zu überprüfen, wurden die bereits transfizierten Zellen zusätzlich mit einem pIND (SP1)-LacZ-Konstrukt und mit einem konstitutiv GFP-exprimierenden Vektor transfiziert und die Expression induziert. Der Vergleich von β -Galactosidase- und GFP-Expression zeigte, dass zwar etwa 50 % der Zellen GFP bildeten, jedoch nur ca. 2 bis 3 % β -Galactosidase. Die Transfektionsmethode war also in Ordnung, offensichtlich war aber die Induktion des pIND (SP1)-Konstrukts unzureichend. Das Problem musste also im pVgRXR-Vektor bzw. in einer unzureichenden Expression des Rezeptors VgEcR/RXR zu finden sein.

In verschiedenen Publikationen wurde bereits berichtet, dass in transfizierten Zellen die eingeführten Konstrukte durch Methylierung abgeschaltet werden (Di Ianni et al., 2000; Singal et al., 2001). Um eine mögliche Methylierung wieder zu beseitigen, wurden die transfizierten LNCaP-Zellen 96 Stunden mit 10 mM *Azacytidin* behandelt (Sorm et al., 1964; Ginder et al., 1983). Erst danach erfolgten Induktion und RNA-Isolierung. Um das exogene *PTEN* vom endogenen unterscheiden zu können, wurde außerdem in der RT-PCR ein neuer Primer eingesetzt. Seine Sequenz war homolog zur Sequenz der Flag-Markierung, die vor dem Wildtyp-*PTEN*-Gen liegt. Der zweite Primer lag weiterhin in Exon 4 des *PTEN*-Gens. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass nur das exogene *PTEN* mit Flag-Markierung amplifiziert werden konnte.

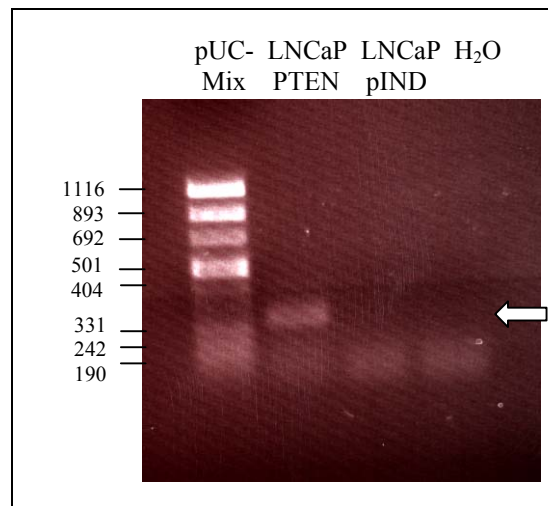


Abbildung IV.4: RT-PCR mit einem Flag- und einem *PTEN*-spezifischen Primer; „LNCaP *PTEN*“ steht für RNA, die aus mit *PTEN*-transfizierten Zellen gewonnen wurde. „LNCaP pIND“ bedeutet, dass die Zellen nur den leeren Vektor enthielten.

Die entsprechende PCR zeigte eine erfolgreiche Expression von exogenem *PTEN* in den transfizierten LNCaP-Zellen (Abbildung IV.4). Um sicherzustellen, dass die beobachtete Bande nicht durch eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA mit dem integrierten Konstrukt resultieren konnte, wurde außerdem statt cDNA RNA in die PCR mit dem Flag-Primer eingesetzt. Wie erwartet konnte kein Produkt nachgewiesen werden.

Für eine Expression des exogenen *PTEN* spricht außerdem, dass die *PTEN*-transfizierten Zellen im Gegensatz zu solchen Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden, nach der Induktion kaum noch Wachstum zeigten (Abbildung IV.5). Um die Auswirkung von *PTEN* auf das Wachstum der transfizierten LNCaP-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Transfektion und der Induktion 96 Stunden lang beobachtet und ihre Anzahl alle 24

Stunden festgestellt. Dabei ergab sich, dass Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert worden waren, normales, exponentielles Wachstum zeigten, während solche Zellen, die exogenes *PTEN* exprimierten, sich in ihrer Anzahl kaum veränderten. Während die LNCaP-Zellen ohne *PTEN* sich relativ gleichmäßig über den Boden der Zellkulturschale verteilten und eine eher längliche, für Epithelzellen typische Form einnahmen, wuchsen die *PTEN*-transfizierten Zellen in Kolonien und zeigten eine eher kompakte Form. Eine durch *PTEN* induzierte Apoptose war nicht sichtbar.

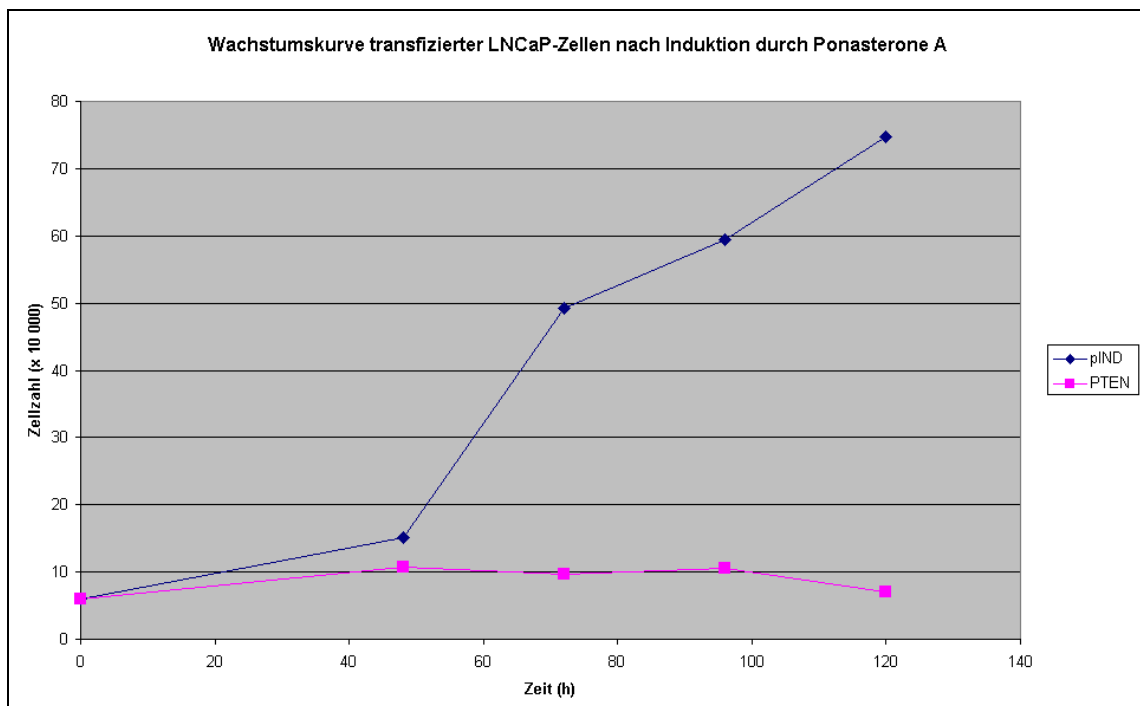


Abbildung IV.5: Wachstumskurve von transfizierten Zellen nach der Induktion durch Ponasterone A; das Wachstum von Zellen, die mit dem *PTEN*-Konstrukt transfiziert wurden, wird durch pinkfarbene Punkte dargestellt; blaue Punkte repräsentieren Zellen, die den leeren Vektor enthalten.

Zusätzlich zur RNA wurde aus den transfizierten und induzierten Zellen 96 Stunden nach Beginn der Induktion DNA isoliert. Diese wurde auf einem 1 %-Agarosegel aufgetrennt. Begehen Zellen Apoptose, so kommt es zu einer Fragmentierung der genomischen DNA (Peitsch et al., 1993; Walker et al., 1993). Dabei entstehen zunächst 300 bp große Bruchstücken, die anschließend zu Fragmenten von 50 bp degradiert werden. Diese Fragmente müssten auf einem Gel nachweisbar sein. Hier war jedoch kein Unterschied zwischen LNCaP-Zellen mit und ohne *PTEN* sichtbar.

Nachdem durch die oben beschriebenen Versuche die Expression von exogenem *PTEN* in LNCaP-Zellen sichergestellt worden war, wurde aus den induzierten Zellen RNA mit Hilfe

des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert. Die Qualität der RNA wurde vom BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum) der Universität Düsseldorf auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer überprüft (Abbildung IV.6). Bei der RNA aus transfizierten und induzierten LNCaP-Zellen handelt es sich um RNA von sehr guter Qualität. Die beiden Banden der 18S und 28S ribosomalen RNAs sind deutlich sichtbar.

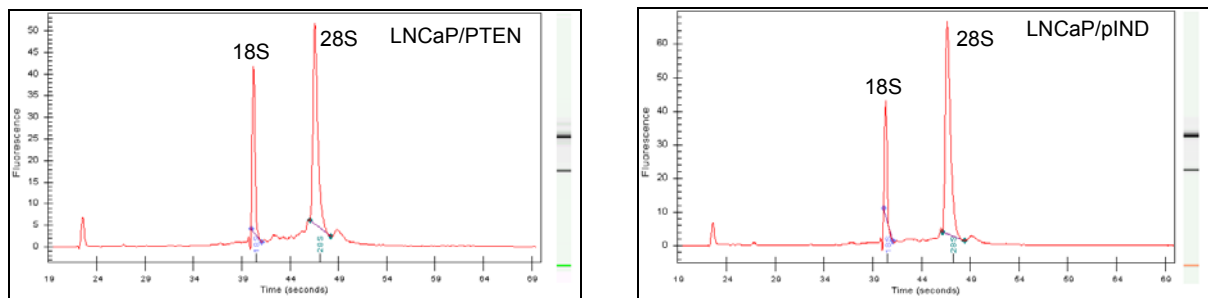


Abbildung IV.6: Untersuchung der RNA-Qualität für LNCaP-Zellen mit und ohne PTEN mittels Agilent 2100 Bioanalyzer. Links ist jeweils die aus der Untersuchung resultierende Grafik dargestellt. Die beiden Signale der ribosomalen Banden sind deutlich sichtbar. Aus diesen Werten wurde ein Bandenmuster errechnet, das rechts neben der dazugehörigen Grafik zu sehen ist. Durch degradierte RNA hervorgerufener Hintergrund ist nicht vorhanden.

4) Western Blot

Um die Expression von exogenem PTEN auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden parallel zu den Array-Experimenten Western Blots durchgeführt. Zunächst sollte PTEN mit Hilfe des in der Immunhistochemie der Gefrierschnitte verwendeten Anti-PTEN-Antikörpers (Zymed) nachgewiesen werden. Alternativ wurde ein Anti-Flag-Antikörper verwendet, da das transfizierte Wildtyp-PTEN-Gen eine Flag-Markierung enthält. Mit keinem der beiden Antikörper ließ sich exogenes PTEN nachweisen. Während der Flag-Antikörper viele unspezifische Signale hervorrief, konnte mit Hilfe des PTEN-Antikörpers gar keine Bande sichtbar gemacht werden. Darum wurden die extrahierten Proteine mit einem Antikörper untersucht, der für die phosphorylierte Form der AKT-Kinase (AKT-P) spezifisch ist. In Anwesenheit von PTEN wird AKT dephosphoryliert. Folglich sollte für die PTEN-transfizierten Zellen keine Bande sichtbar sein, während Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert worden waren, die phosphorylierte Form der Akt-Kinase enthalten sollten. Genau dieser Sachverhalt ist in Abbildung IV.7 sichtbar. Vor der Behandlung mit Antikörpern war der vollständige Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran mit Hilfe von Ponceau-S-Lösung überprüft worden. Dazu wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Hier zeigte sich, dass die Spuren der PTEN-haltigen und PTEN-freien Zellen ähnlich starke Intensitäten zeigten. Damit ist ausgeschlossen, dass die PTEN-transfizierten Zellen nur darum keine Bande für die phosphorylierte Form von AKT zeigen, weil die entsprechende Spur kaum oder

kein Protein enthielt. Eigentlich sollte die Tatsache, dass das Gel mit äquivalenten Proteinmengen geladen wurde, zusätzlich durch den Nachweis von α -Tubulin mit Hilfe eines entsprechenden Antikörpers bestätigt werden. In keinem Fall war eine α -Tubulin-Bande nachweisbar. Das lag vermutlich daran, dass der Antikörper einer neuen Charge entstammte, deren Reaktivität nicht der der alten Charge entsprach.

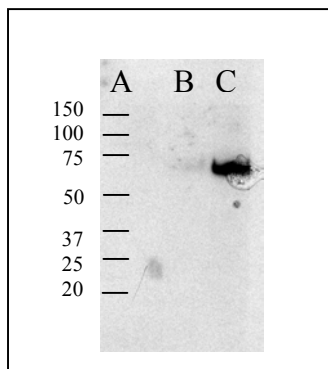


Abbildung IV.7: Western Blot mit Anti-Akt-P-Antikörper;
Spur A = Proteinmarker, Spur B = LNCaP PTEN,
Spur C = LNCaP pIND;
Akt-P-Antikörper 1:500 verdünnt, Hybridisierung
über Nacht; sekundärer Antikörper 1:5000 verdünnt,
Hybridisierung für eine Stunde; Größe des Akt-P-
Proteins ca. 60 kDa.

5) Quantitative Realtime RT-PCR

Nachdem die RNA aus *PTEN*-transfizierten und induzierten LNCaP-Zellen untersucht worden war und erste Ergebnisse vorlagen, schien es erstaunlich, dass relativ wenige Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne *PTEN* feststellbar waren. Bei einer Gesamtzahl von 4197 untersuchten Genen hätten wir eine größere Menge an differentiell exprimierten Genen erwartet. Da es beim Etablieren der transfizierten LNCaP-Zellen wie oben dargestellt wiederholt zu Schwierigkeiten gekommen war, sollte das Verhältnis der *PTEN*-mRNAs in *PTEN*-transfizierten Zellen und Zellen mit einem leeren Vektor genauer quantifiziert werden. Dazu wurde eine quantitative Realtime RT-PCR nach der TaqMan-Methode durchgeführt. Die im Materialteil beschriebenen Reaktionsansätze wurden für jede zu untersuchende Probe in dreifacher Ausführung angesetzt und vermessen. Abbildung IV.8 zeigt die graphische Darstellung der Realtime RT-PCR. In Tabelle IV.1 sind zusätzlich die Ergebnisse der LNCaP-Zellen aufgelistet. In beiden Fällen wurde aus den drei jeweils zusammengehörigen C_T -Werten ein Mittelwert berechnet.

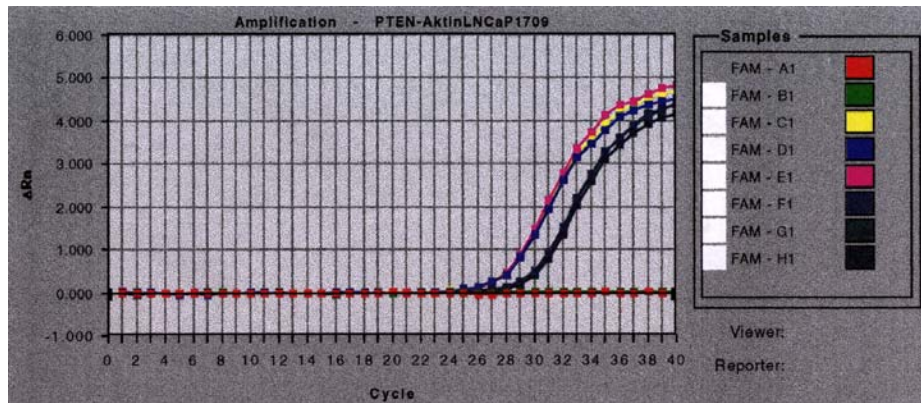


Abbildung IV.8: Graphischer Verlauf der Realtime PCR von transfizierten LNCaP-Zellen mit PTEN-Primern; rote und grüne Kurve = negative Kontrolle; gelbe, blaue und pinke Kurve = *PTEN*-transfizierte Zellen; dunkelblaue, dunkelgrüne und schwarze Kurven = mit leerem Vektor transfizierte Zellen.

Probe	C _T PTEN	Mittelwert C _T PTEN	C _T Aktin	Mittelwert C _T Aktin
Negativkontrolle	40,000	40,000	40,000	40,000
Negativkontrolle	40,000		40,000	
LNCaP <i>PTEN</i>	26,692	26,794	20,711	20,647
LNCaP <i>PTEN</i>	26,997		20,656	
LNCaP <i>PTEN</i>	26,692		20,573	
LNCaP pIND	28,656	28,695	21,712	21,779
LNCaP pIND	28,548		21,872	
LNCaP pIND	28,881		21,753	

Tabelle IV.1: C_T-Werte von LNCaP-Zellen mit und ohne Wildtyp-*PTEN*.

In Abschnitt 6.5 des Methoden-Teils wird die Gleichung $X_{N,kal} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$, die die Grundlage der vergleichenden C_T-Wert-Methode bildet, schrittweise hergeleitet. Mit ihrer Hilfe lässt sich anhand der gemessenen C_T-Werte das Verhältnis der mRNA-Mengen eines Gens in zwei unterschiedlichen Proben berechnen. Setzt man in diese Gleichung die in Tabelle 1 aufgelisteten Mittelwerte des jeweiligen C_T-Werts ein, so ergibt sich für das Verhältnis von *PTEN*-mRNA in LNCaP-Zellen, die mit einem Wildtyp-*PTEN*-Konstrukt transfiziert wurden, zu solchen LNCaP-Zellen, die nur den leeren Vektor enthalten, ein Wert von 1,7. Ginge man davon aus, dass eine Normalisierung der C_T-Werte durch Einbezug von Aktin in die Berechnung keinen Sinn ergibt, was zur Zeit umstritten ist, da auch Aktin möglicherweise differentiell exprimiert wird, so läge der berechnete Faktor etwas höher (siehe Diskussion). Insgesamt ist in *PTEN*-transfizierten Zellen etwa doppelt so viel *PTEN*-mRNA nachweisbar wie in Zellen ohne *PTEN*-Konstrukt.

6) Ergebnisse der Expressionsanalyse

Mittels Reverser Transkription wurden aus der RNA aus transfizierten und induzierten LNCaP-Zellen ohne vorhergehende Amplifikation radioaktive Sonden hergestellt. Mit diesen Sonden wurden der Human Cancer 1.2 Array sowie die Human 3.6 Arrays von Clontech hybridisiert. Zunächst wurde jedes Experiment dreimal durchgeführt. Dabei wurde für jeden Array-Typ (Human Cancer, Human I, Human II, Human III) ein Satz bestehend aus jeweils zwei Arrays benutzt. Da die DNA-Menge, die in den einzelnen Spots auf den Arrays enthalten ist, von Array zu Array variieren kann, wurden die Arrays abwechselnd mit RNA aus PTEN-haltigen und PTEN-freien Zellen hybridisiert. Wenn im ersten Versuch also Array A mit RNA aus *PTEN*-transfizierten Zellen hybridisiert worden war und Array B mit RNA aus LNCaP-Zellen ohne PTEN, so war es im folgenden Versuch umgekehrt. Dadurch sollten falsche Resultate, die durch unterschiedliche DNA-Mengen auf den Arrays hervorgerufen werden können, herausgefiltert werden.

Für die Synthese der radioaktiven Sonden wurde zwar immer die gleiche Menge an RNA eingesetzt; eine Kontrolle, wie erfolgreich der Einbau der radioaktiven Nukleotide bei den einzelnen Synthesen war, erfolgte jedoch nicht, da kein Szintillationszähler zur Verfügung stand. Die Intensität der radioaktiven Sonden konnte sich also von Fall zu Fall unterscheiden. Folglich konnten die absoluten Werte, die bei den verschiedenen Experimenten erzielt wurden, nicht miteinander verglichen werden. Interessant war dagegen der Faktor, um den sich die Expressionsintensitäten der einzelnen Gene unterschieden. War die Tendenz (z.B. dass die Expression eines bestimmten Gens bei PTEN-haltigen Zellen immer um das vier- bis fünffache höher war als bei PTEN-freien Zellen) in allen drei Versuchen gleich, so erschien das entsprechende Gen als möglicher Kandidat, der durch die Expression von *PTEN* reguliert wird.

Nachdem das Expressionsmuster von LNCaP-Zellen mit und ohne PTEN auf diese Weise auf den Human Cancer Arrays untersucht worden war, ergab sich eine Liste von 18 Genen, die möglicherweise einem Einfluss von PTEN unterliegen. Drei Gene waren in *PTEN*-transfizierten Zellen höher exprimiert als in Zellen ohne PTEN. Bei 15 Genen lag ein umgekehrtes Verhältnis vor. Alle Gene sind in Tabelle IV.2 aufgelistet.

		LNCaP pIND (RNA)			LNCaP PTEN (RNA)		
Label	Name						
B02f	KIAA0135	-0,6	0,7	0,9	9,5	2,7	2,1
D12n	semaphorin E (SEMAE)	-0,2	0,2	0,9	4,9	2	2,4
D12f	opioid-binding protein/cell adhesion molecule (OBCAM); opioid-binding cell adhesion molecule (OPCML)	0,6	-0,8	1,3	4,4	4,5	2,6
C06j	PRB-binding protein E2F1; retinoblastoma-binding protein 3 (RBBP3); retinoblastoma-associated protein 1 (RBAP1); PBR3	3,4	2	2,2	1,4	0,5	1,1
A14b	c-fos proto-oncogene; G0S7 protein	4,2	4,4	4,5	0,1	-0,1	0,9
C13d	apoptosis inhibitor 4 (API4); survivin; baculoviral IAP repeat-containing protein 5 (BIRCP5)	4,1	5,8	5,1	0,1	-0,3	1
A12i	cyclin G2 (CCNG2)	7,5	9,1	14,1	2,1	3,7	4,6
C07e	HSIAH2, seven in absentia homolog	2,1	3,7	3,1	-1	-0,1	0,5
D05g	cadherin 12 (CDH12); brain cadherin (BR-cadherin); neural cadherin 2 (NCAM2) cadherin 2)	5,9	9	10,2	1,5	1,9	3,3
A01j	cyclin I	5,2	5	3,2	0,5	0,2	0,9
D04k	GABA-B receptor 1A subunit (GABA-BR1A)	11,9	4,6	4,5	0,7	0,3	0,8
C14k	cAMP-responsive element modulator 1 alpha protein (HCREM)	11,6	6,5	3,7	-1,2	0,8	0,9
A11d	papillary thyroid carcinoma-encoded protein + RET proto-oncogene	5,2	12,6	8,8	0,7	-0,2	1,3
D04l	low-density lipoprotein receptor-related protein LR11	7,7	6,5	4	0,9	1,3	0,8
A10d	met proto-oncogene; hepatocyte growth factor receptor (HGF receptor; MET) HGFR)	9,7	4,5	5,8	-1,4	-0,1	1,3
F02n	KIAA0137, tousled like kinase	3,3	5,1	5,5	1,1	1,1	0,8
C06c	BCL2-like 2 (BCL2L2); BCL-W; KIAA0271	2,5	2,8	2,4	-5	0,6	0,8
D01h	desmocollin 2A/2B (DSC2); DSC3; desmosomal glycoprotein II/III (DGII/III)	11,3	7,6	9,1	1,8	1,2	2

Tabelle IV.2: Gene auf dem Human Cancer Array, die möglicherweise durch PTEN reguliert werden.

Zur Kontrolle dieser Ergebnisse wurden drei weitere Experimente mit einem neuen Array-Satz durchgeführt. Die zuvor erhaltenen Ergebnisse ließen sich nur für sechs Gene reproduzieren. Dabei handelte es sich um folgende Gene: *RBP-binding Protein E2F1* (C06j), *seven in absentia homolog 2* (HSLAH2; C07e), *apoptosis inhibitor 4/Survivin* (C13d), *desmocollin 2A/2B* (D01h), *low-density lipoprotein receptor-related protein LR11* (D04l) und *KIAA0137/tousled-like kinase* (TLK1; F02n). Diese Gene werden in Abbildung IV.9 durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die Werte für die übrigen Gene zeigten entweder eine deutlich geringere Differenz als zuvor festgestellt, oder die Tendenz einer differentiellen Expression war vollständig verschwunden.

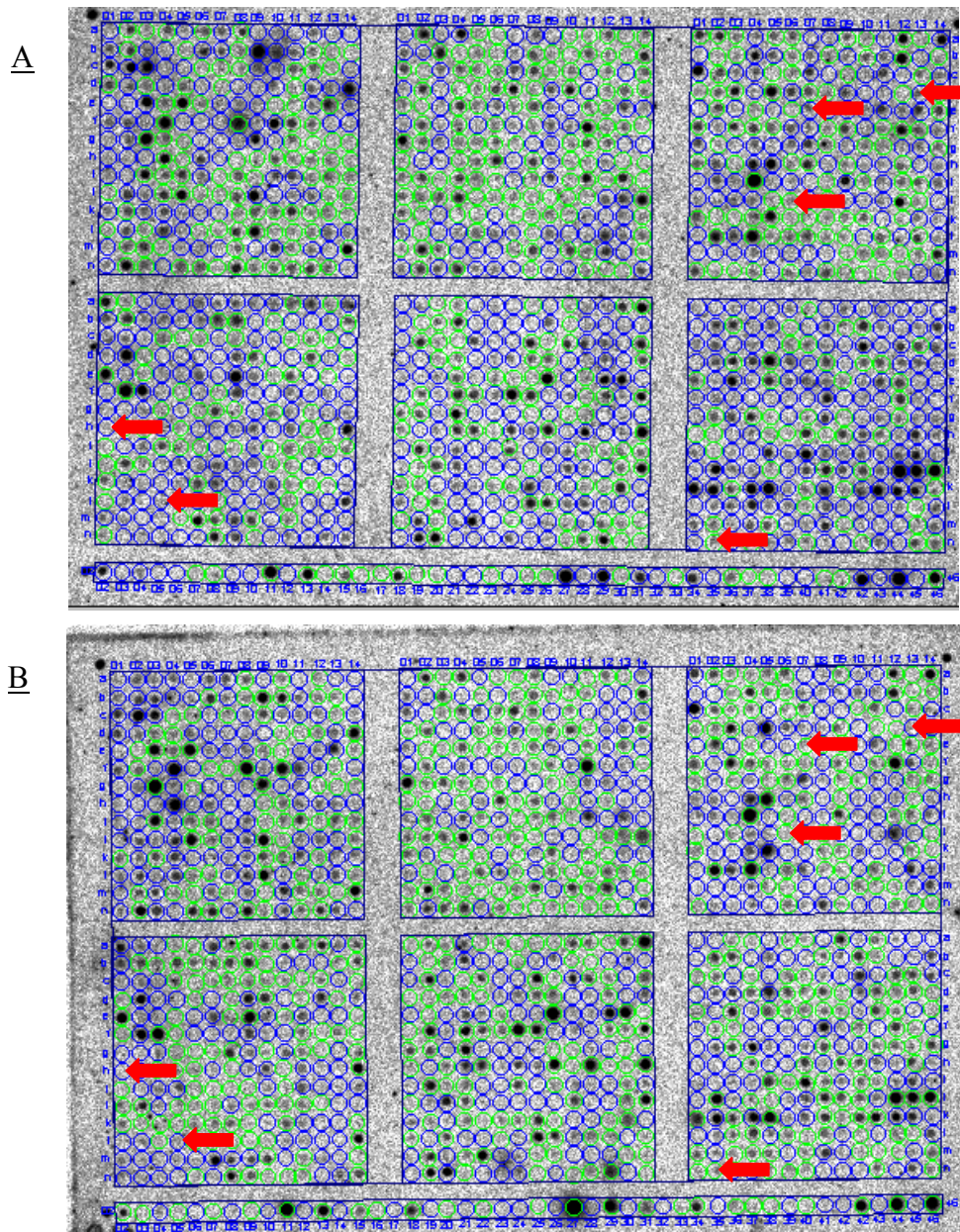


Abbildung IV.9: A) Human Cancer Array, der mit einer Sonde aus RNA von LNCaP-Zellen hybridisiert wurde, die mit dem leeren Vektor transfiziert waren; B) Human Cancer Array, der mit einer Sonde aus RNA von LNCaP-Zellen hybridisiert wurde, die exogenes *PTEN* exprimieren. Die möglicherweise differenziell exprimierten Gene sind mit roten Pfeilen markiert.

Um die mittels der Human Cancer-Arrays erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde die aus den transfizierten und induzierten LNCaP-Zellen gewonnene RNA revers transkribiert und jeweils mit zwei Primerpaaren amplifiziert. Das erste Primerpaar war spezifisch für eines der sechs zu untersuchenden Gene. Die Sequenz war die gleiche wie in dem Primer-Gemisch von Clontech, das für die Herstellung der radioaktiven Sonden verwendet worden war. Zusätzlich wurde ein GAPDH-Primer eingesetzt. Er diente zur Normalisierung der für die Clontech-

Primer auftretenden Bandenintensitäten, da man davon ausgehen kann, dass GAPDH nicht durch die Expression von *PTEN* beeinflusst wird (siehe Diskussion). Dadurch sollten Fehler, die durch schwankende RNA-Mengen aufgrund von Pipettierfehlern auftreten können, sichtbar gemacht werden.

Die RT-PCR bestätigte die differentielle Expression von drei Genen. *SIAH2* (C07e), *low-density lipoprotein receptor-related protein LR11* (D04I) und die *tousled-like kinase* (F02n) zeigten auch bei der RT-PCR die entsprechenden Unterschiede zwischen *PTEN*-transfizierten LNCaP-Zellen und Zellen ohne *PTEN*. In Abbildung IV.10 A sieht man, dass die GAPDH-Bande für PTEN bei einer bestimmten Zyklenzahl immer schwächer ist als die entsprechende Bande für pIND. Da man davon ausgeht, dass GAPDH in beiden Fällen im gleichen Umfang exprimiert wird, kann man also den Schluss ziehen, dass in die RT-PCR für pIND etwas weniger RNA eingesetzt wurde als für PTEN. Umgekehrt ist aber für *SIAH2* nur in den Spuren von pIND eine Bande sichtbar, bei PTEN fehlt sie auch nach 40 Zyklen noch vollständig. Das bedeutet, dass in Zellen ohne *PTEN* eine deutlich größere Menge an *SIAH2*-mRNA vorliegen muss als in *PTEN*-transfizierten Zellen, bzw. dass die mRNA in Anwesenheit von PTEN vollständig fehlt. Auch bei der Untersuchung mit Hilfe der Human Cancer Arrays ergab sich für Zellen mit exogenem *PTEN* für *SIAH2* immer ein Wert von null. Abbildung IV.10 B zeigt die unterschiedliche Expression von *LR11* in LNCaP-Zellen mit und ohne *PTEN*. Zum Vergleich sind die Banden für pIND bei 35 Zyklen und PTEN bei 40 Zyklen gut geeignet. Hier stimmen die Intensitäten der *GAPDH*-Banden überein. Die Bande für *LR11* hingegen ist bei pIND sichtlich stärker ausgeprägt als bei PTEN. Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden, enthielten also mehr *LR11*-mRNA als solche Zellen, die exogenes PTEN exprimieren.

Das Ergebnis der *tousled-like kinase* (*TLK1*) ist in Abbildung IV.10 C dargestellt. Betrachtet man die Proben nach 20 und 25 Zyklen, so stellt man fest, dass die Banden der *tousled-like kinase* für Zellen mit und ohne PTEN etwa übereinstimmen, während auch hier die GAPDH-Bande für pIND jeweils schwächer ist als für PTEN. Würde man die PCR der pIND-Proben so lange weiterlaufen lassen, bis die Menge des PCR-Produkts mit der von PTEN bei 20 bzw. 25 Zyklen übereinstimmt, so würde gleichzeitig auch die Intensität der *tousled-like-kinase*-Bande deutlich zunehmen und die der bei PTEN vorhandenen Bande deutlich übersteigen. Auch hier liegt also bei Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, mehr mRNA des zu untersuchenden Gens vor als bei PTEN-haltigen Zellen.

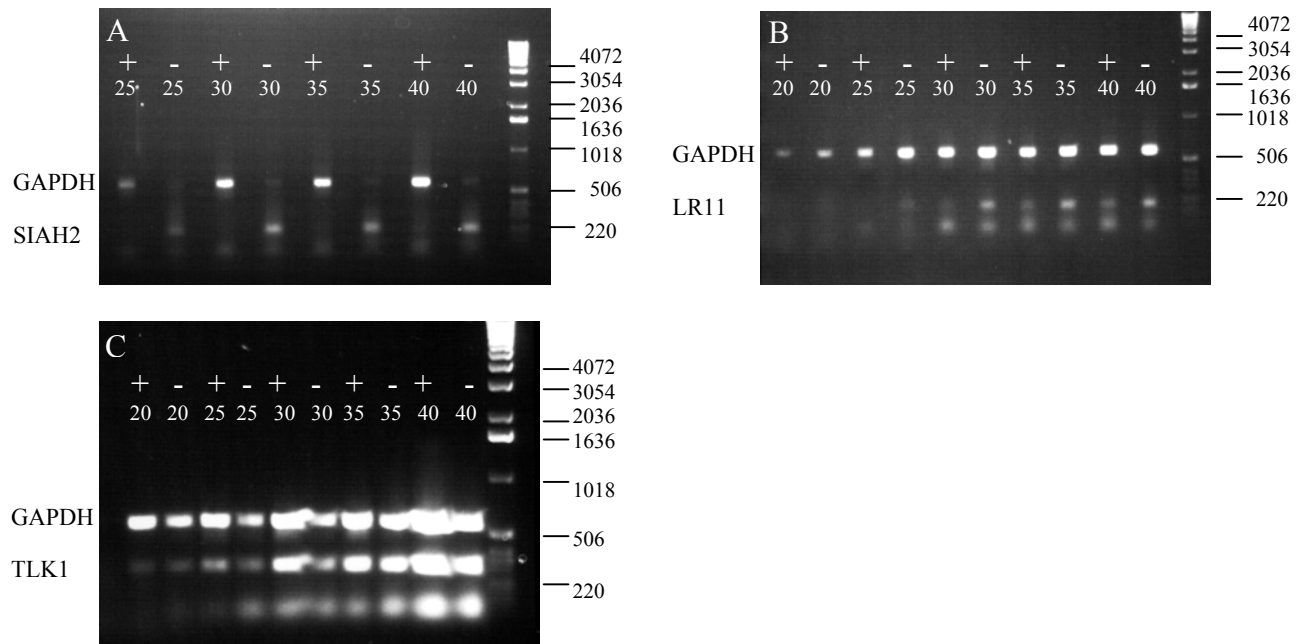


Abbildung IV.10: RT-PCR zur Überprüfung der Array-Ergebnisse; A = *SIAH2*; B = *LR11*; C = tousled-like kinase (*TLK1*); PTEN (+) und pIND (-) wurden abwechselnd aufgetragen; die Zahlen über den Banden geben die Zyklenzahl an, bei der die entsprechende Probe entnommen wurde; rechts befindet sich jeweils die 1 KB-Leiter.

Im Gegensatz zu diesen beiden Genen unterliegt die Expression von *Desmocollin 2* (D01h) entsprechend dem Ergebnis der RT-PCR keiner Regulation durch PTEN. Alle vorhandenen Banden besitzen eine ähnliche Intensität. Hinsichtlich *E2F1* (C06j) und *Survivin* (C13d) scheint der Einfluss von PTEN sogar gegenteilig zu dem zu sein, worauf die Ergebnisse der Arrays hindeuten. Die Expression der Kandidatengene war jeweils bei *PTEN*-transfizierten Zellen etwas stärker als bei Zellen ohne *PTEN*. Im Fall von *E2F1* waren die Banden für *E2F1* gleich stark, die GAPDH-Bande war bei PTEN jedoch schwächer als bei pIND. Bei der Untersuchung von *Survivin* stimmten die GAPDH-Banden überein, PTEN-haltige LNCaP-Zellen zeigten aber eine intensivere Expression von *Survivin* als Zellen ohne *PTEN*.

Auch auf den Human 3.6 Arrays wurden Gene gefunden, die möglicherweise einer Regulation durch PTEN unterliegen. Sie sind in Tabelle IV.3 zusammengefasst. Auch in diesem Fall müssten die durchgeführten Experimente zunächst mit einem zweiten Satz Arrays wiederholt und anschließend mit Hilfe einer RT-PCR verifiziert werden. Leider fehlte dazu im Rahmen dieser Doktorarbeit die Zeit.

Label	Name	pIND 0508	pIND 1709	pIND 2009	PTEN 0508	PTEN 1709	PTEN 2009
D05l	ets-related gene transforming protein (ERG1)	7,9	7,1	6,2	2,6	4,7	0,2
B09j	ETV1, ER81 (ETS translocation variant 1, Protein ER81)	0,1	1,5	0,9	4,3	5,6	6,8
B06k	lymphocyte cytosolic protein 1 (LCP1); L-plastin; plastin 2 (PLS2)	4,6	3,7	6,8	1	1,5	2,2
F13f	KIAA0056	6	3,7	3,7	1,6	2,3	2,1
F06b	calpain inhibitor; calpastatin (CAST); sperm BS-17 component	6,3	4,1	3	1,3	1,3	1,8
F12e	cytosolic dynein heavy chain (DYHC)	11,5	10,4	9,7	4,8	7,2	2,2
F14c	atrophin-1; dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein (DRPLA)	12	22	12,3	6,3	9,9	6
B07h	ZINC-ALPHA-2-GLYCOPROTEIN (ZN-ALPHA-2-GLYCOPROTEIN) (ZN-ALPHA-2-GP)	1,5	1,4	2,1	4,1	6,6	7,3
E07i	PROTEIN PHOSPHATASE 2C ALPHA 2	1,6	2,2	2,8	6	4,7	6,5
D05j	PACE4D	5,3	8,3	6,1	2,7	4	3,9
F10j	SH3 DOMAIN BINDING GLUTAMIC ACID-RICH-LIKE PROTEIN	2,2	3,5	2,6	1,1	0,8	1,5

Tabelle IV.3: Gene der Human 3.6 Arrays, die möglicherweise in PTEN-positiven und -negativen LNCaP-Zellen differentiell exprimiert werden.

7) Vergleich von Human Cancer Arrays und Human 3.6 Arrays

Für die Expressionsanalysen von Prostata Tumoren und transfizierten LNCaP-Zellen wurden in dieser Doktorarbeit vier verschiedene Nylonarrays benutzt: der Human Cancer 1.2 Array und die drei Human 1.2 Arrays I, II und III (zusammen als Human 3.6 bezeichnet). Auf jeden Array sind cDNAs für 1222 verschiedene Gene gespottet. Dabei findet man eine Schnittmenge von Genen, die auf dem Human Cancer und einem der Human 3.6 Arrays vorhanden sind. Abgesehen von den neun „housekeeping“-Genen existieren zwischen Human Cancer und Human I Array 461 Übereinstimmungen, während Human Cancer und Human II 46 gemeinsame Gene haben. Zwischen Human Cancer und Human III Array findet sich laut Aussage der Firma Clontech außer den „housekeeping“-Genen keine Übereinstimmung.

Bei der Untersuchung von RNA aus transfizierten LNCaP-Zellen und der Auswertung der Arrayergebnisse schienen teilweise auch Spots solcher Gene vorhanden zu sein, deren Expression man in Prostata-Zellen nicht erwarten würde. Unter anderem waren Signale für Gene vorhanden, die eigentlich nur in Lymphozyten oder Leukozyten exprimiert werden. Außerdem zeigten einzelne Gene, die sowohl auf dem Human Cancer als auch auf einem der Human 3.6 Arrays vorhanden waren, unterschiedliche Ergebnisse. Das Signal des *Cadherin 2* Gens liegt laut Human I Array um null, während es auf dem Human Cancer Array zwischen zwei und zehn schwankt (Mittelwert 5,6). Um sicher zu gehen, dass die Arrays nicht vertauscht und die Sonden dementsprechend nicht mit den falschen Primern hergestellt worden waren, wurden in einem Kontrollversuch alle Arrays mit einer Sonde aus LNCaP-RNA und Human Cancer-Primern hybridisiert. Wie erwartet zeigte der Human I-Array relativ

viele Signale, während auf den Human II und III-Arrays nur wenige Spots vorhanden waren. Ein Vergleich mit der von Clontech vorliegenden Tabelle ergab, dass es sich bei den Signalen im Wesentlichen um die entsprechende Schnittmenge von Genen handelte. Allerdings fielen sowohl auf dem Human I als auch auf dem Human II-Array solche Gene auf, die mit Hilfe der Human Cancer Primer eigentlich nicht amplifiziert werden dürften. Auf dem Human I Array waren davon nur einzelne Gene betroffen. Beim Human II Array wurden allerdings 46 Gene gefunden, die fälschlicherweise durch Produkte der Human Cancer Primer hervorgerufen wurden. Auf dem Human III Array existierten 33 Spots, bei denen die entsprechenden Gene nicht mit Hilfe der Human Cancer Primer amplifiziert werden dürften. In diesem Fall lagen fast alle Spots direkt nebeneinander. Es handelt sich fast ausschließlich um Gene, die für ribosomale Proteine codieren. Stichproben der entsprechenden Primer aller drei Arrays wurden mit Hilfe von „BLAST“, einem Programm das eine gegebene DNA-Sequenz mit allen bisher bekannten und in einer Datenbank gespeicherten Genen bzw. Sequenzen vergleicht, hinsichtlich ihrer Spezifität für das dazugehörige Gen untersucht (Altschul et al., 1997). Die Überlegung dazu war, dass bei einer fehlenden Spezifität des Primers möglicherweise auch größere Abschnitte eines auf die Human 3.6 Arrays gespotteten Fragmentes unspezifisch reagieren und mit cDNAs anderer Gene interagieren könnten. Insgesamt wurden die Primer für zehn verschiedene Gene mittels BLAST untersucht. Dabei ergaben sich für vier Primerpaare keine weiteren Homologien. Für das *Prothymosin alpha*-Gen auf dem Human I Array wurde ein Pseudogen gefunden, dessen Sequenzen dem eigentlichen Gen ähneln. Vom *hepatocyte nuclear factor 3* (Human II) gibt es die drei Versionen alpha, beta und gamma. Alle drei zeigen Sequenzhomologien. Die Primer des *ADP-ribosylation factor 1* (Human II) erkannten zusätzlich ein ähnliches Gen, das den Namen *Similar to ADP-ribosylation factor 1* trägt. Besonders viele Homologien zeigt das Gen des ribosomalen Proteins *L9* (Human III). Die entsprechenden Primer erkennen Regionen auf den Chromosomen 4 (*L9* Gen), 15 (*Similar to L9* Gen), 19 (nicht weiter charakterisierter Klon) und X (*L9 Pseudogen*). Außerdem weist das Gen *Hep G2* Homologe Sequenzen zu *L9* auf.

Die Gene, die die Schnittmenge zwischen Human Cancer und Human 3.6 Arrays bilden, zeigen in der Regel übereinstimmende Ergebnisse auf den entsprechenden Arrays. Zwar sind die absoluten Werte nicht vergleichbar, da es sich um unterschiedliche Arrays handelt, die Größenordnung der Signale stimmt bei den stichpunktartig überprüften Spots aber überein. Gene, bei denen dies nicht der Fall ist, bilden eine Ausnahme.

V. Ergebnisse Prostatatumoren

1) Experimentelles Vorgehen

Im zweiten Teil der vorliegenden Doktorarbeit sollten die Expressionsmuster von PTEN-positiven und PTEN-negativen Arealen innerhalb eines Prostatatumors untersucht und miteinander verglichen werden. Auf diese Weise sollten Gene gefunden werden, die möglicherweise einer Regulation durch das Tumorsuppressorgen *PTEN* unterliegen. Gene, die in Anwesenheit von PTEN stark exprimiert sind, könnten bei der Wachstumskontrolle der Zellen und der Induktion von Apoptose eine Rolle spielen. Gene, die beim Fehlen von PTEN induziert werden, könnten zur steigenden Aggressivität und zur Metastasierung des Tumors beitragen.

Zunächst wurden Gefrierschnitte der Tumoren hergestellt und immunhistochemisch mit Hilfe eines Anti-PTEN-Antikörpers gefärbt. Von einem Pathologen wurden PTEN-positive und -negative Tumorzellen bestimmt und von mir mikrodisektiert. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert, mittels SMART (Chenchik et al., 1998) revers transkribiert und über eine LD-PCR (Barnes et al., 1994) gleichmäßig amplifiziert. Ursprünglich war geplant, eine cDNA-Subtraktion (Diatchenko et al., 1996) durchzuführen und auf diese Weise differentiell exprimierte Gene anzureichern. Da einzelne Schritte der Subtraktion jedoch aufgrund der relativ schlechten Qualität der RNA, wie sich später herausstellte, nicht funktionierten, wurde die cDNA in die Synthese-Reaktion einer radioaktiven Sonde eingesetzt, mit der anschließend Human Cancer- und Human 3.6-Arrays hybridisiert wurden.

2) Auswahl der Tumoren und der zu untersuchenden Regionen

Bevor mit der eigentlichen Untersuchung der Tumoren begonnen werden konnte, musste zunächst festgelegt werden, welche Tumoren sich überhaupt für eine Analyse des *PTEN*-Gens eigneten, und wo sich die PTEN-positiven und -negativen Tumordrüsen innerhalb eines Gefrierschnitts genau befanden. Dazu wurde zunächst bei allen vorhandenen Tumoren eine Immunhistochemie mit einem PTEN-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abbildung V.1). Anschließend wurden die Schnitte eingedeckelt und einem Pathologen zur Bewertung vorgelegt. Dieser sortierte solche Tumoren aus, die zu wenige Tumordrüsen enthielten oder nur eine diffuse Färbung zeigten. Außerdem zeichnete der Pathologe die Regionen des Tumors ein, die sich für die Mikrodisektion und zur weiteren Untersuchung eigneten. Für diese Aufgabe stellten sich Prof. H. P. Dienes aus Köln sowie Prof. P. H. Wünsch aus Nürnberg zur Verfügung.

Aus den 17 vorliegenden Tumoren, die uns Prof. R. Schäfer aus Berlin und Prof. B. Schmitz-Dräger aus Fürth überlassen hatten, erwiesen sich 12 Tumoren als brauchbar. Da für die angestrebten Untersuchungen jedoch eine Mindestanzahl an Tumorzellen gebraucht wurde, um die Experimente mehrmals wiederholen zu können, wurden aus diesem Kollektiv die fünf Tumoren herausgesucht, die die größten PTEN-positiven und -negativen Tumorregionen aufwiesen.

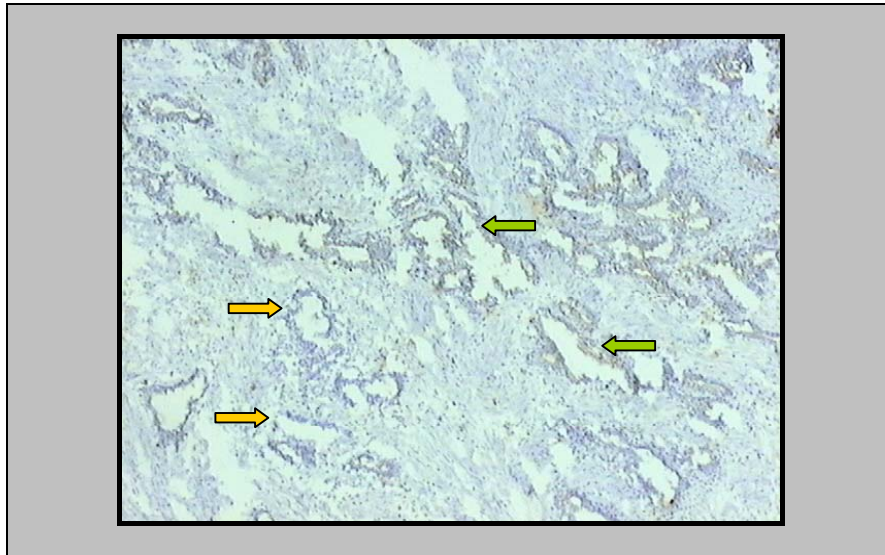


Abbildung V.1: Immunhistochemie eines Prostatatumors mit Anti-PTEN-Antikörper. PTEN-positive Tumordrüsen zeigen eine bräunliche Färbung (grüne Pfeile), PTEN-negative Tumordrüsen sind nur mit Hämatoxylin gefärbt (gelbe Pfeile), vierfache Vergrößerung.

3) Etablierung der Mikrodissektion

Zu Beginn der Arbeit galt es festzustellen, wie viele Zellen pro Tumor notwendig waren, um den im Methoden-Teil beschriebenen Versuchsablauf reibungslos zu gewährleisten. Einerseits stand das Tumormaterial nur in sehr limitierter Menge zur Verfügung. Außerdem durfte der Ablauf von Immunhistochemie und Mikrodissektion nicht zu lange dauern, um den Abbau der RNA durch RNasen zu minimieren und qualitativ möglichst hochwertige RNA zu erhalten. Andererseits sollte so viel RNA wie möglich gewonnen werden, um den Umfang der Amplifikationsschritte gering zu halten. Je stärker die RNA amplifiziert wird, desto stärker weicht die vorhandene Verteilung der cDNA vom ursprünglich vorhandenen Expressionsmuster ab. Außerdem kommt es zur Amplifikation unspezifischer Produkte (SMART Handbuch, 1999).

Zunächst wurden drei bis vier Gefrierschnitte gleichzeitig immunhistochemisch gefärbt, je nach Größe der zu mikrodissektierenden Regionen. Daraus wurden jeweils ca. 10.000 PTEN-positive bzw. PTEN-negative Zellen mikrodissektiert, was 45 bis 60 Minuten in Anspruch

nahm. Abbildung V.2 zeigt eine PTEN-positive Tumordrüse vor und nach der Mikrodissektion sowie das dazugehörige Cap, auf dem die ausgewählten Zellen nach der Mikrodissektion fixiert sind.

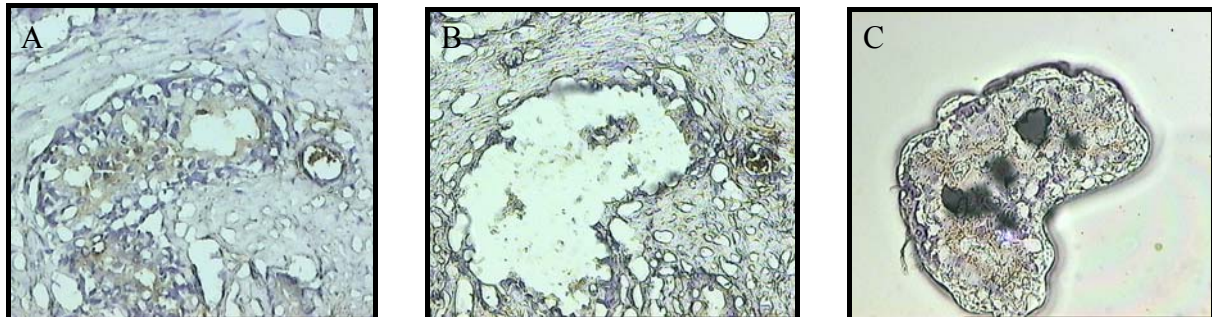


Abbildung V.2: PTEN-positive Tumordrüse vor (A) und nach (B) der Mikrodissektion und mikrodissektierte, auf dem Cap fixierte Tumorzellen (C), 20fache Vergrößerung.

Die aus der entsprechenden RNA mittels SMART hergestellte cDNA reichte allerdings nur für eine LD-PCR aus. Um statistisch verlässliche Werte zu erhalten, sollten aber jeweils drei LD-PCRs und daraus drei Array-Hybridisierungen durchgeführt werden. Es zeigte sich, dass man, wenn man die Tumorzellen für jeden Versuch einzeln mikrodissektiert, teilweise erheblich abweichende Werte erhielt. Das liegt wahrscheinlich daran, dass sich bei der Herstellung einer größeren Anzahl von Gefrierschnitten Lage und Größe von Tumordrüsen von Schnitt zu Schnitt unterscheiden. Darum schien es sinnvoller, zuerst aus mehreren Gefrierschnitten eine große Zahl von Tumorzellen zu mikrodissektieren, mittels SMART cDNA herzustellen und diese für mehrere LD-PCRs zu verwenden. 25.000 bis 28.000 Zellen ergaben schließlich eine ausreichende RNA-Menge für drei LD-PCRs. Sie konnten innerhalb einer vertretbaren Zeitspanne (Immunhistochemie ca. 40 Minuten, Alkoholreihe ca. 10 Minuten, Mikrodissektion ca. 2 Stunden) aus fünf bis sechs Gefrierschnitten mikrodissektiert werden.

4) Etablierung der RNA-Isolierung

Weiterhin galt es herauszufinden, auf welche Art sich die RNA am besten aus den mikrodissektierten Zellen gewinnen lässt. Dazu wurden jeweils 10.000 mikrodissektierte Tumorzellen eingesetzt. Die Firma Arcturus bietet dafür auf ihrer Homepage (www.arctur.com) ein Protokoll für die RNA-Isolierung mit GITC-Puffer an, das als erste der möglichen Methoden ausprobiert wurde. Da 10.000 Zellen zu wenig RNA enthalten, um sie mit einem Spektrophotometer zu messen, wurde die RNA zunächst revers transkribiert und dann eine spezifische PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt. Trotz mehrerer Anläufe ließ

sich jedoch keine RNA nachweisen. Das liegt vermutlich daran, dass bei den beiden Phenol/Chloroform-Extraktionen und den Fällungen zu viel RNA verloren geht. Als Alternative bot sich die Reinigung über eine Säule (RNeasy Mini Kit, Qiagen; Strata Prep RNA-Kit, Stratagene) oder die Bindung von mRNA an Oligo-dT-Cellulose (Quick Prep Micro mRNA Purification Kit, Pharmacia Biotech) an. RNA, die mit der letztgenannten Isolierungsmethode gereinigt wurde, ließ sich mittels RT-PCR ebenfalls nicht amplifizieren. Für die mittels RNeasy-Kit gereinigte RNA zeigte die PCR deutliche Banden. Allerdings war auch bei dieser Methode eine Behandlung der RNA mit DNase und eine anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion notwendig, um Kontamination durch DNA auszuschließen. Das beste Ergebnis ließ sich mit dem Strata Prep Kit erzielen. Hier wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion vermieden, da der DNase-Verdau direkt auf der Säule erfolgt und Enzym und Nukleotide mit Hilfe eines Waschpuffers entfernt werden können. Auf diese Weise ließen sich bei der PCR die intensivsten Banden und damit die größten Ausbeuten an RNA erzielen. Um sicherzugehen, dass die Banden nicht aus einer Kontamination der RNA durch DNA-Reste resultierten, wurde die RNA ohne vorherige reverse Transkription in eine PCR eingesetzt. Auf dem darauffolgenden Agarosegel war keine cDNA sichtbar. Die RNA war also frei von DNA-Kontamination und konnte für weitere Experimente verwendet werden.

5) cDNA-Subtraktion

Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde zunächst als Ziel gesetzt, die aus den mikrodisezierten Zellen der Prostatatumoren isolierte RNA nach der Amplifikation mittels SMART und LD-PCR zunächst zu subtrahieren und damit alle in PTEN-positiven und -negativen Regionen in gleichem Umfang exprimierten Gene zu eliminieren. Dazu sollten an die aus der LD-PCR resultierende cDNA zunächst Adaptoren ligiert werden (siehe Methoden, Abschnitt 9). Diese Blunt-end-Ligation erwies sich jedoch als schwierig. LD-PCR und Rsa I-Verdau wurden jeweils auf einem Agarosegel kontrolliert und schienen in der Regel problemlos und vollständig funktioniert zu haben. Die auf die Ligation folgende PCR, bei der die Intensität eines Fragments innerhalb des GAPDH-Gens mit einem Produkt von einem GAPDH-Primer und einem Primer innerhalb eines Adapters verglichen wird, lieferte zu Beginn der Versuche allerdings weder für die Prostata-cDNA noch für die im Kit enthaltene Kontroll-cDNA (skeleton muscle cDNA) ein zufriedenstellendes Ergebnis. Zwar war das Produkt der GAPDH-Primer sichtbar, unter Einbezug der Adaptoren war es aber zu keiner Amplifikation des entsprechenden Fragments gekommen. Da eine andere Doktorandin zur gleichen Zeit

ähnliche Probleme hatte und mit Hilfe einer Ligase einer anderen Firma (Roche) bessere Ergebnisse erzielen konnte, wurde zunächst die im Subtraktionskit mitgelieferte Ligase ausgetauscht. Trotzdem zeigte die PCR für die Prostata-cDNA keine Fragmente für die Adaptoren und nur schwache Fragmente für die Kontroll-DNA. Darum wurde das vorliegende Ligations-Protokoll mit dem Protokoll verglichen, das in dem Buch „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) vorgeschlagen wird. Daraufhin wurde dem Ligationsansatz 15 % PEG 8000 zugefügt, das als Trägermolekül für die cDNA dienen sollte. Außerdem wurde der im Kit vorhandene 5x Puffer nur noch im Verhältnis 1:10 eingesetzt, um die $MgCl_2$ -Konzentration zu senken. Um die dadurch gesunkene DTT-Konzentration auszugleichen, wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich DTT zugesetzt, so dass sich eine Endkonzentration von 5 mM DTT ergab. Um die Menge der Ligase und des darin enthaltenen ATPs heraufzusetzen, wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μ l 1,5 μ l statt 1 μ l Ligase verwendet. Daraufhin zeigte die Ligation der Kontroll-cDNA mit den Adaptoren ein gutes Resultat, die Ligation der Prostata-cDNA gelang auch nach mehreren Versuchen nur unzureichend. Das liegt vermutlich daran, dass die RNA, die aus dem mikrodissektierten Geweben isoliert wurde, keine sehr gute Qualität hatte (siehe auch Abschnitt 8). Die cDNA-Subtraktion wurde darum verworfen und die cDNA direkt für die Synthese einer radioaktiven Sonde eingesetzt, mit der später Human Cancer- und Human 3.6- Arrays hybridisiert wurden.

6) Vergleich der Array-Ergebnisse mit radioaktiven Sonden aus RNA und cDNA (SMART)

Um die SMART-Technologie und die Verwendung der Human Cancer Arrays zu etablieren und die optimalen Reaktionsbedingungen für die Untersuchung der Prostatatumoren zu evaluieren, wurde zunächst RNA aus unbehandelten LNCaP-Zellen eingesetzt, nach der SMART-Methode zu cDNA konvertiert, mittels LD-PCR amplifiziert und für die Herstellung radioaktiver Sonden genutzt. RNA aus LNCaP-Zellen wurde deswegen verwendet, weil sie im Gegensatz zu RNA aus Prostatatumoren in großem Umfang zur Verfügung stand. Die Amplifikation der cDNA durch SMART und LD-PCR war notwendig, da aus den Gefrierschnitten der Prostatatumoren zu wenig RNA gewonnen werden konnte, um diese direkt in die Synthese der radioaktiven Sonden einzusetzen. Nachdem die Etablierung gelungen und mit der Untersuchung der Prostatatumoren begonnen worden war, wurde zusätzlich die Herstellung radioaktiver Sonden aus LNCaP-RNA mittels Reverser Transkription angewandt. Diese Technik sollte später dem Vergleich der Expressionsmuster von PTEN-transfizierten LNCaP-Zellen und mit einem leeren Vektor transfizierten Zellen

dienen. Da bekannt ist, dass durch Amplifikation von RNA bzw. cDNA die ursprünglichen mRNA-Mengenverhältnisse in einer RNA-Population verschoben werden können, schien es sinnvoll, in diesem Fall auf eine unnötige Amplifikation zu verzichten. Tatsächlich zeigte der Vergleich der beiden Ergebnisse, dass sich zum Teil deutliche Unterschiede bei der Auswertung der Arrays ergeben, wenn man die unveränderte RNA oder bereits amplifizierte cDNA für die Herstellung der radioaktiven Sonden verwendet. Daraufhin wurden diese Unterschiede systematisch untersucht. Dazu wurde RNA aus unbehandelten LNCaP-Zellen isoliert und zur Synthese von Sonden eingesetzt. Vier Ansätze wurden direkt mittels Reverser Transkription hergestellt. Außerdem wurde die RNA viermal mittels SMART und LD-PCR amplifiziert und die cDNA in die Synthese der radioaktiven Sonde eingesetzt. Für die Hybridisierung wurden immer die gleichen Human Cancer Arrays verwendet. Die für die einzelnen Gene auf den Human Cancer Arrays gemessenen Werte wurden miteinander verglichen.

Die in diesem Experiment erhaltenen Ergebnisse wurden später denen aus einem ähnlich aufgebauten Versuch gegenübergestellt, in dem RNA aus *PTEN*-transfizierten und induzierten LNCaP-Zellen sowie RNA aus solchen Zellen untersucht wurde, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren. Um die Expressionsverhältnisse mit denen in Prostatatumoren vergleichen zu können, wurden zusätzlich Versuche mit amplifizierter cDNA durchgeführt. Dabei ergaben sich ähnliche Unterschiede wie in dem oben beschriebenen Versuch. Abbildung V.3 stellt einen Ausschnitt aus zwei Human Cancer-Arrays dar. Ein Array wurde mit einer Sonde, die aus RNA hergestellt wurde, hybridisiert. In die Synthese der anderen Sonde wurde cDNA aus einer LD-PCR eingesetzt.

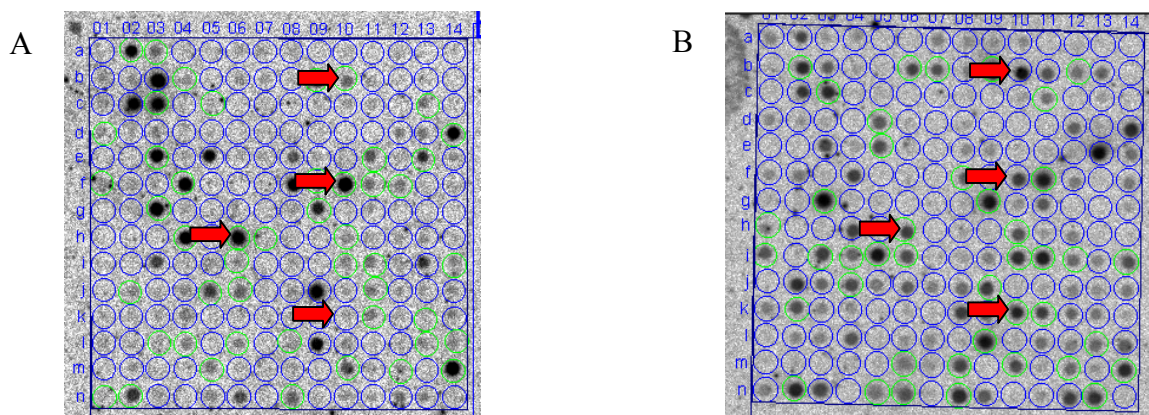


Abbildung V.3: Array A wurde mit einer Sonde hybridisiert, die direkt aus RNA *PTEN*-transfizierter LNCaP-Zellen hergestellt wurde; Array B wurde mit einer Sonde aus cDNA hybridisiert, die zuvor mittels LD-PCR amplifiziert worden war. Die Pfeile weisen beispielhaft auf solche Spots, deren gemessene Intensitäten bei den beiden Experimenten deutliche Unterschiede zeigen.

Insgesamt findet man 86 Gene, für deren Expressions-Intensität man deutlich unterschiedliche Werte erhält. Berücksichtigt wurden alle Gene, deren Werte sich mindestens um einen Faktor von drei oder mehr unterscheiden. Für 28 dieser Gene liegt der Wert, den man nach der Amplifikation mittels SMART und LD-PCR und anschließender Herstellung einer radioaktiven Sonde erhält, niedriger, als es bei direktem Einsatz der RNA in der Synthese der radioaktiven Sonde der Fall ist. Diese Ergebnisse sind in Tabelle V.1 aufgelistet. Bei 58 Genen liegt dagegen das nach der Amplifikation mit SMART erhaltene Signal deutlich höher als bei der Verwendung von RNA (siehe Tabelle V.2). Bei fast allen dieser Gene entspricht die Intensität des gemessenen Signals für die Sonde aus RNA dem Hintergrundwert. Geht man davon aus, dass man durch die direkte Verwendung von RNA die verlässlicheren Ergebnisse erhält, so scheint also praktisch keine Expression der entsprechenden Gene vorzuliegen. Die in Tabelle V.1 für die SMART-Reaktion aufgelisteten Werte liegen etwa zur Hälfte deutlich über dem Hintergrundwert. Eine Expression dieser Gene ist also vorhanden, sie scheint entsprechend der für die SMART-Methode erhaltenen Ergebnisse aber deutlich niedriger zu sein als man aus den entsprechenden Werten für den direkten Einsatz von RNA schließen würde.

Label	Name des Gens	Mittelwert RNA	Mittelwert SMART	Faktor
B01j	ras-related associated with diabetes protein (RRAD); ras associated with diabetes protein 1 (RAD1)	276,3	2,6	108,4
A06h	neurogenic locus notch protein homolog 4 (NOTCH4)	988,4	18,0	54,8
A07c	ets1 proto-oncogene	25,7	1,0	25,7
A06n	NEDD5 protein homolog; DIFF6; KIAA0158	26,3	1,1	23,3
D05k	colon carcinoma kinase 4 (CCK4); transmembrane receptor PTK7	29,3	1,4	20,9
E10j	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1); erythroid potentiating activity protein (EPA); collagenase inhibitor (CLGI)	108,3	5,6	19,5
E14i	matrix metalloproteinase 16 (MMP16); membrane-type matrix metalloproteinase 3 (MT-MMP3); MMP-X2	53,4	3,2	17,0
C02l	p73 (monoallelically expressed p53-related protein)	63,2	4,1	15,5
E14h	wingless-related MMTV integration site 8b protein (WNT8B)	125,0	9,0	14,0
A09k	CDC-like kinase 3 (CLK3)	17,7	1,3	13,6
E08h	jagged homolog 1 (JAG1; hJ1)	39,5	3,1	12,9
A10f	matrix metalloproteinase 11 (MMP11); stromelysin 3	51,8	4,1	12,6
A13h	active breakpoint cluster region-related protein	25,1	2,4	10,3
D04f	integrin alpha 8 (ITGA8)	10,0	1,0	10,0
B05c	MAPK/ERK kinase kinase 3 (MEK kinase 3; MEKK3)	14,9	2,0	7,5
E01g	interleukin 13 (IL13)	31,8	4,7	6,8
D14d	integrin beta 5 (ITGB5)	10,7	1,6	6,7
C14m	fuse-binding protein 2 (FBP2)	5,8	1,0	5,8
F13e	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase (DHICA oxidase); tyrosinase-related protein 1 (TRP-1); catalase B; glycoprotein-75 (GP75)	9,3	1,8	5,3
E10h	manic fringe homolog (MFNG)	4,8	1,0	4,8
E03n	aggrecan 1 (AGC1); chondroitin sulfate proteoglycan1 (CSPG1); cartilage-specific proteoglycan core protein (CSPCP); MSK16	24,7	5,3	4,7
C01a	WSL protein + TRAMP + Apo-3 + death domain receptor 3 (DDR3)	4,4	1,0	4,4
B08k	rho-GAP hematopoietic protein C1 (RGC1); KIAA0131	12,3	3,1	4,0
B14n	retinoic acid receptor beta (RXR-beta; RXRB)	6,1	1,6	3,9
E02g	interleukin 14 (IL14); high molecular weight B-cell growth factor (HMW-BCGF)	7,4	2,0	3,7
A14g	PIG12	25,2	7,3	3,5
C11i	activating transcription factor 1 (ATF1); TREB36	9,6	3,0	3,2

Tabelle V.1: Gene, die nach der Hybridisierung mit einer direkt aus RNA hergestellten Sonde deutlich höhere Werte aufweisen als die entsprechenden Signale, die man aus mittels SMART und LD-PCR amplifizierter cDNA erhält; RNA = Sonde, die direkt aus RNA hergestellt wurde, SMART = Sonde, die nach Amplifikation durch SMART und LD-PCR aus cDNA hergestellt wurde; der Mittelwert wurde jeweils aus den Ergebnissen aus vier unabhängigen Experimenten berechnet.

Label	Name des Gens	Mittelwert RNA	Mittelwert SMART	Faktor
F05k	60S ribosomal protein L32 (RPL32)	1,1	414,8	395,0
F12j	elongation factor 1 alpha (EF1-alpha; EF1A)	1,3	389,2	305,2
F14j	40S ribosomal protein S16 (RPS16)	1,0	305,0	305,0
F01k	60S ribosomal protein L10 (RPL10); tumor suppressor QM	1,1	232,1	211,0
F05d	L-lactate dehydrogenase M subunit (LDHA)	1,0	159,4	159,4
B02a	fibroblast adenine nucleotide translocator 2 (ANT2)	1,0	114,0	114,0
B04a	ATP synthase coupling factor 6 mitochondrial (F6)	1,0	112,7	112,7
B02m	hint protein; protein kinase C inhibitor 1 (PKC11)	1,1	109,8	99,8
A09b	nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB); expressed in non-metastatic cells 2 protein (NME2); myc purine-binding transcription factor (PUF); NM23B	1,7	156,1	93,2
E07h	macrophage migration inhibitory factor (MIF); glycosylation- inhibiting factor (GIF)	1,0	92,4	92,4
D06m	cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)	1,0	83,9	83,9
F11k	ribosomal protein S21 (RPS21)	1,0	68,5	68,5
A10b	nucleoside diphosphate kinase A (NDKA); NDP kinase A; tumor metastatic process-associated protein; metastasis inhibition factor NM23 (NM23-H1)	1,0	52,5	52,5
D02f	40S ribosomal protein SA (RPSA); 34/67-kDa laminin receptor; laminin receptor 1 (LAMR1); colon carcinoma laminin-binding protein; NEM/1CHD4	2,8	136,3	48,7
A03g	c-myc-binding protein MM-1; prefoldin 5 (PFDN5; PFD5)	1,5	68,1	47,0
F02k	40S ribosomal protein S5 (RPS5)	1,0	46,0	46,0
D08m	microsomal glutathione S-transferase II (microsomal GSTII)	1,0	40,5	40,5
F06d	L-lactate dehydrogenase H subunit (LDHB)	1,0	34,8	34,8
F04k	60S ribosomal protein L5 (RPL5)	1,1	35,1	33,5
F07h	GTP-binding nuclear protein RAN (TC4)	1,0	31,9	31,9
A10k	cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 (CKS1)	1,0	27,9	27,9
D06b	nonhistone chromosomal protein HMG17	1,5	42,2	27,7
B04j	ras homolog gene family member C (RHOC; ARHC); ARH9; H9	1,1	28,9	26,9
C13f	G22P1; Ku 70-kDa subunit (KU70); 70-kDa thyroid autoantigen (TLAA)	1,0	25,0	25,0
B05l	calmodulin (CALM; CAM)	1,0	23,5	23,5
A11k	cyclin-dependent kinase regulatory subunit (CKS2)	1,0	20,8	20,8
A09l	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A); melanoma differentiation-associated protein 6 (MDA6); CDK-interacting protein 1 (CIP1); WAF1; SDI1	1,0	20,6	20,6
A05i	G2/mitotic-specific cyclin B1 (CCNB1)	1,0	18,7	18,7
A10h	von Hippel-Lindau-binding protein 1 (HIBBJ46; VHL-binding protein 1; VBP1)	1,0	16,9	16,9
F14b	aminoacylase 1 (ACY1)	1,0	15,6	15,6
E02i	CD9 antigen; leukocyte antigen MIC3	1,4	20,8	14,9
E09h	jagged homolog 2 (JAG2)	1,1	14,5	13,8
F04d	purine nucleoside phosphorylase (PNP); inosine phosphorylase	1,1	14,5	12,9
A03c	myc proto-oncogene	1,5	16,1	11,1
A06b	prohibitin (PHB)	1,3	14,0	11,0
B04n	B-cell receptor-associated protein (hBAP)	1,0	10,4	10,4
B04e	DCHT	1,2	12,3	10,3
A08m	protein D123	1,0	10,2	10,2
A09g	prostate-specific membrane antigen (PSM)	1,0	9,5	9,5

E08k	Kunitz-type serine protease inhibitor 2 (SPINT2); placental bikunin; hepatocyte growth factor activator inhibitor 2 (HAI2)	4,4	40,0	9,1
C11d	inhibitor of apoptosis protein 2 (IAP2); IAP homolog B; TNFR2-TRAF signaling complex protein 2; MIHC	1,1	9,4	8,9
C04i	endonuclease III homolog 1; HNTH1; OCTS3	19,7	167,4	8,5
C05h	ubiquitin-conjugating enzyme E2 17-kDa (UBE2A); ubiquitin-protein ligase; ubiquitin carrier protein; HR6A	1,1	9,1	8,4
A03e	fms-related tyrosine kinase 1 (FLT1); vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1); vascular permeability factor receptor	1,2	9,9	8,2
C05d	growth arrest & DNA damage-inducible protein 153 (GADD153); DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3); C/EBP homologous protein (CHOP)	1,0	7,9	7,7
A02k	polo-like kinase (PLK)	1,0	7,4	7,4
A11c	MYB-related protein B (B-MYB); avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2 (MYBL2)	1,0	7,2	7,2
C04n	PIRIN	1,0	7,2	7,2
F09k	aspartyl-tRNA synthetase (ASPRS); aspartate-tRNA ligase	1,5	10,7	7,1
E02n	70-kDa heat shock protein 5 (HSPA5); 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78); immunoglobulin heavy chain binding protein (BIP)	1,0	7,0	7,0
A05n	CDC37 homolog	1,0	6,7	6,7
C07d	poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; ADPRT; ADPRP; PPOL); NAD(+) ADP-ribosyltransferase; poly(ADP-ribose) synthetase	1,0	6,6	6,6
F05i	transmembrane protein 21 (TMP21); S31III125	1,8	11,5	6,6
F13d	adenylate kinase isoenzyme 1 (AK1); ATP-AMP transphosphorylase; myokinase	1,0	6,3	6,3
F08c	GMP synthase; glutamine amidotransferase; GMP synthetase	1,0	6,2	6,2
D07b	high mobility group protein HMG2	1,0	6,0	6,0
D08c	preferentially expressed antigen of melanoma	1,0	5,2	5,2

Tabelle V.2: Gene, deren Expressionsintensität bei vorheriger Amplifikation der cDNA durch SMART höher zu liegen scheint, als es bei direktem Einsatz von RNA in der Sonden-Synthese der Fall ist; RNA = Sonde, die direkt aus RNA hergestellt wurde, SMART = Sonde, die nach Amplifikation durch SMART und LD-PCR aus cDNA hergestellt wurde; der Mittelwert wurde jeweils aus den Ergebnissen aus vier unabhängigen Experimenten berechnet.

Leider gab es zunächst keine realisierbare Alternative zur Anwendung der SMART-Technologie. Deswegen wurden die in den Tabellen V.1 und V.2 aufgelisteten Gene aus der Auswertung ausgeschlossen, da ihre Expressionsintensitäten durch SMART und LD-PCR verzerrt werden. Eine entsprechende Untersuchung hätte auch mit den Human 3.6-Arrays durchgeführt werden müssen, wenn darauf enthaltene Gene im Rahmen dieser Arbeit interessant gewesen wären. Da dies jedoch nicht der Fall ist (siehe Abschnitt 9: Ergebnisse der Arrayanalysen), und weil es sich um ein sehr arbeits- und kostenintensives Experiment handelt, wurde darauf verzichtet.

7) Funktionsanalyse des PTEN-Proteins

Nachdem erste Ergebnisse aus den Array-Analysen vorlagen, zeigte sich, dass die Anzahl solcher Gene, die möglicherweise durch PTEN-Expression reguliert werden, minimal war. Mit den vier verwendeten Arrays (Human Cancer und Human 3.6) standen insgesamt 4197 Gene zur Untersuchung zur Verfügung. In Anbetracht dieser großen Zahl erschien es wenig glaubhaft, dass sich darunter kaum Gene befinden sollten, deren Expression von PTEN abhängig sein könnte, wie es die Ergebnisse der Arrayanalyse nahe legten. Um die Funktionalität des in den immunhistochemisch-positiven Tumorregionen nachgewiesenen Proteins zu untersuchen, wurde eine weitere *Immunhistochemie* mit einem Antikörper durchgeführt, der spezifisch die phosphorylierte Form der AKT-Kinase (AKT-P) erkennt. Wie in der Einleitung unter Abschnitt 7 beschrieben, wird PIP₃ von PTEN dephosphoryliert, so dass kein Phosphatrest zur Phosphorylierung der AKT-Kinase zur Verfügung steht. In PTEN-negativen Tumorzellen sollte die phosphorylierte Form der AKT-Kinase also nachweisbar sein, während man in PTEN-positiven Tumorregionen kein Signal für die phosphorylierte AKT-Kinase erwartet. Abbildung V.4 zeigt, dass genau dieser Sachverhalt durch die durchgeführte Immunhistochemie bestätigt wurde. Eine positive Färbung für PTEN schließt ein Signal der phosphorylierten AKT-Kinase aus und umgekehrt. Das in den Prostatatumoren exprimierte PTEN scheint also funktionsfähig zu sein.

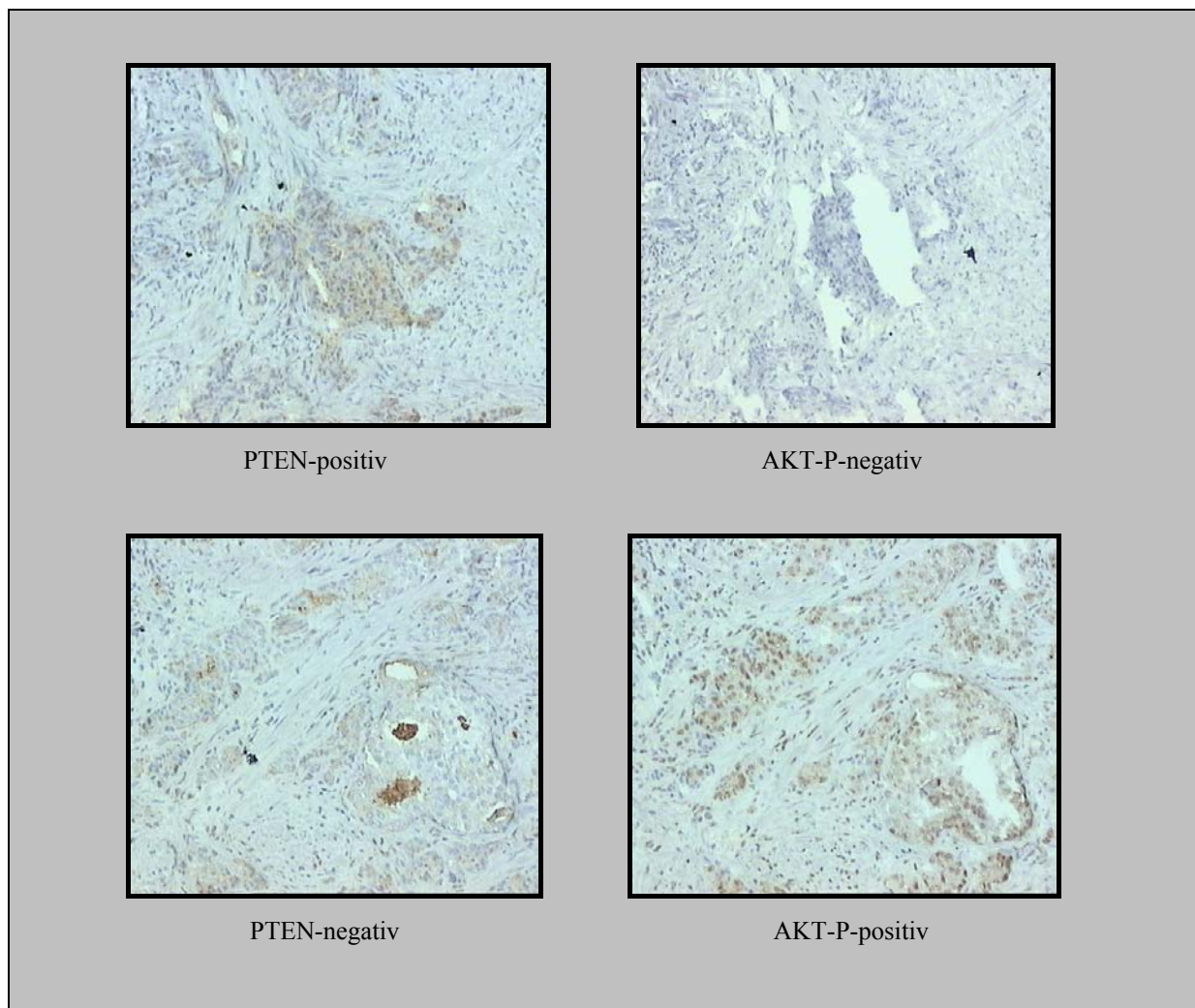


Abbildung V.4: Immunhistochemie von Gefrierschnitten von Prostatatumoren mit Anti-PTEN- und Anti-AKT-P-Antikörper (10fache Vergrößerung). Zeigt eine Drüse eine positive Färbung für PTEN, so ist im Folgeschnitt in der gleichen Drüse kein AKT-P nachweisbar. Ebenso schließt das Vorhandensein von AKT-P im Folgeschnitt ein Signal für PTEN in der entsprechenden Drüse aus.

Parallel zu weiteren Array-Analysen sollte zusätzlich mittels *quantitativer Realtime RT-PCR* herausgefunden werden, wie groß der Unterschied der PTEN-Expression zwischen immunhistochemisch-positiven und -negativen Zellen ist. Dazu wurde eine Realtime RT-PCR nach der TaqMan-Methode mit zwei *PTEN*-spezifischen Primern durchgeführt. Die im Material-Teil beschriebenen Reaktionsansätze wurden für jede zu untersuchende Probe in dreifacher Ausführung angesetzt und vermessen. In der Regel wurde aus den drei jeweils zusammengehörigen C_T -Werten (Anzahl der Zyklen, bei der sich das gemessene Signal deutlich vom Hintergrund abzuheben beginnt) ein Mittelwert berechnet. Stark abweichende Werte wurden bei dieser Berechnung allerdings nicht berücksichtigt. Tabelle V.3 zeigt die für drei Prostatatumoren P16, P27 und P53 gemessenen C_T -Werte. Die beiden anderen Tumoren konnten leider nicht analysiert werden, da nicht genügend Material zur Verfügung stand.

Probe	C _T PTEN	Mittelwert C _T PTEN	C _T Aktin	Mittelwert C _T Aktin
Negativkontrolle	40,000	40,000	40,000	40,000
Negativkontrolle	40,000		40,000	
16 +	36,082	36,319	27,216	27,724
16 +	28,547		28,240	
16 +	36,555		27,716	
16 -	36,079	36,316	28,458	28,101
16 -	36,236		27,625	
16 -	36,682		28,220	
27 +	37,871	39,287	35,290	35,264
27 +	40,000		34,908	
27 +	38,070		35,594	
27 -	35,597	36,894	33,316	32,676
27 -	35,618		32,613	
27 -	36,022		32,099	
53 +	34,759	34,636	29,120	29,103
53 +	14,263		29,093	
53 +	34,513		29,096	
53 -	36,020	35,950	33,879	29,886
53 -	36,100		30,650	
53 -	35,731		29,116	

Tabelle V.3: C_T-Werte von Prostatatumoren

Für die Berechnung der Intensität der Expression eines Gens lässt sich die folgende Gleichung verwenden: $X_{N, \text{kal}} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$. Die Herleitung dieser Gleichung kann im Methoden-Teil in Abschnitt 6.5 nachgelesen werden.

Setzt man in diese Gleichung die berechneten Mittelwerte des jeweiligen C_T-Werts ein, so erhält man folgende Ergebnisse: Das Verhältnis der *PTEN*-mRNA-Menge in immunhistochemisch PTEN-positiven Tumorzellen verglichen mit PTEN-negativen Zellen aus Tumor P16 beträgt 0,77 : 1. In PTEN-positiven Drüsen aus Tumor P27 ist 1,15fach so viel *PTEN*-mRNA vorhanden wie in PTEN-negativen Drüsen aus P27. PTEN-positive Tumorzellen aus Tumor P53 enthalten die 1,44fache Menge an *PTEN*-mRNA wie PTEN-negative Tumorzellen. Die immunhistochemisch PTEN-negativen Regionen von Tumor P16 scheinen also mehr *PTEN*-RNA zu enthalten als die PTEN-positiven. Bei den Tumoren P27 und P53 ist dagegen in den positiven Regionen etwas mehr *PTEN*-mRNA vorhanden als in den negativen. Der Unterschied scheint jedoch gering zu sein.

Parallel zur Durchführung der Realtime RT-PCR sollte ein weiteres bereits in der Literatur beschriebenes Phänomen ansatzweise untersucht werden, nämlich die Haploinsuffizienz des

PTEN-Gens (Kwabi-Addo et al., 2001). In der entsprechenden Veröffentlichung wird berichtet, dass Prostatatumore in Mäusen, bei denen ein *PTEN*-Allel fehlt, das andere jedoch intakt ist, den gleichen Phänotyp zeigen wie solche Tumoren, bei denen *PTEN* vollständig fehlt. Immunhistochemisch-positive Tumorzellen könnten also einen Phänotyp zeigen, der dem von *PTEN*-negativen Zellen entspricht, wenn Haploinsuffizienz vorliegt. Um festzustellen, ob bei den in dieser Arbeit untersuchten menschlichen Tumoren ein *PTEN*-Allel vollständig fehlte, wurden drei Stichproben mit Hilfe von *LOH-Analysen* des entsprechenden Bereiches untersucht. LOH steht für „loss of heterozygosity“. Diese Methode basiert darauf, dass im Genom polymorphe Marker vorhanden sind, die z.B. aus einer größeren Anzahl von CA-Wiederholungen bestehen, und anhand derer sich die beiden Allele eines Gens voneinander unterscheiden lassen. Eine PCR mit Primern, die den Bereich, der einen solchen Marker umgibt, amplifizieren, zeigt auf einem Polyacrylamid-Gel zwei Banden, nämlich eine für jedes Allel. Liegt ein Verlust der Heterozygotie vor, so ist eine der beiden Banden deutlich schwächer als beim Wildtyp, oder sie ist vollständig verschwunden. Die LOH-Analysen wurden von Frau E. Höricht mit den polymorphen Markern D10S541 und D10S1765 durchgeführt, die in der Nähe des *PTEN*-Gens lokalisiert sind. In die PCR wurde DNA aus normalem Prostatagewebe des Patienten, aus *PTEN*-positiven, mikrodissektierten Zellen oder aus einem pulverisierten Tumorstück eingesetzt. Bei allen drei Tumoren scheinen jedoch beide *PTEN*-Gene vorhanden zu sein, da sich ihr Bandenmuster nicht von dem von normalem Gewebe unterscheidet (siehe Abbildung V.5).

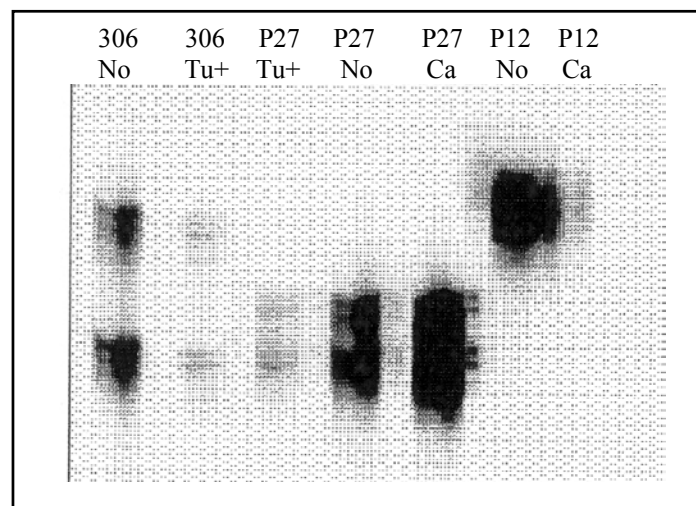


Abbildung V.5: LOH-Analyse mit dem polymorphen Marker D10S541. No = Normalgewebe; Tu+ = mikrodissektiertes, *PTEN*-positives Tumorgewebe; Ca = pulverisiertes Carzinomgewebe

Zwar zeigen die Banden aus normalem Gewebe oder Tumor unterschiedliche Intensitäten, man erhält jedoch immer für beide Allele schwächere oder stärkere Banden, so dass der Grund in der Effektivität der jeweiligen PCR zu suchen ist. Ein LOH liegt nicht vor.

8) RNA-Qualität

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit angewandten Techniken, insbesondere die Amplifikation der RNA mittels SMART, erfordern eine hohe *RNA-Qualität*. Da die SMART-Methode mit einem Oligo-dT-Primer arbeitet, kann nur intakte RNA, die einen Poly-A-Fortsatz enthält, in cDNA transkribiert werden. Darum wäre es sinnvoll gewesen, sich vor Beginn der Versuche von der Qualität der RNA, die aus mikrodisektierten Tumorzellen gewonnen wird, zu überzeugen. Leider ist aber bei der Mikrodisektion die Ausbeute an RNA sehr gering. Aus 10.000 mikrodisektierten Zellen lassen sich nur wenige Nanogramm RNA isolieren, in der Regel zwischen 15 und 20 ng. Das reicht für eine Analyse auf einem herkömmlichen Formaldehyd-Gel nicht aus. Da das Tumormaterial außerdem nur in sehr geringem Umfang zur Verfügung stand, konnten auch keine großen Mengen dazu verwendet werden, eine größere Anzahl an Schnitten für die Analyse der RNA-Qualität herzustellen. Erst im gegen Ende dieser Doktorarbeit stand im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer ein geeignetes Analysengerät zur Verfügung, um auch sehr geringe RNA-Mengen auf ihre Qualität zu prüfen. Dabei wird jeweils 1 µl der RNA in einem 10 µm dünnen Transportkanälchen, das in einen Glaschip eingätzt und mit einem Polymer und einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt ist, elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird die RNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Detektion durch eine Laseroptik analysiert. Dabei liegt das Detektionslimit bei 5 ng RNA.

Auf dem Agilent Bioanalyzer wurden daraufhin RNA-Proben aus verschiedenen Stadien des Versuchs untersucht. Zunächst wurde RNA aus Abfällen, die beim Schneiden der Tumoren entstanden waren, und aus dem restlichen Schnitt, der nach der Mikrodisektion der Tumorzellen übrig blieb, isoliert und analysiert. Dabei zeigte die RNA aus den unbehandelten Schnitt-Abfällen eine relativ gute Qualität. Nach Immunhistochemie und Mikrodisektion war die RNA jedoch teilweise degradiert. Um festzustellen, welcher Schritt des Versuchsablaufs das Problem darstellte, wurde zusätzlich direkt nach der Immunhistochemie RNA aus dem gefärbten Schnitt isoliert, und es wurde RNA aus Gefrierschnitten gewonnen, die nicht immunhistochemisch gefärbt worden waren, aber in der Alkoholreihe entwässert und mikrodisektiert worden waren. Dabei zeigte sich, dass die Qualität der RNA unter der Immunhistochemie gelitten hatte, während die RNA aus Schnitten ohne Immunhistochemie

deutlich geringere Qualitätseinbußen zeigte. Eine Mikrodisektion ohne vorherige Immunhistochemie wäre jedoch mit vielen Schwierigkeiten und Ungenauigkeiten verbunden gewesen. Da sich die Lage, Größe und Form der Tumordrüsen von Gefrierschnitt zu Gefrierschnitt ändern können, hätte man eine Große Zahl an Referenzschnitten gebraucht, um diese immer wieder zu kontrollieren. Das hätte zu einem hohen Verbrauch an Tumormaterial geführt und wäre sehr zeitintensiv für die beteiligten Pathologen gewesen.

9) Ergebnisse der Arrayanalysen

Die Arrayanalysen, die zunächst mit Hilfe des Human Cancer 1.2-Arrays, später auch mit den Human 3.6-Arrays durchgeführt wurden, haben leider keine deutlichen Unterschiede zwischen PTEN-positiven und -negativen Tumorregionen ergeben. Die Human 3.6-Arrays wurden zusätzlich verwendet, um das Spektrum der untersuchten Gene zu erweitern. Zwar fielen innerhalb eines Experimentes einzelne Gene auf, die differentiell exprimiert zu sein schienen, diese Tendenzen waren jedoch bei der Wiederholung des Experimentes mit vertauschten Arrays (um Fehler durch unterschiedlich gespottete DNA-Mengen auf den verschiedenen Arrays auszuschließen; siehe Ergebnisteil „LNCaP“) und mit cDNA aus einem neuen LD-PCR-Ansatz nicht reproduzierbar.

Auffällig war allerdings, dass hinsichtlich der Expression bestimmter Gene zwischen den einzelnen Tumoren teilweise deutliche Unterschiede bestehen. Die beiden Tumoren P16 und P27 heben sich beim Betrachten der mit Hilfe des Computers erstellten Auswertung (Programm von M. Beier) in mancher Hinsicht von den übrigen Tumoren ab. Einige Gene sind bei diesen beiden Tumoren höher exprimiert als bei den übrigen drei Patienten, wenige Gene sind niedriger exprimiert. Tabelle V.4.A stellt beispielhaft betroffene Gene vom Human Cancer Array dar. In Tabelle V.4.B sind außerdem solche Gene dargestellt, in denen die Tumoren P16 und P27 zusätzlich mit Tumor P129 übereinstimmen. Auch Tumor P306 zeigt hinsichtlich einiger Gene auffällige Unterschiede zu den übrigen Tumoren. In der Regel findet man hier niedriger exprimierte Gene (Tabelle V.4.C).

Label	Name	P16 neg	P27 neg	P53 neg	P129 neg	P306 neg	P16 pos	P27 pos	P53 pos	P129 pos	P306 pos
A07a	retinoblastoma-like protein 2 (RBL2; RB2); 130-kDa retinoblastoma-associated protein	2,9	3,1	0,5	0,5	0,4	3,1	3,1	0,6	0,8	0,3
A08f	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2; IBP2)	4	4,5	10	9,1	7	5,1	3,3	9,7	14,7	11,2
A12j	cyclin-dependent kinase 10 (CDK10); CDC2- related protein kinase PISSLRE	3,2	6,4	0,8	2,3	0,7	3,6	3,6	1,4	1,8	0,5
C02j	RBP2 retinoblastoma binding protein	3,1	3,9	1,1	1,6	0,7	3,6	2,7	1,1	1	0,7

Tabelle V.4.A: Unterschiede zwischen P16 und P27 auf der einen und P53, P129 und P306 auf der anderen Seite.

Label	Name	P16 neg	P27 neg	P53 neg	P129 neg	P306 neg	P16 pos	P27 pos	P53 pos	P129 pos	P306 pos
B08a	c-src kinase (CSK); protein-tyrosine kinase cyl	4	3,7	0,3	3,1	0,2	3,6	3,6	0,5	3,2	0,2
C02d	SL cytokine; FMS-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3 ligand; FLT3LG)	7,9	8,9	2,6	7,5	1,2	8,6	8,6	2,9	7,2	1
C13l	muscarinic cholinergic receptor 4 (CHRM4); muscarinic acetylcholine receptor M4	12,5	11,2	6,8	18,9	7	12	13,6	9	8,5	4,1
D14i	cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1 (CFR1); Golgi membrane sialoglycoprotein MG160; GLG1	2,5	4,2	0,7	2	0,9	2,8	2,7	0,5	2,2	0,5
E02c	endothelin 2 (ET2)	9,1	11,4	1,8	12,8	1,8	12	9,7	2,2	15,7	0,7
F08l	KIAA0151	6	11,1	3,9	9,1	2,5	11,2	8,6	3,1	7,2	3,8
F11a	tenascin (TN); hexabrachion (HXB); cytotactin; neuronectin; GMEM; mitotendinous antigen; glioma-associated extracellular matrix antigen	10,8	13,9	0,7	6,4	0,4	12,9	9,8	0,9	3	0,2

Tabelle V.4.B: Unterschiede zwischen P16, P27 und P129 auf der einen und P53 und P306 auf der anderen Seite.

Label	Name	P16 neg	P27 neg	P53 neg	P129 neg	P306 neg	P16 pos	P27 pos	P53 pos	P129 pos	P306 pos
E12d	fibroblast growth factor 3 (FGF3); HBGF3; int2 proto-oncogene	12,2	10,6	14	13,8	19,5	11,5	7	11	14,3	21,4
C04h	UV excision repair protein RAD23 homolog A (RAD23A; hHR23A)	14,7	15,1	17	22,5	9,8	16,8	16,9	16,1	17,5	10,2
C14a	TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)	108	118	101	84,6	46,8	92,2	95,5	101	105	57,1
E06a	bone morphogenetic protein 4 (BMP4); BMP2B	6,2	7,2	4,1	5,3	2,1	4,2	5,2	5,6	9,8	1,9
E14j	matrix metalloproteinase 17 (MMP17); membrane-type matrix metalloproteinase 4 (MT-MMP4)	207	167	113	180	43,3	202	215	178	147	48,7
F03d	thymidylate synthase (TYMS; TS)	112	96,1	120	131	50,8	108	145	126	118	82

Tabelle V.4.C: Unterschiede zwischen P306 und den übrigen vier Tumoren.

Ähnliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tumoren sind auch auf den Human 3.6 Arrays sichtbar. Für jeden Tumor existiert eine bestimmte Zahl von Genen, in deren Expression er sich von den übrigen Tumoren unterscheidet. Auf dem Human I Array hebt sich besonders Tumor P27 durch eine vergleichbar hohe Expression von mindestens 40 Genen und eine niedrigere Expression von sieben Genen ab. Auch die Tumoren P53 und P129 zeigen teilweise deutliche Abweichungen vom Expressionsmuster der übrigen Tumoren. Das gleiche gilt für die Arrays Human II und Human III. Auch hier fällt besonders Tumor P27 auf. Auf dem Human III Array scheinen besonders die Signale der ribosomalen Gene stark ausgeprägt zu sein. Teilweise sind auch Unterschiede zwischen P53 und P306 gegenüber den übrigen Tumoren sichtbar. Tabelle V.5 zeigt Ausschnitte aus dem Expressionsmuster von P27 auf allen drei Human 3.6 Arrays.

Label	Name	HuIP27 norm	HuIP27 norm	MW16 neg	MW27 neg	MW53 neg	MW129 neg	MW306 neg	MW16p os	MW27p os	MW53p os	MW129 pos	MW306 pos
A09g	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2; IBP2)	8	11,5	10,7	50,3	8	19,2	25,8	16,9	49,1	19,8	23,9	19,7
A07l	40S ribosomal protein S19 (RPS19)	0,6	0,6	1	90,8	0,9	1,9	16,5	0,8	90,9	1,6	1,2	14,8
A09b	nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B; NDKB); expressed in non-metastatic cells 2 protein (NME2); myc purine-binding transcription factor (PUF); NM23B	0,1	0,1	0,4	17,7	0,5	0,4	1,1	0,5	17,7	0,7	0,3	0,5
A09h	40S ribosomal protein S3A (RPS3A); v-fos transformation effector protein 1 (FTE1)	6,8	8,2	12,1	36,8	14,5	13,4	11,4	13,7	36,4	15,3	13	13
E02e	activating transcription factor 4 (ATF4); tax-responsive enhancer element B67 (TAXREB67); cAMP-responsive element-binding protein 2 (CREB2)	0,3	0	0,1	13,1	0,8	0,2	0,1	0,1	13,1	0,1	0,2	0,1
E04b	nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP)	0,1	0	0,6	10,9	0,5	0,2	0,4	0,3	10,9	0,2	0,2	0,1
F10e	small inducible cytokine subfamily A member 5 (SCYA5); regulated on activation normal T-cell-expressed & secreted protein (RANTES); T-cell specific protein p288 (TCP288)	0,9	0,7	1,8	126,8	1,9	6,8	72,1	1,8	126,8	12,4	12,5	33,4
F13f	thymosin beta 10 (TMSB10; THYB10); PTMB10	0	0,1	1,5	95,1	1,2	1,6	18,9	0,9	95,1	2	3	15,8
F13k	proteasome activator HPA28 subunit beta	0,3	0,3	0,7	12,6	0,5	0,8	5	0,9	12,7	0,5	2	2
B04e	TBP-ASSOCIATED FACTOR HTAFII68 (PUTATIVE RNA BINDING PROTEIN RBP56)	5,2	5,7	4,3	2,1	4,3	5,4	3,5	4,5	2,3	4	4,7	3,7
C09i	heart cytochrome c oxidase polypeptide VIa (COX6A)	13,6	10,9	12,8	3,4	15,8	7,4	12,5	14,6	3,8	12,2	13,3	13,8
D02l	A MEMBER OF THE SHORT-CHAIN ALCOHOL DEHYDROGENASE FAMILY	32,5	34,2	28,2	13,7	42,4	41,7	38,1	35,5	11,6	44,6	47,5	29,4
D03g	PEROXISOMAL PHYTANOYL-COA ALPHA-HYDROXYLASE (PHYTANIC ACID OXIDASE)	33,6	33,7	42,4	9,8	58	18,4	38,2	37,2	9,2	52,5	21,8	39,8
E11b	DYSFERLIN	21,9	17,9	17,3	7,7	22,5	13,8	20,5	17,1	8,9	21,1	18,1	18,1
F08i	KIAA0881	13,6	13,5	13,2	3,6	20,9	9	13,8	20	4,7	13,7	14,2	14,6
F11m	DGS-A	8,3	8,8	11,2	1,9	18	5,3	11,2	12,8	2,4	9,7	6,7	14,3
A12k	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit	2,9	2,3	4,5	33,6	2,7	4,3	3,8	2,6	23,1	3,1	2,5	2,1
D06a	60S ribosomal protein L14 (RPL14); CAG-ISL 7	2,2	3,8	3,8	52,9	3,6	11,8	11,7	3,1	22,8	3,2	3,7	2,5
D06e	60S ribosomal protein L12 (RPL12)	1	2,4	2,6	56,4	2	2,6	17,6	3,1	31,8	3,9	2,8	7,2
D06m	60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P1	3	2,7	4,6	45,3	2,3	1,5	11,9	10,9	80,7	2,7	5,4	20
D07m	60S ribosomal protein L23A (RPL23A)	6,9	6,5	8,5	76,9	6	6,1	11	10,2	87,1	5,9	6,8	6,4
D08c	60S ribosomal protein L31 (RPL31)	2,9	2,6	7,1	172,3	3,8	6,9	24,9	3,1	139,1	4	6	14,8
D08g	60S ribosomal protein L19 (RPL19)	3,2	3,9	3,5	18,2	7,7	7,5	8	2,8	24,5	3,6	4,3	2,7
D09f	60S ribosomal protein L3 (RPL3); HIV-1 TAR RNA-binding protein B (TARBP-B)	2,8	3,9	7,3	33,4	3,6	4,3	3,4	4,3	30,5	3,8	3,3	3,5

Tabelle V.5: Gene auf den Human 3.6 Arrays, deren Expression sich bei Tumor P27 deutlich von der Expression in den übrigen Tumoren unterscheidet; In der Tabelle sind die Werte der Arrays I bis III hintereinander aufgelistet; die Positionen A09g bis F13k stammen von Array I, die Positionen B04e bis F11m stammen von Array II, und die Positionen A12k bis D09f gehören zu Array III.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Tumoren bzw. Patienten sollten in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. In der Diskussion werden allerdings ein paar Überlegungen dazu angestellt, woher die unterschiedlich exprimierten Gene resultieren könnten. Besonders die Unterschiede, die P27 gegenüber den anderen Tumoren zeigt, scheinen interessant, da der Patient der einzige ist, der bereits deutlich vor dem 70. Lebensjahr ein Prostatakarzinom entwickelt hat und vermutlich an diesem verstorben ist.

Da es in Anbetracht der großen Menge der untersuchten Gene unwahrscheinlich erschien, dass sich darunter kein Gen befinden sollte, das durch die Expression von PTEN reguliert wird, wurde zusätzlich RNA aus normalem Prostatazellen untersucht. Das Ergebnis wurde mit den für die Tumorzellen erhaltenen Werten verglichen. Da bereits in mehreren Publikationen von Expressionsunterschieden zwischen Tumorzellen und Zellen aus normalem Gewebe berichtet worden war, gingen wir davon aus, auch auf dem Human Cancer Array auf jeden Fall differentiell exprimierte Gene finden zu müssen. Wäre dies nicht der Fall, so könnte man von einem generell auftretenden Fehler z. B. durch eine Kontamination ausgehen. Tatsächlich waren zwischen den Expressionsmustern von normalem und Tumorgewebe einige Unterschiede feststellbar. Sie sind in Tabelle V.6 aufgelistet.

Label	Name	Mittelw. Norm.	Mittelw. Tumoren
E11c	insulin-like growth factor I (IGF1); somatomedin C	13,6	24,39
C08n	prostaglandin E2 receptor EP1 subtype (PTGER1); prostanoid EP1 receptor	3,5	6,03
B14b	mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38); cytokine suppressive anti-inflammatory drug-binding protein (CSAID binding protein; CSBP); MAX-interacting protein 2 (MXI2)	5,4	9,07
B09b	putative RHO/RAC guanine nucleotide exchange factor (rho/rac GEF); faciogenital dysplasia protein 1 (FGD1)	0,25	2,91
F11a	tenascin (TN); hexabrachion (HXB); cytotactin; neuronectin; GMEM; mitotendinous antigen; glioma-associated extracellular matrix antigen	1,5	4,44
C02d	SL cytokine; FMS-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3 ligand; FLT3LG)	1,7	3,94
A03c	myc proto-oncogene	1	2,26
A08f	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGF-binding protein 2; IGFBP2; IBP2)	15,85	4,56
D11h	frizzled homolog 2 (FZD2; FZ2)	3,35	1,94

Tabelle V.6: Differentiell exprimierte Gene, in denen sich Zellen aus normalem Prostatagewebe und Zellen aus einem Prostatakarzinom unterscheiden; die Mittelwerte wurden aus jeweils drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Auch hier wäre es interessant gewesen, einige der Gene näher zu untersuchen. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Doktorarbeit aus Zeitgründen nicht erfolgen. Außerdem war für

eine Untersuchung von aussagekräftigem Umfang nicht genügend normales Prostatagewebe vorhanden. Letztendlich sollte der Versuch nur beweisen, dass mit Hilfe des durchgeführten Versuchsaufbaus vorhandene Expressionsunterschiede erfasst und ausgewertet werden können.

10) aRNA

Parallel zu den Untersuchungen der Tumoren mit Hilfe von SMART und LD-PCR wurde nach einer alternativen Methode gesucht, die es erlaubt, die RNA-Menge vor der Herstellung der radioaktiven Sonde zu amplifizieren, ohne dabei die ursprüngliche Zusammensetzung der mRNA zu verändern, wie es in Abschnitt 6 für die SMART-Methode beschrieben wird. Als mögliche Alternative wurde das aRNA-Kit von Ambion getestet. Um die aRNA-Synthese zu etablieren, wurde zunächst Gesamt-RNA aus LNCaP-Zellen eingesetzt, da diese in großer Menge zur Verfügung stand. Das in Abschnitt 6.6 des Methoden-Teils beschriebene Verfahren konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die RNA aus LNCaP-Zellen wurde um das fünffache amplifiziert. 1 µg der aRNA wurde auf einem 1 %-Agarosegel aufgetrennt (Abbildung V.6). Es ergab sich ein deutlicher Schmier, der aus RNA mit Größen zwischen ca. 100 bis 2000 Basenpaaren bestand. Zusätzlich wurden 200 ng aRNA in eine RT-PCR mit GAPDH-Primern eingesetzt. Man erhielt eine saubere Bande der erwarteten Größe. Leider war die radioaktive Sonde, die aus der aRNA aus LNCaP-Zellen hergestellt wurde, nur sehr schwach und ergab auf den Human Cancer Arrays keine auswertbaren Signale. Das lag vermutlich daran, dass die normalerweise für den Human Cancer Array verwendeten spezifischen Primer nicht für die Herstellung der radioaktiven Sonden benutzt werden konnten, da sie nicht homolog zur aRNA waren. Stattdessen wurden Random Primer (Gibco BRL) eingesetzt, mit deren Hilfe die gesamte RNA markiert wird. Dadurch ist die Sonde jedoch weniger spezifisch und die Signale auf den Arrays sind weniger intensiv.

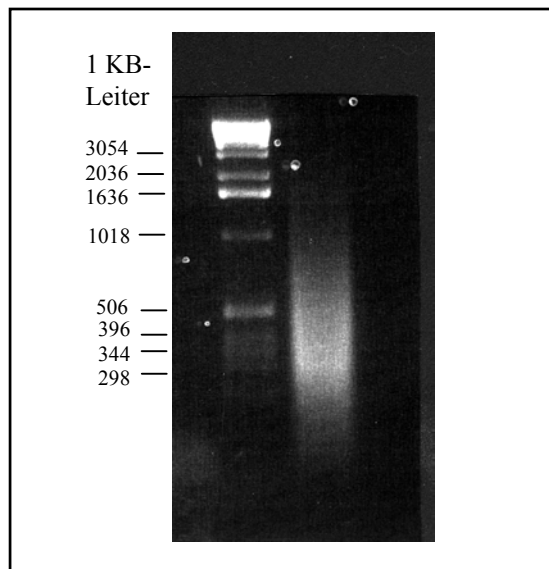


Abbildung V.6: aRNA auf einem 1 %-Agarosegel

Zusätzlich zu der RNA aus LNCaP-Zellen wurde auch RNA aus mikrodisezierten Tumorzellen in den aRNA-Kit eingesetzt. Geht man davon aus, dass sich aus 10.000 mikrodisezierten Zellen etwa 15 bis 20 ng RNA isolieren lassen, so konnte die RNA um einen Faktor von 75 bis 100 amplifiziert werden. Die gesamten 1,5 µg dieser aRNA wurde für die Synthese einer radioaktiven Sonde eingesetzt. Um die Ausbeute zu vergrößern, wurden die nach der Zweitstrangsynthese und dem DNase-Verdau der aRNA durchgeführten Phenol/Chloroform-Extraktionen durch Reinigung der cDNA bzw. aRNA über eine Säule ersetzt. Auch hier war die entsprechende Sonde nur sehr schwach radioaktiv. Trotz der relativ schwachen Sonde zeigte der Human Cancer Array auswertbare Signale. Im großen und ganzen stimmt das Ergebnis mit den Werten überein, die man für die RNA aus Tumorzellen nach SMART und LD-PCR erhält. Alle stark exprimierten Gene liegen in derselben Größenordnung. Der mit Sonden aus aRNA hybridisierte Array zeigt zusätzlich einige Spots, die bei Anwendung der SMART-Methode nicht gemessen werden konnten. Das könnte jedoch auch daran liegen, dass die Intensität des Hintergrunds und die Normalisierung der beiden Arrays zu unterschiedlichen Werten führen.

VI. Diskussion

VI.I LNCaP/„*in vitro*“Analysen

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit sollten mit Hilfe des Modellsystems „LNCaP“ durch PTEN regulierte Gene identifiziert und anschließend im zweiten Teil der Arbeit in Prostatatumoren verifiziert werden. LNCaP-Zellen haben den Vorteil eines klar definierten Systems. Komplexe Interaktionen durch Expression oder Verlust anderer Gene, durch die die Heterogenität von Prostatatumoren charakterisiert ist, müssen bei Verwendung von LNCaP-Zellen nicht berücksichtigt werden. Gene, in deren Expression sich PTEN-negative LNCaP-Zellen von solchen Zellen unterscheiden, die exogenes PTEN exprimieren, sollten durch PTEN reguliert sein.

1) Expression von exogenem PTEN in LNCaP-Zellen

Da die Expression von exogenem PTEN in vielen Zellen Apoptose induziert (Brunet et al., 1999), wurde das induzierbare Vektorsystem pIND (SP1)/pVgRXR (Invitrogen) benutzt, um stabil transfizierte LNCaP-Zellen herzustellen. 24 Stunden nach der Induktion der Zellen durch Zugabe des Ecdyson-Analogons Ponsateron A konnte aus diesen Zellen RNA isoliert und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Wie in Abschnitt 3 des Ergebnisteils beschrieben, gab es zunächst einige Probleme, die Expression des transfizierten *PTEN*-Konstruktes erfolgreich zu induzieren. Eine unzureichende Transfektion der LNCaP-Zellen und eine fehlerhafte Sequenz innerhalb des pIND (SP1)-Konstruktes wurden als Grund für diese Probleme ausgeschlossen. Als Ursache stellte sich schließlich eine Methylierung der transfizierten Konstrukte, insbesondere des konstitutiv exprimierten Helferplasmids pVgRXR, heraus. Diese Methylierung ließ sich durch eine Behandlung der LNCaP-Zellen mit 5-Azacytidin rückgängig machen (Sorm et al., 1964; Ginder et al., 1983).

Über die Methylierung von Vektoren wurde bereits mehrfach in der Fachliteratur berichtet. Singal et al. (2001) transfizierten verschiedene Prostatakrebszelllinien, darunter auch LNCaP, mit einem Vektor, der das Gen der Glutathion-S-Transferase P1 (*GSTP1*) enthielt. Dieses Gen ist in LNCaP-Zellen deletiert, während es z. B. in PC3-Zellen aktiv ist. Nach der Transfektion wurde beobachtet, dass in solchen Zellen, die auch natürlicherweise *GSTP1* exprimieren, die Bildung von exogenem *GSTP1* nachweisbar war. LNCaP-Zellen, die kein natürliches *GSTP1*-Gen besitzen, inaktivierten das transfizierte Konstrukt durch Methylierung.

Auch *in vivo* ist die Methylierung von transfizierten Konstrukten nachweisbar. Di Ianni et al. (2000) berichteten, dass ein retroviraler Vektor, der das Thymidin Kinase-Gen enthielt und

für eine Gentherapie eingesetzt werden sollte, zunächst in die Zelllinie U937 transfiziert wurde. Ein Klon, der das Transgen besonders stark exprimierte, wurde in SCID-Mäuse (SCID = severe combined immunodeficient) injiziert. Daraufhin wurde der Vektor methyliert, und die Expression der Thymidin Kinase ging verloren. Die Methylierung des Konstruktes ließ sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch eine Behandlung mit 5-Azacytidin rückgängig machen.

Bei der Behandlung von Zellen mit Azacytidin muss man allerdings beachten, dass das Azacytidin neben dem transfizierten Konstrukt auch die Transkription anderer methylierter Gene beeinflussen kann. Prostatakrebszelllinien wie LNCaP, PC3 und DU145 regulieren z. B. die Expression von Östrogen-Rezeptoren durch Methylierung der Promotoren (Lau et al., 2000). Da in dieser Doktorarbeit alle LNCaP-Zellen (mit und ohne Wildtyp-*PTEN*-Gen) mit Azacytidin behandelt wurden, dürfte der Einfluss von Azacytidin für die durch *PTEN* differentiell regulierten Gene jedoch nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

Zwar war die Etablierung stabil transfizierter LNCaP-Zellen, die nach der Induktion durch Ponasteron A exogenes *PTEN* exprimierten, gelungen, die Menge an *PTEN*-mRNA, die in Zellen mit exogenem *PTEN* detektiert wurde, betrug jedoch nur etwa das Doppelte von der mRNA, die in LNCaP-Zellen ohne *PTEN*-Konstrukt gefunden wurde. Der mit Hilfe einer quantitativen Realtime RT-PCR ermittelte C_T -Wert war für die *PTEN*-positiven LNCaP-Zellen 26,8 und für solche Zellen, die nur den leeren Vektor enthielten, 28,7. Unter Einbezug der C_T -Werte für Aktin wurde daraus ein Faktor von 2 ermittelt. Dieser relativ geringe Unterschied könnte zum einen an der Expression des *PTEN*-Pseudogens liegen. In den meisten Zellen wird neben dem eigentlichen *PTEN*-Gen zusätzlich das Pseudogen *psiPTEN* (Chromosom 9p21) exprimiert (Dahia et al., 1998), das in einigen Zellen einen Anteil von bis zu 70 % an der detektierten mRNA (Fujii et al., 1999) hat. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 98 % wird auch dessen mRNA in der Regel von *PTEN*-spezifischen Primern erkannt und amplifiziert. Dadurch kommt es zu einer Verfälschung der Ergebnisse, da das sichtbare Signal sowohl durch *PTEN*-mRNA als auch durch das Pseudogen hervorgerufen wird. Dies war wahrscheinlich auch bei der vorliegenden quantitativen Realtime RT-PCR der Fall. Andererseits konnte eine andere Arbeitsgruppe des Instituts, die ebenfalls mit dem Ecdyson-induzierbaren System arbeitete, ebenfalls nur in relativ geringem Umfang eine Expression ihres Zielgens erreichen. Zudem ergab ein persönlicher Kontakt mit der Arbeitsgruppe von Prof. N. Maitland (Sharrard et al., 2000), dass auch diese Gruppe Probleme damit hatte, mit Hilfe eines induzierbaren Vektorsystems (unter anderem pIND

(SP1)/pVgRXXR) eine stabile LNCaP-Zelllinie mit hoher Expression von exogenem PTEN nach der Induktion zu etablieren.

Die erfolgreiche Expression von exogenem PTEN in transfizierten und induzierten LNCaP-Zellen konnte zwar mittels RT-PCR mit einem Flag-spezifischen Primer einwandfrei nachgewiesen werden, eine Detektion des PTEN-Proteins mit Hilfe eines Western Blot gelang jedoch nicht. Das entspricht dem Ergebnis von Sharrard et al. (2000), die zwar für exogen exprimiertes PTEN in transfizierten Zelllinien aus normalen Epithelzellen der Prostata im Western Blot deutliche Banden erhielten, denen aber der Nachweis von exogenem PTEN in LNCaP- und PC3-Zellen kaum oder gar nicht gelang. Die Autoren der entsprechenden Publikation führten dieses Ergebnis darauf zurück, dass nur in wenigen Zellen eine starke Expression von PTEN vorlag, während PTEN in den meisten Zellen nur mäßig exprimiert war. Außerdem gingen sie davon aus, dass das PTEN-Protein relativ kurzlebig ist. Damit dürfte die Menge an exogenem PTEN unterhalb der Nachweiskgrenze des Western Blots liegen.

2) Wachstum PTEN-transfizierter Zellen

Beim Vergleich des Wachstums von LNCaP-Zellen mit und ohne PTEN ergab sich, dass Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert worden waren, normales, exponentielles Wachstum zeigten, während solche Zellen, die exogenes PTEN exprimierten, sich in ihrer Anzahl kaum veränderten. Während die LNCaP-Zellen ohne PTEN sich relativ gleichmäßig über den Boden der Zellkulturschale verteilten und eine längliche, gestreckte Form einnahmen, wuchsen die *PTEN*-transfizierten Zellen in Kolonien und zeigten eine eher kompakte Form. Eine durch PTEN induzierte Apoptose war nicht sichtbar. Auch zeigte eine Untersuchung der DNA aus diesen Zellen nicht die für die Apoptose typische Leiterform, die durch Fragmentierung der DNA hervorgerufen wird (Peitsch et al., 1993; Walker et al., 1993). Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Resultaten überein, die Sharrard et al. 2000 publiziert haben. Auch hier wurde die Überexpression von PTEN in zwei Prostatakrebszelllinien (LNCaP und PC3) sowie in zwei Zelllinien, die aus normalem Prostataepithel generiert worden waren, untersucht. Während sich aus normalen Zellen konstitutiv PTEN-exprimierende Zelllinien herstellen ließen, unterlagen die Prostatakrebszelllinien zu sehr der wachstumshemmenden Funktion von PTEN. PTEN beeinflusste sowohl die Zellmorphologie als auch das adhärente Wachstum der Zellen. LNCaP und PC3 zeigten ein deutliches Abrunden der sonst eher länglichen Epithelzellen und lösten sich vom Boden der Zellkulturschalen. Klassische Apoptose als primärer Effekt war

kaum zu beobachten. Vielmehr trat Apoptose erst nach längerer Zeit als sekundäres Ereignis auf, das aus den fehlenden Signalen der Extrazellulären Matrix bzw. des Substrates resultierte. Diesen Effekt nennt man Anoikis (Frisch et al., 1994; Ruoslahti et al., 1994). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Davies et al. (1999), die vier bis sechs Tage nach der Transfektion von LNCaP mit einem adenoviralen, konstitutiv PTEN-exprimierenden Konstrukt Apoptose beobachteten. Allerdings postulierten Davies et al., dass neben der Apoptose auch andere Mechanismen für die Unterdrückung des Zellwachstums verantwortlich sind.

3) Ergebnisse der Array-Analysen und der RT-PCR

Problematisch war in diesem Fall, dass kein Szintillationszähler zur Verfügung stand, um nachzumessen, wie effektiv der Einbau von radioaktiv markiertem ^{33}P -dCTP war. Obwohl immer die gleiche Menge an RNA oder cDNA für die Synthese der radioaktiven Sonden eingesetzt wurde und Zusammensetzung und Reaktionszeiten immer gleich waren, kann man trotzdem nicht davon ausgehen, dass die radioaktive Markierung immer gleich erfolgreich verläuft. Zum einen nimmt mit zunehmendem Alter der Enzyme die Aktivität der Reversen Transkriptase und des Klenow-Fragmentes ab. Zum anderen hatten die unterschiedlichen Chargen des verwendeten ^{33}P -dCTP unterschiedliche Aktivitäten. Sinnvoll wäre also gewesen, die spezifische Aktivität einer Sonde zu messen und immer eine festgelegte Menge an Radioaktivität für die Hybridisierung einzusetzen. Stattdessen wurde in dieser Arbeit die Radioaktivität mit einem Geigerzähler gemessen und solche Mengen der radioaktiven Sonden eingesetzt, dass die gemessene Strahlung etwa gleich war.

Zudem zeigten die Human Cancer und Human 3.6 Arrays, die ebenfalls von der Firma Clontech erworben wurden, keine gleichbleibende Qualität. Während die Arrays einer Charge bis zu achtmal verwendet werden konnten, zeigte eine zweite Charge bereits bei der ersten Wiederholung deutliche Abnutzungserscheinungen. Obwohl eine radioaktive Sonde von ähnlicher Aktivität wie beim ersten Versuch verwendet worden war, betrugen die Intensitäten der auf den Arrays vorhandenen Signale nur noch etwa die Hälfte der zuvor gemessenen Werte.

Der Tatsache, dass bei unterschiedlichen Arrays unterschiedliche cDNA-Mengen in den Spots enthalten sein können, wurde dadurch Rechnung getragen, dass z. B. beim Vergleich von LNCaP-Zellen mit und ohne PTEN-Konstrukt nicht die absoluten Werte miteinander verglichen wurden, sondern nur das Verhältnis der Expressionsunterschiede innerhalb eines Versuchs wichtig war. Durch Vertauschen der Arrays beim folgenden Versuch wurde

sichergestellt, dass unterschiedliche Intensitäten einzelner Spots nicht durch unterschiedliche Mengen an gespotteter cDNA sondern tatsächlich durch unterschiedliche Mengen innerhalb der radioaktiven Sonde hervorgerufen wurden. Mittelwerte wurden nur gebildet, um einen besseren Überblick über die Daten zu erhalten.

Grundsätzlich lässt sich zu den Ergebnissen der Array-Analysen sagen, dass wir eigentlich größere Unterschiede zwischen PTEN-positiven und PTEN-negativen LNCaP-Zellen erwartet hätten. Ausschlaggebend ist hier nicht die Anzahl der Gene, sondern der Faktor, um den sich die Gene in ihrer Expression in den transfizierten Zellen unterscheiden. Die ermittelten Faktoren für die sechs näher untersuchten Gene lagen zwischen 3 und 6. In einer anderen Arbeitsgruppe des Instituts wurden bei ähnlichen Untersuchungen an Wilms Tumoren Gene gefunden, die sich teilweise um das zehnfache oder noch stärker unterschieden (unveröffentlichte Daten). Das Problem im Falle der transfizierten LNCaP-Zellen liegt vermutlich darin, dass die Expression von PTEN mit Hilfe des induzierbaren Konstruktes nicht besonders intensiv war. In der quantitativen Realtime RT-PCR betrug der Faktor zwischen *PTEN*-mRNA-Mengen in LNCaP-Zellen mit und ohne *PTEN* nur etwa 2.

Hinzu kommt natürlich, dass die Gene, die letztendlich mittels RT-PCR untersucht wurden, nach einem strengen Kriterium ausgewählt wurden: Berücksichtigt wurden nur solche Gene, die in allen sechs Wiederholungen des Array-Experiments einen Faktor von mindestens 3 zwischen Zellen mit und ohne PTEN zeigten. Es gab aber auch solche Gene, die nur bei fünf Wiederholungen einen Unterschied aufwiesen, bei der sechsten jedoch nicht. Das könnte an Ungenauigkeiten bei der Auswertung z.B. durch den Abzug eines zu hohen Hintergrunds aufgrund von Flecken auf der Membran hervorgerufen werden. Auch diese Gene unterliegen möglicherweise einem Einfluss von PTEN und könnten in Zukunft genauer untersucht werden.

Im Rahmen der Array-Analysen von transfizierten LNCaP-Zellen wurden sechs Gene gefunden, die durch die Anwesenheit oder Abwesenheit von *PTEN* reguliert zu werden schienen. Für drei Gene ließ sich dieses Ergebnis mittels RT-PCR bestätigen. Für keines dieser Gene ist bisher ein Zusammenhang mit *PTEN* bekannt. Hinzu kommt, dass bei allen drei Genen die Funktion in Säugerzellen noch nicht hundertprozentig bekannt und verstanden ist.

Das Protein Seven in Absentia (Sina) ist für die Differenzierung bestimmter Zellen und die korrekte Entwicklung des R7-Photorezeptors im Auge von *Drosophila melanogaster* verantwortlich. Dabei agiert Sina unterhalb der Tyrosin-Kinase Sevenless im Ras/Raf-Signaltransduktionsweg. Dem humanen Homolog des Sina-Gens, *SIAH2*, wird aufgrund der

hohen Sequenzhomologie zu Sina ebenfalls eine Funktion im Rahmen des Ras/Raf-Signaltransduktionsweges zugeschrieben (Della et al., 1995). Da auch der AKT-Kinase-Signaltransduktionsweg, in dem PTEN aktiv ist, einer Regulation durch Ras unterliegt (siehe Abbildung VI.1), ist ein Einfluss von PTEN auf *SIAH2* möglich. Die genaue Position von *SIAH2* innerhalb des Signaltransduktionsweges ist jedoch nicht bekannt. Ginge man davon aus, dass ein Verlust von *PTEN* zur verstärkten Expression von *SIAH2* führt, wie es die Array-Ergebnisse und die RT-PCR vermuten lassen, so hieße das, dass *SIAH2* direkt oder über Umwege zur verstärkten Proliferation der betroffenen Zellen und zur Metastasierung des Tumors beiträgt.

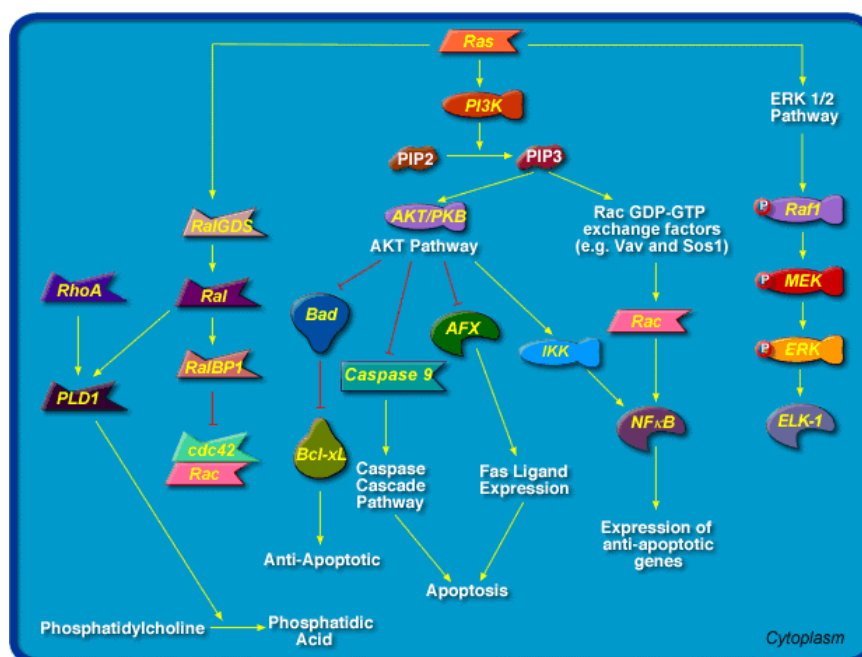


Abbildung VI.1: Einfluss von Ras auf den AKT-Kinase-Signaltransduktionsweg (entnommen aus <http://cgap.nci.nih.gov/Pathways>).

Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse, die Matsuzawa et al. (1998) bei der Untersuchung von *SIAH1A*, einem der drei *SIAH*-Gene, erzielt haben. Eine Transfektion von *SIAH1A* in 293-Zellen und GM701-Zellen führte zu einem Stillstand des zellulären Wachstums, allerdings ohne Induktion von Apoptose. Dabei verhinderte *SIAH1A* den Eintritt der Zellen in die DNA-Synthese-Phase und damit das Fortschreiten des Zellzyklus. Die natürliche Expression von *SIAH1A* *in vivo* wird durch p53 induziert. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie liegt es nahe, dass *SIAH2* ähnliche Aufgaben wie *SIAH1A* übernimmt. Allerdings wäre es auch möglich, dass ein Protein zwei gegensätzliche Reaktionen der Zelle hervorrufen kann. Der weiter unten beschriebene Transkriptionsfaktor E2F1 z. B. bewirkt in der Regel das Fortschreiten des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase. E2F1 kann jedoch

auch p53-abhängige oder -unabhängige Apoptose von Zellen hervorrufen. Möglicherweise zeigt SIAH2 ein ähnliches Verhalten. Bekannt ist, dass SIAH2 in die neuronale Entwicklung bei Säugetieren involviert ist und die Ubiquitin-abhängige Degradierung verschiedener neuronaler Ziel-Proteine bewirkt (Wheeler et al., 2002), unter anderem die des neuronalen Membranproteins DCC (deleted in colorectal cancer).

Der sortilin-related Rezeptor LR11 ist bisher nur ansatzweise charakterisiert. Er gehört zur low density lipoprotein receptor (LDLR)-Familie und zur Familie der vacuolar protein sorting 10 protein (Vps10p) domain-Rezeptoren. In der Literatur ist LR11 auch unter der Abkürzung sorLA-1 zu finden. In transfizierten Zellen werden etwa 10 % des exogenen LR11-Proteins auf der Zelloberfläche exprimiert und stehen dort für die Aufnahme von Lipoproteinen und Proteasen durch Endocytose zur Verfügung (Jacobsen et al., 2001). Da proliferierende Zellen einen deutlich aktiveren Stoffwechsel besitzen als ruhende Zellen und damit auch verstärkt Nährstoffe aus der Umgebung aufnehmen, wäre eine verstärkte Expression von LR11 in LNCaP-Zellen ohne *PTEN*, die für einen Prostatatumor im fortgeschrittenen Stadium stehen, nicht verwunderlich. Das gleiche gilt für die übrigen 90 % der Rezeptoren, die sich im Golgi-Apparat befinden, um dort möglicherweise mit neu synthetisierten Liganden zu interagieren und sie zu sortieren. Die Expression von *LR11* findet hauptsächlich in Nervenzellen statt, der Rezeptor kommt aber auch in anderen Geweben wie Lymphknoten, Muskelzellen, Prostata und Niere vor. Die Tatsache, dass *LR11* besonders stark in proliferierenden Zellen exprimiert wird und in differenzierten Zellen in deutlich geringerem Umfang nachweisbar ist, wurde im Jahr 2000 von Hirayama et al. publiziert. Hinzu kommt, dass eine Überexpression von *LR11* in Muskelzellen (vascular smooth muscle cells) die Migration und Invasion der betroffenen Zellen verstärkt. (Zhu et al., 2002). Dieser Effekt ist allerdings abhängig von der Präsenz des platelet derived growth factor B (PDGFB). Ob auch die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen durch LR11 aktiviert werden kann, wurde bisher nicht untersucht. Sollte dies der Fall sein, so scheint ein Zusammenhang zwischen *PTEN* und *LR11* durchaus logisch, da der Verlust von *PTEN* ebenfalls zu einer verstärkten Metastasierung von Tumoren beiträgt.

Die *Tousled-like Kinase 1 (TLK1)* wurde 1999 in menschlichen Zellen identifiziert (Silljé et al., 1999). Das Gen weist etwa 50 % Homologie zum Tousled-Gen bei *Arabidopsis thaliana* auf, das für eine korrekte Entwicklung der Blüte essentiell ist. Die Tousled-like Kinase, eine Serin/Threonin-Kinase, ist in die Regulation des Zellzyklus involviert. Zwar wird *TLK1* während des gesamten Zellzyklus in etwa gleichbleibender Menge exprimiert, die Aktivität

des Enzyms steigt jedoch durch Phosphorylierung von TLK1 besonders während der DNA-Synthese an. Auffällig ist, dass *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) kein entsprechendes Enzym besitzt. Das könnte darauf hindeuten, dass TLK1 für die Differenzierung mehrzelliger Organismen notwendig ist. Dass TLK1 bei der Chromatin-Formation eine Rolle spielt, wurde 2001 von Silljé et al. publiziert. Zusätzlich ergaben Untersuchungen von Li et al. (2001), dass bei Überexpression von TLK1 in Säugerzellen eine verstärkte Phosphorylierung des Histons H3 zu beobachten ist. H3 spielt bei der Kondensation des Chromatins während der Mitose eine wichtige Rolle. Außerdem fiel den Wissenschaftlern auf, dass die Expression von exogenem *TLK1* zu einer verstärkten Toleranz der Zellen gegenüber ionisierender Strahlung führte. Möglicherweise wird ein DNA-Reparaturmechanismus durch TLK1 positiv beeinflusst. Alle diese Informationen lassen es eher unwahrscheinlich erscheinen, dass TLK1 zur Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen beitragen könnte. Es sieht eher so aus, als würde die Aktivität von TLK1 eine geregelte DNA-Replikation aufrechterhalten und eventuell einen Einfluss auf die Korrektur von Schäden innerhalb der DNA, die durch ionisierende Strahlung auftreten, ausüben. Diese Funktionen würde man einem Tumorsuppressorgen zuschreiben.

Bei den drei Genen, deren differentielle Expression durch die RT-PCR nicht bestätigt werden konnte, handelt es sich um *E2F1*, *Desmocollin 2* und *Survivin*. Die Funktion dieser Gene ist in den folgenden Abschnitten dargestellt. Um eindeutig feststellen zu können, ob eine Regulation durch PTEN vorliegt oder nicht, müssen die RT-PCRs für diese Gene noch mehrmals wiederholt werden.

Der E2F Transkriptionsfaktor 1 (E2F1) gehört zu der E2F-Familie der Transkriptionsfaktoren. Diese sind in die Kontrolle des Zellzyklus und die Funktion von Tumorsuppressorgen involviert und stellen ein wichtiges Ziel für die transformierenden Proteine kleiner DNA-Tumor-Viren dar. E2F1 reguliert das Fortschreiten des Zellzyklus von der G1- in die Synthese-Phase. Haben die Zellen diesen Punkt überschritten, so ist keine weitere Stimulation notwendig, um den Zellzyklus vollständig zu beenden. Zellen, deren *E2F1*-Gen zusammen mit den verwandten Genen *E2F2* und *E2F3* mutiert ist, verharren in der G1-Phase und sind zu keiner weiteren Proliferation fähig (Wu et al., 2001). E2F1 bildet einen Komplex mit der unphosphorylierten Form des Retinoblastoma Proteins (Rb). Solange dieser Komplex besteht, bleibt die Zelle in der G1-Phase. Die Phosphorylierung von Rb führt dazu, dass sich das E2F1-Protein löst, an die DNA bindet und den Eintritt in die Synthese-Phase bewirkt (Ishida et al., 2001). Unter anderem initiiert E2F1 dabei die Expression solcher Gene, die für die

DNA-Synthese notwendig sind, die Expression von Zyklin-Genen und schließlich die eigene Expression. In Tumoren ist das Rb-Gen oft mutiert; ist es intakt, so liegt in der Regel eine andere Störung des Rb-Signaltransduktionsweges vor. Folglich ist in solchen Tumoren keine wirksame Zellzykluskontrolle mehr vorhanden. In Anbetracht dieser Funktion wäre es nicht verwunderlich, wenn *E2F1* in fortgeschrittenen Tumoren stärker transkribiert würde als in früheren Stadien. Eine Aktivierung des *E2F1*-Gens durch den Verlust von *PTEN* wäre durchaus denkbar.

E2F1 kann jedoch auch die p53-abhängige oder -unabhängige Apoptose von Zellen hervorrufen. Überexpression von E2F1 in kultivierten Zellen führt zur Expression des Proteins p14^{ARF}. Dieses Protein stabilisiert den Tumorsuppressor p53 und führt damit zu verstärkter Apoptose (Wu et al., 1994). Diese Funktion lässt es eher unwahrscheinlich erscheinen, dass der Verlust von *PTEN* eine stärkere Transkription von *E2F1* induzieren könnte.

Survivin ist auch unter den Namen „Baculoviral IAP repeat-containing protein 5“ oder „Apoptosis inhibitor 4“ (API4) bekannt. Es wird insbesondere während der Embryogenese im Laufe des Zellzyklus in der G2/M-Phase exprimiert. In vollständig differenzierten Zellen ist Survivin nicht nachweisbar. Allerdings tritt Survivin in Krebszellen auf und vermag bei transformierten Zellen eine Apoptose zu verhindern (Ambrosini et al., 1997). Während der Mitose ist Survivin mit den Mikrotubuli des Spindelapparats assoziiert. Es inhibiert die Aktivität von Caspase 3 und Caspase 7 und führt dadurch zu einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen und zu verstärkter Angiogenese. Die Apoptose der Zellen wird verhindert (Yamamoto et al., 2001). Auch in Prostatakrebs wurde eine Überexpression von Survivin bereits nachgewiesen. Insbesondere neuroendokrine Zellen exprimieren Survivin sowohl in bösartigen als auch in gutartigen Geweben, wodurch die Apoptose dieser Zellen blockiert wird (Xing et al., 2001). Die Autoren der entsprechenden Studie vermuten, dass zwischen Wachstum und Differenzierung der neuroendokrinen Zellen und der Progression von Prostatakrebs, insbesondere der Androgen-insensitiven Form, ein Zusammenhang besteht. Aus Patientendaten konnten sie einen Trend in diese Richtung feststellen, aufgrund der geringen Patientenzahl sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Ein Zusammenhang zwischen *PTEN* und Survivin wäre durchaus denkbar, da sowohl der Verlust von PTEN als auch die Expression von Survivin zu einer verstärkten Proliferation von Tumorzellen und zur Angiogenese in Tumoren führen.

Desmocollin 2 ist ein Kalzium-abhängiges Glykoprotein. Es gehört zur Familie der Cadherine, membranständiger Adhäsionsmoleküle, die für Differenzierung und Struktur

verschiedener Gewebe eine wichtige Rolle spielen. Desmocolline treten in drei Isoformen auf und werden hauptsächlich in Epithelzellen exprimiert. Zusammen mit den beiden anderen Isoformen bildet Desmocollin 2 das sogenannte Desmosom, das für interzelluläre Kontakte notwendig ist. Dadurch wird die Struktur des Gewebes stabilisiert. Das *Desmocollin 2*-Gen ist auf Chromosom 18q12.1 lokalisiert (Garrod et al., 2002).

De Bruin et al. haben 1999 beim Vergleich einer Zelllinie aus einem invasiven oralen Tumor mit einer normalen oralen Keratinozytenzelllinie herausgefunden, dass die Expression von Desmocollin 2 in invasiven Zellen deutlich höher ist als in normalen Zellen. In invasiven Zellen waren außerdem Zahl und Größe der Desmosomen erhöht. Im Gegensatz dazu war die Expression von E-, N-, und P-Cadherin in invasiven Zellen deutlich erniedrigt. Anders als bei diesen Cadherinen scheint ein interzellulärer Kontakt durch Desmocollin 2 also eine Voraussetzung für die Metastasierung von Tumoren zu sein. Die verstärkte Transkription von *Desmocollin 2* nach Verlust der Expression von *PTEN*, die auf den Human Cancer Arrays gefunden wurde, erscheint damit durchaus möglich zu sein. Auch hier müsste das Ergebnis der RT-PCR nochmals überprüft werden. Alle sechs Gene könnten auch dadurch verifiziert oder falsifiziert werden, dass man erneut eine PTEN-Immunhistochemie mit anschließender Mikrodisektion bei Prostatatumoren vornimmt, RNA isoliert und die Gene durch den Einsatz spezifischer Primer in einer RT-PCR semiquantitativ untersucht, wie es bereits mit LNCaP-RNA geschehen ist.

4) Ausblick

Da das pIND (SP1)-Konstrukt das *PTEN*-Wildtyp-Gen nur in relativ geringem Umfang exprimiert, wäre es denkbar, dieses System durch einen anderen induzierbaren Vektor wie z. B. das Tet-On/Off-System zu ersetzen. Möglicherweise zeigen differentiell exprimierte Gene dann eine noch größere und eindeutige Differenz zwischen LNCaP-Zellen mit und ohne PTEN, oder man könnte eine größere Anzahl solcher Gene finden.

Da der zeitliche Rahmen dieser Doktorarbeit nicht ausreichte, um alle 18 möglicherweise differentiell exprimierten Gene zu untersuchen, wurden strenge Maßstäbe angelegt und sechs Gene ausgewählt, da sie in allen sechs Array-Experimenten einen deutlichen und konstanten Unterschied zwischen PTEN-positiven und -negativen LNCaP-Zellen zeigten. In Zukunft sollten auch die 12 verbliebenen Kandidatengene eingehend untersucht werden, um zu zeigen, ob sich unter ihnen weitere differentiell exprimierte Gene befinden.

VI.II Prostatatumoren/„*in vivo*“-Analysen

In Abschnitt 7 der Einleitung wurde die Funktion des Tumorsuppressorgens *PTEN* ausführlich beschrieben. In Anwesenheit von *PTEN* wird unter anderem der AKT-Kinase-Signaltransduktionsweg blockiert (Di Cristofano et al., 2000). Es kommt zur Transkription proapoptotischer Gene und damit zum Zelltod (Brunet et al., 1999). Migration und Metastasierung der Zellen werden unterbunden. Die Abwesenheit von *PTEN* führt dagegen zu einer verstärkten Proliferation der betroffenen Zellen und zur Angiogenese in Tumoren.

Im zweiten Abschnitt dieser Doktorarbeit sollten mit Hilfe von cDNA-Subtraktionsanalysen bzw. cDNA-Arrays die Expressionsmuster von *PTEN*-positiven und *PTEN*-negativen Tumorregionen festgestellt und miteinander verglichen werden. Ziel war es, solche Gene zu identifizieren, die einer Regulation durch *PTEN in vivo* unterliegen.

1) cDNA-Subtraktion

Am Anfang dieser Doktorarbeit war geplant, eine cDNA-Subtraktion (Diatchenko et al., 1996) durchzuführen, um zwischen *PTEN*-positiven und *PTEN*-negativen Tumorregionen differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Nach mehreren Monaten wurde dieser Teil der Doktorarbeit aufgrund mangelnder Ergebnisse abgebrochen und durch die Analyse mit Hilfe von cDNA-Arrays ersetzt. Zwar schien die Herstellung von cDNA mittels SMART und LD-PCR zunächst erfolgreich zu verlaufen, die eigentliche Subtraktion brachte jedoch keine differentiell exprimierten Gene, da eine Ligation der Adaptoren nicht im gewünschten Umfang stattfand. Durch Veränderung einiger Parameter wie z.B. die Zugabe von Glykogen als Trägermaterial bei der Ligation der Adaptoren an die cDNA oder eine Veränderung der Pufferkonzentrationen nach Angaben aus dem Buch „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) konnte der Versuchsablauf zwar optimiert werden, so dass die Subtraktion der zum Kit gehörigen positiven Kontrolle relativ gute Ergebnisse brachte, eine Subtraktion mit cDNA aus Tumoren konnte jedoch in keinem Fall erfolgreich durchgeführt werden. Als Grund wurde hier bereits eine mangelnde Qualität der verwendeten RNA vermutet. Dass es sich tatsächlich um RNA von relativ schlechter Qualität handelte, ließ sich jedoch erst später beweisen (siehe Abschnitt 4). Da der Fehler zu diesem Zeitpunkt nicht behoben werden konnte, wurde keine weitere cDNA-Subtraktion durchgeführt.

2) Nachweis der *PTEN*-Expression in Tumorzellen

Ebenso wie bei den transfizierten LNCaP-Zellen wurde die Untersuchung der *PTEN*-Expression in Prostatatumoren durch die Präsenz des *PTEN*-Pseudogens erschwert (siehe

VI.I, Abschnitt 1). Darauf lässt sich zum Beispiel das Ergebnis der quantitativen Realtime RT-PCR bei den Prostatatumoren zurückführen. Hier wurde auch in immunhistochemisch PTEN-negativen Bereichen eine im Vergleich zu den PTEN-positiven Regionen erhebliche Menge an mRNA detektiert, so dass kaum ein Unterschied zwischen den *PTEN*-mRNA-Mengen in positiven und negativen Regionen zu existieren schien. Vermutlich handelte es sich jedoch bei einem Großteil der mittels Realtime RT-PCR amplifizierten RNA um die mRNA des Pseudogens, während die eigentliche *PTEN*-mRNA, aus der später das funktionelle PTEN-Protein entsteht, in der Unterzahl war. Darum schien in zwei Tumoren nur minimal mehr *PTEN*-mRNA in den positiven Bereichen als in den negativen Bereichen vorhanden zu sein. Da die Primer und die Sonde für die quantitative Realtime RT-PCR definierte Längen und Schmelztemperaturen haben müssen, und das amplifizierte Fragment zwischen 100 und 120 bp groß sein sollte, war es nicht möglich, innerhalb der wenigen Regionen des *PTEN*-Gens passende Sequenzen zu finden, die sich vom *PTEN*-Pseudogen unterscheiden.

Da eine Anzahl von mindestens 34 Zyklen notwendig war, um ein messbares Signal für *PTEN*-mRNA zu erhalten, kann man darauf schließen, dass das Wildtyp-*PTEN*-Gen entweder nur in sehr geringem Umfang in PTEN-positiven Tumorzellen transkribiert wird, oder dass die mRNA extrem kurzlebig ist. Allerdings schien diese Menge an funktionellem PTEN auszureichen, um die AKT-Kinase in den Tumorzellen fast vollständig zu dephosphorylieren. Die Immunhistochemie eines Prostatatumors mit einem PTEN- bzw. einem AKT-P-Antikörper ergab, dass eine PTEN-positive Drüse im Folgeschnitt keinerlei Färbung für die phosphorylierte Form der AKT-Kinase aufwies, während eine PTEN-negative Drüse im Folgeschnitt ein intensives Signal für AKT-P zeigte (siehe Abschnitt 7, Ergebnisse Prostatatumoren).

Um das Problem zu umgehen, dass mit *PTEN*-spezifischen Primern auch die mRNA des *PTEN*-Pseudogens amplifiziert wird, wurde für die RT-PCR zum Nachweis von exogenem *PTEN* in LNCaP-Zellen ein Flag-spezifischer Primer verwendet. Bei dem exogenen PTEN handelte es sich um ein Fusionsprotein, an dessen N-Terminus sich eine Flag-Markierung befand. Dementsprechend konnten in der RT-PCR Primer eingesetzt werden, die komplementär zur Flag-Sequenz der mRNA waren. Eine solche Lösung war für die Untersuchung der Prostatatumoren nicht möglich.

3) Normalisierung der C_T -Werte der Quantitativen Realtime RT-PCR

Um sicherzustellen, dass die gemessenen C_T -Werte durch unterschiedliche *PTEN*-mRNA-Anteile an der Gesamt-RNA von *PTEN*-positiven und -negativen Tumorregionen bzw. LNCaP-Zellen mit und ohne *PTEN* hervorgerufen wurden und nicht aus dem Einsatz unterschiedlicher cDNA-Mengen in der Realtime RT-PCR resultierten, wurde für jede cDNA eine zusätzliche Realtime RT-PCR mit Aktin-spezifischen Primern durchgeführt. Aktin wurde ausgewählt, weil man bisher davon ausging, dass dieses „housekeeping“-Gen nicht durch die differentielle Expression anderer Gene beeinflusst wird, sondern dass die mRNA-Menge in verschiedenen Spezies oder Zellen unterschiedlicher Stadien relativ konstant bleibt. Inzwischen existiert jedoch auch die gegenteilige Meinung, dass die Expression von Aktin sehr wohl beeinflussbar ist. Die Expression könnte z.B. bei proliferierenden Zellen deutlich höher sein als bei differenzierten Zellen, weil im ersten Fall mehr Aktin benötigt wird.

In dieser Doktorarbeit wurde eine Normalisierung der C_T -Werte mit Hilfe von Aktin durchgeführt. Die Ergebnisse der Realtime RT-PCR mit Aktin-Primern lagen für die *PTEN*-positiven und *PTEN*-negativen Regionen jedoch nahe beieinander (bei P16 und P53 weniger als ein Zyklus Unterschied, bei P27 zwei Zyklen Unterschied), so dass die Berechnungen mit und ohne Normalisierung zu ähnlichen Ergebnissen führten. In beiden Fällen schienen sich *PTEN*-positive und -negative Tumorregionen kaum in ihrem *PTEN*-mRNA-Gehalt zu unterscheiden.

4) SMART/LD-PCR/RNA-Qualität

Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, ergaben sich bei der Array-Analyse Probleme mit solchen Daten, die nach vorangegangener Reverser Transkription mittels SMART und anschließender Amplifikation durch eine LD-PCR aus der RNA aus mikrodisezierten Tumorzellen erzeugt worden waren. Scheinbar differentiell exprimierte Gene, die in einem Experiment gefunden wurden, zeigten bei der Wiederholung keinen Unterschied mehr. Auch die für die LNCaP-Zellen gefundenen differentiell exprimierten Gene waren bei den Prostata Tumoren nicht auffällig. Das Problem liegt hier vermutlich in der SMART-Methode und der LD-PCR.

Schwierigkeiten bereitete zunächst die Tatsache, dass für die SMART-Methode (Chenchik et al., 1998) intakte RNA eine Voraussetzung ist. Einer der beiden für die Reverse Transkription verwendeten Primer, das SMART-Oligonukleotid, besitzt eine Oligo-dT-Region, die an den PolyA-Fortsatz der mRNA binden soll. Fehlt der PolyA-Fortsatz, weil die RNA degradiert ist, so ist keine Reverse Transkription möglich. Eine Kontrolle der RNA-Qualität vor Beginn der

Versuche ist damit unerlässlich. Die RNA-Menge, die man aus mikrodisektierten Zellen oder einem Gefrierschnitt gewinnen kann, ist jedoch so gering, dass sie auf einem herkömmlichen Formaldehyd-Gel nicht nachweisbar ist. Mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer stand erst gegen Ende dieser Doktorarbeit eine funktionierende Methode für die Überprüfung der RNA-Qualität bei geringen RNA-Mengen zur Verfügung. Die stichprobenartigen Untersuchungen ergaben eine relativ gute Qualität der RNA aus Schnittabfällen, die beim Herstellen der Gefrierschnitte entstanden waren. Bei Prostatatumoren, deren RNA nicht mit dem Agilent Bioanalyzer untersucht wurden, kann jedoch auch eine deutlich schlechtere RNA-Qualität vorgelegen haben, je nachdem, wie schnell der Tumor nach der operativen Entnahme in Stickstoff eingefroren wurde, und ob er ordnungsgemäß transportiert und gelagert wurde. Bei der Durchführung der Immunhistochemie wurde die Qualität der RNA allerdings deutlich reduziert. Während die Mikrodisektion keinen Einfluss auf die RNA-Qualität hatte, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt entwässert und RNasen nicht mehr aktiv waren, stellte die Immunhistochemie einen problematischen Schritt dar. Obwohl zu jeder der verwendeten Lösungen RNase-Inhibitor zugefügt wurde, scheint die gesamte Prozedur mit 40 Minuten Dauer zu zeitaufwändig zu sein. Entweder müsste man die Methode deutlich kürzen, oder man verzichtet vollständig auf die Immunhistochemie und führt lediglich eine Färbung mit Hämatoxylin durch, um die Struktur des Gefrierschnitts besser erkennen zu können. Die Hämatoxylin-Färbung dauert nur wenige Sekunden. Anschließend könnten die Regionen, die mikrodisektiert werden sollen, durch Vergleich mit einem markierten Referenzschnitt bestimmt werden. Dabei besteht jedoch das Problem, dass sich Lage und Größe der Tumordrüsen in den dem Referenzschnitt folgenden Schnitten verändern können. Ohne Immunhistochemie könnte man diese Änderungen kaum nachvollziehen.

Sollte eine Amplifikation der RNA unverzichtbar sein, so wäre es vielleicht besser, die cDNA mit Hilfe von Random-Primern herzustellen. Auf diese Weise könnte auch RNA von etwas schlechterer Qualität ohne intaktes 3'-Ende erfolgreich revers transkribiert werden. Natürlich müssten dann auch die Primer zur Herstellung der Sonde und die auf die Arrays gespottete cDNA entsprechend gestaltet sein.

Außerdem geht man bei Anwendung der SMART-Methode davon aus, dass alle mRNAs in gleichem Umfang zu cDNA transkribiert werden. Je nach Art und Stabilität der Sekundärstrukturen können einzelne mRNAs jedoch effektiver oder weniger effektiv transkribiert werden.

Auch die LD-PCR (Barnes et al., 1994) kann zu einer deutlichen Verschiebung der ursprünglichen Zusammensetzung der RNA führen. Hier steht die Anzahl der verwendeten

Zyklen nicht von vornherein fest, sondern die optimale Anzahl wird bestimmt. Dazu wurden während dieser Arbeit nach 23, 26, 29 und 32 Zyklen Proben entnommen und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Optimal ist die Anzahl von Zyklen, bei der ein deutlich sichtbares Signal vorhanden ist. Die PCR sollte sich aber noch in der exponentiellen Phase befinden. Außerdem sollte noch keine Verschiebung zur Amplifikation längerer Transkripte hin erfolgt sein. Bei welcher Zyklenzahl diese Voraussetzungen zutreffen, hat der Experimentator selbst durch einen Blick auf das Agarosegel zu entscheiden, und diese Entscheidung ist subjektiv. Hinzu kommt, dass sich nicht feststellen lässt, ob die Amplifikation einzelner Gene die exponentielle Phase bereits verlassen hat und damit die Zusammensetzung der cDNA nicht mehr repräsentativ für die ursprüngliche RNA ist.

Das Problem, dass mittels SMART und LD-PCR hergestellte cDNA nicht in jedem Fall die ursprüngliche Zusammensetzung der RNA repräsentiert, und sich für einzelne Gene falsche Messwerte ergeben, wurde von der Firma Clontech bestätigt. Im Rahmen eines Vortrags an der Universität Düsseldorf wurde dazu erklärt, dass man für bis zu 6 % der auf einem Array vorhandenen Gene unterschiedliche Ergebnisse erhalten kann, je nachdem, ob die radioaktive Sonde direkt aus RNA hergestellt wurde oder SMART und LD-PCR vorgeschaltet wurden. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden 28 Gene gefunden, die nach Amplifikation der cDNA durch SMART und LD-PCR ein deutlich schwächeres Signal ergeben als bei direktem Einsatz der RNA in die Sondensynthese und 58 Gene, deren Signal auf dem Human Cancer Array verstärkt ist. Das entspricht 7 % der Gene eines Human Cancer Arrays.

Wie in Abschnitt 10 des Ergebnisteils der Prostatumoren beschrieben, wurde als Alternative zu RNA-Amplifikation mittels SMART und LD-PCR die Synthese von antisense-RNA (aRNA) getestet. Antisense-RNA ist komplementär zur mRNA. Für ihre Gewinnung wird aus mRNA zunächst doppelsträngige cDNA hergestellt. Der zur mRNA homologe Strang der cDNA wird anschließend transkribiert. Dabei handelt es sich um eine lineare Amplifikation. Die auf den Arrays erhaltenen Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen nach SMART und LD-PCR überein. Zusätzlich sind einige Signale sichtbar, die nach SMART und LD-PCR nicht auftreten. Möglicherweise wurden die entsprechenden mRNAs bzw. cDNAs im Verhältnis zu den übrigen Genen bei der LD-PCR nicht ausreichend amplifiziert. Die Herstellung von aRNA könnte SMART und LD-PCR also durchaus ersetzen.

Zusätzlich müsste die Herstellung der radioaktiven Sonden aus aRNA optimiert werden. Die von Clontech gelieferten, zu den Arrays gehörigen Primer können für die Sondensynthese aus aRNA nicht eingesetzt werden. Darum wurden in dieser Arbeit Random-Primer verwendet, die allerdings nur zu relativ schwach radioaktiven Sonden führten. Besser wäre es, nach dem

Vorbild der Clontech-Primer für jedem Array spezifische Primer zu entwickeln, die zur verwendeten aRNA komplementär sind.

5) Array-Analysen

Die Ergebnisse der Arrayanalysen bei Prostatatumoren haben keine Gene ergeben, die in allen fünf Prostatatumoren differentiell exprimiert waren. Allerdings waren einzelne Gene vorhanden, die nur in zwei oder drei Tumoren Unterschiede zeigten, in den übrigen jedoch nicht. Diese Gene könnten im Rahmen weiterer Arbeiten näher untersucht werden, da man in lebenden Systemen in der Regel für unterschiedliche Individuen bzw. Tumoren keine zu 100 % übereinstimmenden Ergebnisse bekommt. Auch die Gene, die mit Hilfe der transfizierten LNCaP-Zellen identifiziert worden waren, zeigten bei den Tumoren keine Unterschiede. Sie hatten in der Regel in PTEN-positiven und -negativen Tumorregionen Werte um 1.

Dass keine Gene gefunden wurden, die eindeutig einer Regulation durch PTEN unterlagen, kann nicht nur an den oben beschriebenen Problemen mit der RNA-Qualität, SMART und LD-PCR liegen. Schließlich zeigten Versuche, in denen die Expressionsmuster von normalem Prostatagewebe und Tumorgewebe verglichen wurden, einige differentiell exprimierte Gene auf. Dazu wurde zusätzlich zu den nach Immunhistochemie und Mikrodissektion PTEN-positiver und -negativer Tumordrüsen erhaltenen Ergebnissen RNA aus Gefrierschnitten von normalem Prostatagewebe isoliert und wie oben beschrieben Untersuchungen auf Human Cancer Arrays durchgeführt. Die mit Hilfe der Arrays ermittelten Unterschiede betreffen die Gene *insulin-like growth factor I (IGF1)*, *prostaglandin E2 receptor EP1 subtype*, *mitogen-activated protein kinase p38*, *putative RHO/RAC guanine nucleotide exchange factor*, *SL cytokine*, *myc proto-oncogene*, *insulin-like growth factor-binding protein 2* und *frizzled homolog 2*. Während die beiden letztgenannten Gene in normalem Prostatagewebe höher exprimiert werden als in Tumoren, ist die Expression der übrigen Gene in Prostatatumoren höher als in normalem Gewebe. Die Gene wurden teilweise bereits in anderen Veröffentlichungen beschrieben (Chetcuti et al., 2001; Dhanasekaran et al., 2001). Dass das myc Protoonkogen in Prostatatumoren stärker exprimiert ist als in normalem Epithel, während das Insulin-like growth factor binding protein 2 und das frizzled Homolog 2 in normalem Gewebe eine höhere Expression zeigt als im Prostatakarzinom, wurde beispielsweise von Dhanasekaran et al. publiziert. Dies bestätigt, dass die hier verwendeten Ansätze im Prinzip erfolgreich waren, dass aber Zellen mit und ohne PTEN offensichtlich nur geringe Unterschiede zeigen. Da die Zellen aus normalem Prostatagewebe nicht mikrodissektiert

wurden, sondern der gesamte Gefrierschnitt gekratzt wurde, kann man davon ausgehen, dass sich auch Stromazellen in der normalen Probe befanden. Darum wurden auch Gene wie *tenascin* (Ishihara et al., 1995) und *SL cytokine/FLT3 ligand* (Lisovsky et al., 1996) detektiert, die in Stromazellen exprimiert werden.

Ein möglicher Grund für das Fehlen differentiell exprimierter Gene könnte das Vorliegen einer Haploinsuffizienz in den betroffenen Tumoren sein. Haploinsuffizienz bedeutet, dass bereits der Verlust eines der beiden Allele einen Phänotyp hervorruft. Im Falle von *PTEN* wird eines der beiden *PTEN*-Allele durch Veränderungen auf DNA-Ebene oder durch Proteinmodifikationen inaktiviert. Das zweite Allel ist zwar noch vorhanden und wird exprimiert, der Tumor weist jedoch bereits einen ähnlichen Phänotyp auf wie ein Tumor, der beide *PTEN*-Allele verloren hat (Kwabi-Addo et al., 2001). Trotzdem zeigt der Tumor bei der Immunhistochemie eine positive Färbung für PTEN. Ob der vollständige Verlust eines *PTEN*-Allels vorlag, wurde stichprobenartig durch eine LOH (loss of heterozygosity)-Analyse kontrolliert (siehe Ergebnisse Prostatatumoren, Abschnitt 7). Hier wurden jedoch keine Hinweise auf LOH gefunden. Haploinsuffizienz könnte jedoch auch durch Mutationen, Deletionen oder Proteinmodifikationen hervorgerufen werden, die sich durch eine LOH-Analyse nicht sichtbar machen lassen. Dafür wären komplexere Untersuchungen notwendig.

Ein auffälliges und interessantes Ergebnis der Array-Analysen war, dass jeder Tumor ein individuelles Expressionsmuster aufzuweisen schien, das nicht von PTEN beeinflusst war. Dieses Muster könnte charakteristisch für die Aggressivität und das Stadium eines Tumors sein. Besonders fiel hier der Tumor P27 auf. Hier wurden insgesamt 17 Gene gefunden, die in diesem Tumor höher exprimiert wurden als in den übrigen Tumoren. Besonders auffällig waren *40S ribosomal protein S19*, *small inducible cytokine subfamily A member 5*, *thymosin beta 10*, *60S ribosomal protein L23A* und *60S ribosomal protein L31*. 7 Gene waren dagegen in ihrer Expression herunterreguliert, z. B. *A MEMBER OF THE SHORT-CHAIN ALCOHOL DEHYDROGENASE FAMILY* und *DGS-A*. Der betroffene Patient war erst 56 Jahre alt und ist möglicherweise an den Folgen des Tumors verstorben, denn das Tumormaterial wurde bei einer Autopsie entnommen. Da das mittlere Erkrankungsalter für Prostatatumoren bei 72 Jahren liegt (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002), ist eine Erkrankung zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr als sehr früh und möglicherweise genetisch bedingt einzustufen. Zwar befand sich der Tumor erst im Stadium T2, war also noch auf die Prostata begrenzt, er kann aber trotzdem schon Metastasen gestreut haben. Leider lagen keine genauen klinischen Informationen zur Todesursache des Patienten vor. Auch die Tumoren P16 und P129 zeigten teilweise ein Expressionsmuster, dass mit dem

von P27 übereinstimmte. Hier fielen unter anderem die Gene *endothelin 2* und *tenascin (TN)* auf. Bei beiden Tumoren muss es sich um recht aggressive Tumore gehandelt haben. Der Patient P129 war erst 52 Jahre alt, als sein Tumor mit Hilfe einer radikalen Prostatektomie entfernt wurde. Auch hier befand sich der Tumor noch im Stadium T2. Patient P16 war zwar schon 78 Jahre alt, als der Tumor durch eine transurethrale Resektion entfernt wurde; hier war der Tumor mit einem Stadium von T3-4 jedoch schon weit fortgeschritten und hatte sich über die Prostata hinaus ausgebreitet.

Ein weiterer Faktor, der unterschiedliche Expressionsmuster hervorrufen könnte, ist die Art der Behandlung. Hormonentzug, Bestrahlung oder die Gabe von Medikamenten könnten sich auf die Expression bestimmter Gene im Tumorgewebe auswirken. Der Human Cancer Array zeigte beispielsweise in allen Tumoren die Expression eines Proteins, dass Schäden der DNA, die durch UV-Strahlung hervorgerufen wurden, repariert (RAD23). In P306 lag die Expression allerdings um die Hälfte niedriger als in den übrigen Tumoren. Diesen Ansatz weiter zu verfolgen, wäre sehr interessant. Dazu müssten jedoch genaue Informationen zur vorangegangenen Behandlung der Patienten vorliegen.

6) Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass vor der Durchführung weiterer Experimente die Qualität der aus Prostatatumoren gewonnenen RNA genau geprüft werden muss. Diejenigen Schritte, die die Qualität der RNA negativ beeinflussen, sind identifiziert worden und sollten optimiert werden. Beispielsweise könnte man auf die Immunhistochemie der Gefrierschnitte vollständig verzichten und die zu mikrodisektierenden Regionen nach einer Hämatoxylin-Färbung durch den Vergleich mit einem gefärbten Referenzschnitt bestimmen. Da sich Lage und Größe von Tumordrüsen jedoch bei den auf einen Referenzschnitt folgenden Schnitten verändern können, müsste eine größere Anzahl von Referenzschnitten z. B. jeweils nach Herstellung von 10 Gefrierschnitten präpariert und vom Pathologen bewertet werden.

Außerdem sollte nach einer Alternative für SMART und LD-PCR gesucht werden. Wie im Ergebnisteil beschrieben, könnte sich dazu die Synthese von aRNA anbieten, mit deren Hilfe in dieser Arbeit gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Hier müsste allerdings noch die Herstellung der radioaktiven Sonden methodisch angepasst werden.

Eine spannende Fragestellung wäre, ob die Art der Behandlung der Prostatatumoren einen Einfluss auf die Genexpression hat, wie es die Array-Analysen nahe legen. Außerdem wäre es interessant herauszufinden, inwieweit die Gene, die zwischen den verschiedenen Patienten unterschiedlich exprimiert sind, mit dem Stadium bzw. der Aggressivität des Prostatatumors

zusammenhängen und somit den Krankheitsverlauf vorhersagen können. Ob das für die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Gene zutreffen könnte, müsste durch die Untersuchung einer Vielzahl von Präparaten verifiziert werden.

VII. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zielgene des Tumorsuppressorgens *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN) „*in vivo*“, d.h. beim Prostatakarzinom, und „*in vitro*“, nämlich in der Prostatakrebszelllinie LNCaP, zu identifizieren. Dazu sollten mit Hilfe von cDNA-Arrays Expressionsprofile von PTEN-positiven und PTEN-negativen Tumorregionen sowie von LNCaP-Zellen, die mit dem Wildtyp-*PTEN*-Gen oder mit einem leeren Vektor transfiziert worden waren, erstellt und miteinander verglichen werden.

Das Tumorsuppressorgen *PTEN* wurde zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen identifiziert (Li et al., 1997; Steck et al., 1997). Es liegt auf Chromosom 10q23.3 und ist bei Prostata Tumoren besonders in späten Stadien deletiert. Bei dem Protein handelt es sich um eine Lipidphosphatase, die in verschiedenen Signaltransduktionswegen eine Rolle spielt, hauptsächlich im AKT-Kinase-Weg (Di Cristofano et al., 2000). Die Proliferation der betroffenen Zellen und die Metastasierung des Tumors wird durch PTEN unterbunden. Eine Überexpression von PTEN führt in den meisten Krebszellen zur Apoptose.

Mit Hilfe des induzierbaren Vektors pIND (SP1) gelang es, LNCaP-Zellen stabil mit dem *PTEN*-Wildtyp-Gen zu transfizieren. Mittels RT-PCR, quantitativer Realtime RT-PCR und Western Blot konnte sichergestellt werden, dass nach der Induktion in den LNCaP-Zellen exogenes PTEN exprimiert wurde. Die *PTEN*-mRNA-Menge unterschied sich in LNCaP-Zellen mit und ohne Wildtyp-*PTEN* um einen Faktor von 2. Diese Menge an exogenem PTEN reichte aus, um das Wachstum der betroffenen Zellen vollständig zu blockieren. Apoptose konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Ein Vergleich der Expressionsprofile ergab eine Liste von 18 Genen, die möglicherweise einer Regulation durch PTEN unterliegen könnten. Davon wurden sechs Gene genauer untersucht. Eine RT-PCR bestätigte die differentielle Expression von drei Genen. Dabei handelt es sich um das humane Homolog des Sina-Gens, *SIAH2*, dem aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu Sina eine Funktion im Rahmen des Ras/Raf-Signaltransduktionsweges zugeschrieben wird, um den *sortilin-related Rezeptor LR11*, der besonders stark in proliferierenden Zellen exprimiert wird und Migration und Invasion von Muskelzellen fördert, sowie um die *Tousled-like Kinase*, eine Serin/Threonin-Kinase, die in die Regulation des Zellzyklus involviert ist. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, müsste die RT-PCR noch mehrmals wiederholt werden. Außerdem wäre es interessant, auch die übrigen 12 Gene genauer zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Prostatatumoren wurden Gefrierschnitte immunhistochemisch mit Hilfe eines Anti-PTEN-Antikörpers gefärbt, PTEN-positive und -negative Tumordrüsen mikrodisektiert und die Gesamt-RNA isoliert. Nach einer Reversen Transkription nach der SMART-Methode und einer Amplifikation der cDNA mittels LD-PCR wurden ³³P-markierte Sonden hergestellt und damit Human Cancer 1.2 Arrays und Human 3.6 Arrays (Clontech) hybridisiert. Es wurden keine Gene gefunden, deren Expression in allen fünf Tumoren durch PTEN reguliert wird. Dafür zeigten die Tumoren verschiedener Patienten deutliche Unterschiede. Möglicherweise hat die Behandlung des Prostatakarzinoms (z. B. ein Androgenentzug oder eine Strahlentherapie) einen Einfluss auf die Genexpression. Außerdem waren Patienten verschiedener Altersstufen vorhanden, so dass sich in den Expressionsunterschieden möglicherweise die Aggressivität eines Tumors widerspiegelt.

VIII. Anhang

1) Literatur

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ

Nucleic Acids Res. Vol. 25, 3389-3402, 1997

”Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.”

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC

Nature Medicine Vol. 3 (8), 917 – 921, 1997

“A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma.”

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland

In Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut

„Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends“

3. erweiterte, aktualisierte Auflage

Saarbrücken, 2002

Barnes WM

Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 91, 2216 – 2220, 1994

”PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates.”

Blume-Jensen P, Hunter T

Nature Vol. 411, 355 – 365, 2001

“Oncogenic kinase signalling.”

Bonner RF, Emmert-Buck MR, Cole K, Pohida T, Chuaqui RF, Goldstein SR,

Liotta LA

Science Vol. 278, 1481 – 1483, 1997

”Laser Capture Microdissection: Molecular Analysis of Tissue.”

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME

Cell Vol. 96, 857 – 868, 1999

“Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting Forkhead Transcription Factor.”

Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J, Isaacs WB, Bova GS, Sidransky D

Cancer Research Vol. 57, 4997 – 5000, 1997

“Frequent Inactivation of PTEN/MMAC1 in Primary Prostate Cancer.”

Chenchik A, Zhu YY, Diatchenko L, Li R, Hill J, Siebert PD

Gene Cloning and Analysis by RT-PCR (BioTechniques Book, MA), 305 – 319, 1998

”Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR.”

Chetcuti A, Margan S, Mann S, Russell P, Handelsman D, Rogers J, Dong Q

The Prostate Vol. 47, 132 – 140, 2001

”Identification of Differentially Expressed Genes in Organ-Confined Prostate Cancer by Gene Expression Array.”

Dahia PL, Fitzgerald MG, Zhang X, Marsh DJ, Zheng Z, Pietsch T, Deimling A, Haluska FG, Haber DA, Eng C

Oncogene Vol.16 (18), 2403 – 2406, 1998

“A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21.”

Darnell, Lodish, Baltimore

”Molecular Cell Biology”

Second edition, 1990

W.H. Freeman and Company, New York

Davies, MA, Koul D, Dhesi H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D, Yung WKA, Steck P

Cancer Research Vol. 59, 2551 – 2556, 1999

”Regulation of Akt/PKB Activity, Cellular Growth, and Apoptosis in Prostate Carcinoma Cells by MMAC/PTEN.”

Della NG, Bowtell DD, Beck F

Cell Tissue Research Vol. 279 (2), 411 – 419, 1995

“Expression of Siah-2, a vertebrate homologue of Drosophila sina, in germ cells of the mouse ovary and testis.”

De Bruin A, Muller E, Wurm S, Caldelari R, Wyder M, Wheelock MJ, Suter MM

Cell Adhesion Communication Vol. 7 (1), 13 – 28, 1999

”Loss of invasiveness in squamous cell carcinoma cells overexpression desmosomal cadherins.”

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Gosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM

Nature Vol. 412, 822 – 826, 2001

”Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer.”

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam Y, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD

Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 93, 6025 – 6030, 1996

”Suppression subtractive hybridisation: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries.”

Di Cristofano A, Pandolfi PP

Cell Vol. 100, 387 – 390, 2000

“The multiple roles of PTEN in tumor suppression.”

Di Ianni M, Terenzi A, Di Florio S, Venditti G, Benedetti R, Santucci A, Bartoli A,

Fettucciari K, Marconi P, Rossi R, Martelli MF, Tabilio A

Stem Cells Vol. 18, 415 – 421, 2000

“In Vivo Demethylation of a MoMuLV Retroviral Vector Expressing the Herpes Simplex Thymidine Kinase Suicide Gene by 5’ Azacytidine.”

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA

Science Vol. 274, 9978 – 1001, 1996

”Laser Capture Microdissektion.”

Ford S, Gray IC, Spurr NK

Cancer Genetica and Cytogenetics Vol. 102, 6 – 11, 1998

“Rearrangement of the Lon Arm of Chromosome 10 in the Prostate Adenocarcinoma Cell Line LNCaP.”

Frisch SM, Francis H

Journal of Cell Biology Vol. 4, 619 – 626, 1994

Fujii GH, Morimoto AM, Berson AE, Bolen JB

Oncogene Vol. 18 (4), 1765 – 1769, 1999

“Transcriptional analysis of the PTEN/MMAC1 pseudogene, psiPTEN.”

Garnick und Fair

Spektrum der Wissenschaft Vol. 5, 1999

„Bessere Chancen im Kampf gegen Prostatakrebs.“

<http://www.prostatakrebs-bps.de/spektrum.html>

Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z

Molecular Membrane Biology Vol. 19, 81 – 94, 2002

“Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation.” Review

Gibas Z, Becher R, Kawinski E, Horoszewicz JS, Sandberg AA

Cancer Genetics and Cytogenetics Vol. 11, 399 – 404, 1984

“A High-Resolution Study of Chromosome Changes in a Human Prostatic Carcinoma Cell Line (LNCaP).”

Ginder GD, Whilters M, Kelley K, Chase RA

Progress in Clinical and Biological Research Vol. 134, 501 – 510, 1983

“In vivo demethylation of chicken embryonic beta-type globin with 5-azacytidine.”

Gleason DF

Cancer Chemother Rep. Vol. 50 (3), 125 – 128, 1966

“Classification of prostatic carcinomas.”

Gu J, Tamura M, Yamada KM

Journal of Cell Biology Vol. 143, 1375 – 1383, 1998

“Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways.”

Hamilton JA, Stewart LM, Ajayi L, Gray IC, Gray NE, Roberts KG, Watson GJ, Kaisary AV, Snary D

British Journal of Cancer Vol. 82 (10), 1671 – 1676, 2000

“The expression profile for the tumor suppressor gene PTEN and associated polymorphic markers.”

Hautmann, Huland

„Urologie“

2. Auflage 2001

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

Hirayama S, Bujo H, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Kobayashi J, Schneider WJ, Saito Y

Biochemical and Biophysical Research Communication, Vol. 275 (2), 365 – 373, 2000
“Differential expression of LR11 during proliferation and differentiation of cultured neuroblastoma cells.”

Hohbach C, Dohm G

Scand J Urol Nephrol Suppl Vol. 55, 37-47, 1980,
„Pathology of prostatic cancer.”

Hong TM, Yang PC, Peck K, Chen JJW, Yang SC, Chen YC, Wu CW

American Journal of Respiration and Cell Molecular Biology Vol. 23, 355 – 363, 2000
“Profiling the Downstream Genes of Tumor Suppressor PTEN in Lung Cancer Cells by Complementary DNA Microarray.”

Horoszewicz in G.P. Murphy (Herausgeber),

“Models for Prostate Cancer”, 115 – 132, Alan R. Liss, Inc., 1980

“The LNCaP cell line – a new model for studies on human prostatic carcinoma.”

Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP

Cancer Research Vol. 43, 1809 – 1818, 1983

“LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma.”

Isaacs WB, Bova GS, Morton RA, Bussemakers MJ, Brooks JD, Ewing CM

Seminars in Oncology Vol. 21 (5), 514 – 521, 1994

“Molekular biology of prostate cancer.”

Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, Nevins JR

Molecular Cell Biology Vol. 21, 4684 – 4699, 2001

“Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis.”

Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T

Clinical Cancer Research Vol. 1(9), 1035 – 1041, 1995

“Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance.”

Ittmann M

Cancer Research Vol. 56, 2143 .- 2147, 1996

“Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma.”

Jacobsen L, Madsen P, Moestrup SK, Lund AH, Tommerup N, Nykjaer A,

Sottrup-Jensen L, Gliemann J, Petersen CM

The Journal of Biological Chemistry Vol. 271 (49), 31379 – 31383, 1996

“Molecular Characterization of a Novel Human Hybrid-type Receptor That Binds the α_2 -Macroglobulin Receptor-associated Protein.”

Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J, Petersen CM

The Journal of Biological Chemistry Vol. 276 (25), 22788 – 22796, 2001

“Activation and Functional Characterization of the Mosaic Receptor SorLA/LR11.”

Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG

Cancer Research Vol. 57 (3), 524 – 531, 1997

“Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization.”

Kwabi-Addo B, Giri D, Schmidt K, Podsypanina K, Parsons R, Greenberg N, Ittmann M,

Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 98 (20), 11563 – 11568, 2001

“Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression.”

Lara PN, Kung HJ, Gumerlock PH, Meyers FJ

Critical Reviews in Oncology/Hematology Vol. 32, 197 – 208, 1999

„Molecular biology of prostate carcinogenesis.“

Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM

Cancer Research Vol. 60, 3175 – 3182, 2000

”Expression of Estrogen Receptor (ER)- α and ER- β in Normal and Malignant Prostatic Epithelial Cells: Regulation by Methylation and Involvement in Growth Regulation.”

Leube B, Drechsler M, Mühlmann K, Schäfer R, Schulz WA, Santourlidis S, Anastasiadis A,

Ackermann R, Visakorpi T, Müller W, Royer-Pokora B,

The Prostate Vol. 50, 135 - 144, 2002

“Refined Mapping of Allele Loss at Chromosome 10q23-26 in Prostate Cancer.”

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L,

McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R

Science Vol. 275, 1943 – 1947, 1997

„PTEN, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer.“

Li DM, Sun H

Cancer Research Vol. 57 (11), 2124 – 2129, 1997

“TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta.”

Li Y, DeFatta R, Anthony C, Sunavala G, De Benedetti A

Oncogene Vol. 20 (6), 726 – 738, 2001

“A translationally regulated Tousled kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed.”

Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG, Lyman SD, Broxmeyer HE

Leukemia Vol. 10 (6), 1012 -1018, 1996

“Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells.”

Matsuzawa S, Takayama S, Froesch BA, Zapata JM, Reed JC

The EMBO Journal Vol. 17 (10), 2736 – 2747, 1998

“p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1.”

Mendelsohn, Howley, Israel, Liotta
„The molecular Basis of Cancer”
Second edition 2001
Saunders-Verlag

Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, Parsons R, Tonks NK
Proceedings of the National Academy of Sciences USA Vol. 94, 9052 – 9057, 1997
“P-TEN, the tumor suppressor from human Chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase.”

Netter F
Farbatlantzen der Medizin, Band 3
“Genitalorgane“
2. Auflage 1987
Georg Thieme Verlag Stuttgart

McNeal JE
American Journal of Surgical Pathology Vol. 12 (8), 619 – 633, 1988;
“Normal histology of the prostate.”

No D, Yao TP, Evans RM
Proceedings of the National Academy of Sciences USA Vol. 93, 3346 – 3351, 1996
”Ecdysone-Inducible Gene Expression in Mammalian Cells and Transgenic Mice.”

Peitsch MC, Muller C, Tschopp J.
Nucleic Acids Research Vol. (18), 4206 -4209, 1993
”DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts.”

Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM, Cordon-Cardo C, Catoretti G, Fisher PE, Parsons R
Proceedings of the National Academy of Sciences USA Vol. 96, 1563 – 1568, 1999
“Mutation of *PTEN/Mmac1* in mice causes neoplasia in multiple organ systems.”

Roylance R, Spurr N, Sheer D
Seminars in Cancer Biology Vol. 8 (1), 37 – 44, 1997
“The genetic analysis of prostate carcinoma.”

Ruoslahti E, Reed JC
Cell Vol. 77, 477 – 478, 1994
“Anchorage dependence, integrins and apoptosis.”

Sambrook, Fritsch, Maniatis
“Molecular Cloning”
Second Edition, 1989
Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sauter G, Bubendorf L, Moch H, Gasser ThC, Mihatsch MJ
Der Pathologe Vol.1, 63 - 68, 1998
“Zytogenetische Veränderungen des Prostatakarzinoms.“

Sharrard RM, Maitland NJ

British Journal of Cancer Vol. 83 (8), 1102 – 1109, 2000

“Phenotypic effects of overexpression of the MMAC1 gene in prostate epithelial cells.”

Silljé HH, Takahashi K, Tanaka K, Van Houwe G, Nigg EA

The EMBO Journal Vol. 18 (20), 5691 – 5702, 1999

“Mammalian homologues of the plant Tousled gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication.”

Silljé HH, Nigg EA

Current Biology Vol. 11 (13), 1068 – 1073, 2001

“Identification of human Asf1 chromatin assembly factors as substrates of Tousled-like kinases.”

Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA

Trends in Genetics Vol. 14 (7), 272 – 276, 1998

“Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis.”

Singal R, van Wert J, Bashambu M

Cancer Research Vol. 61, 4820 – 4826, 2001

“Cytosine Methylation Represses Glutathione S-Transferase P1 (GSTP1) Gene Expression in Human Prostate Cancer Cells.”

Sökeland, Schulze, Rübben

„Urologie“

12. Auflage 2002

Georg Thieme Verlag Stuttgart

Sorm F, Piskala A, Cihak A, Vesely J

Experientia Vol. 20 (4), 202 – 203, 1964

“5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic.”

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WKA, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DHF, Tavtigian SV
Nature Genetics Vol. 15, 356 – 362, 1997

“Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC 1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers.”

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM

Science Vol. 280, 1614 – 1617, 1998

“Inhibition of Cell Migration, Spreading, and Focal Adhesions by Tumor Suppressor PTEN.”

Tsou HC, Teng DH, Ping XL, Brancolini V, Davis T, Hu R, Xie XX, Gruener AC, Schrager CA, Christiano AM, Eng C, Steck P, Ott J, Tavtigian SV, Peacocke M
American Journal of Human Genetics Vol. 61 (5), 1036 – 1043, 1997

“The role of MMAC1 mutations in early-onset breast cancer: causative in association with Cowden syndrome and excluded in BRCA1-negative cases.”

Vlietstra RJ, van Alewijk DC, Hermans KG, van Steenbrugge GJ, Trapman J

Cancer Research Vol. 58, 2720 – 2723, 1998

“Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts.”

Walker PR, Kokileva L, LeBlanc J, Sikorska M.

Biotechniques Vol.15 (6), 1032-40, 1993

”Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis.”

Wheeler TC, Chin LS, Li Y, Roudabush FL, Li L

The Journal of Biological Chemistry Vol. 277 (12), 10273 – 10282, 2002

”Regulation of Synaptophysin Degradation by Mammalian Homologues of *Seven in Absentia*.”

Wu X, Levine AJ

Proceedings of the National Academy of Sciences Vol. 91, 3602 – 3606, 1994

“p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis.”

Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, Nuckolls F, Giangrande P,

Wright FA, Field SJ, Greenberg ME, Orkin S, Nevins JR, Robinson ML, Leone G

Nature Vol. 414 (6862), 457 – 462, 2001

“The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation.”

Wyllie AH,

Journal of Pathology Vol. 198, 139 – 141, 2002

“E2F1 selects tumor cells for both life and death.”

Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstralh E, Young CY

The Prostate Vol. 48 (1), 7 – 15, 2001

“Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin.”

Yamamoto T, Tanigawa N

Medical Electron Microscopy Vol. 32, 207 – 212, 2001

“The role of surviving as a new target of diagnosis and treatment in human cancer.”

Zhu Y, Bujo H, Yamazaki H, Hirayama S, Kanaki T, Takahashi K, Shibasaki M, Schneider WJ, Saito Y

Circulation Vol. 105, 1830 – 1836, 2002

”Enhanced Expression of the LDL Receptor Family Member LR11 Increases Migration of Smooth Muscle Cells In Vitro.”

2) Abkürzungen

Abb.	-	Abbildung
ATP	-	Adenosintriphosphat
bp	-	Basenpaar
BSA	-	bovine serum albumin
cDNA	-	copy DNA
DAB	-	Diaminobenzidine
dCTP	-	Dexoxycytidintriphosphat
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DNase	-	Desoxyribonuklease
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DAPI	-	4, 6-Diamino-2-phenylindol
DTT	-	Dithiothreitol
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
FISH	-	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
GAPDH	-	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	-	Green Fluorescence Protein
GITC	-	Guanidiniumisothiocyanat
mRNA	-	messenger RNA
LD-PCR	-	long distance PCR
LNCaP	-	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LOH	-	loss of heterozygosity
LR11	-	sortilin-related receptor LR11
kb	-	Kilobasen
kDa	-	Kilodalton
M	-	molar
Min.	-	Minute
NaAc	-	Natriumacetat
nm	-	Nanometer
OD	-	Optische Dichte
PBD	-	phosphate buffered detergent
PBS	-	phosphate buffered saline
PCR	-	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEG	-	Polyethylenglycol

PTEN	-	Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome TEN
RNA	-	Ribonukleinsäure
RNase	-	Ribonuklease
rpm	-	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	-	ribosomale RNA
RT-RCR	-	reverse transcription PCR
Sek.	-	Sekunde
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
SIAH2	-	human seven in absentia homolog 2
SMART	-	Switch Mechanism At 5'-end of RNA Template
SSCP	-	single strand conformation polymorphism
TGF	-	transforming growth factor
TLK1	-	tousled-like kinase 1
Tris	-	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	-	Ultraviolett