

Funktionelle Charakterisierung von PITX2 im Prostatakarzinom

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Jennifer Schmidt
aus Wermelskirchen

Urologisches Forschungslabor
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Düsseldorf, Mai 2014

aus dem Forschungslabor der Urologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz, Urologisches Forschungslabor, Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf

Korreferent: Prof. Dr. Vlada B. Urlacher, Institut für Biochemie, Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

1	Einleitung	1
1.1	Prostatakarzinom	1
1.2	Androgen-Rezeptor	4
1.2.1	Aufbau und Funktion	4
1.2.2	Regulation des Androgen-Rezeptors	6
1.3	WNT-Signalweg	9
1.3.1	Nicht-kanonischer WNT-Signalweg	9
1.3.2	Kanonische WNT-Signalwege	10
1.4	PITX Gene	11
1.4.1	PITX2 Gene - Aufbau und Funktion	12
1.4.2	PITX2 in Tumoren	15
1.5	Ziel der Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Prostata-Gewebeproben	18
2.1.2	Prostatakarzinom-Zelllinien	20
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Kits	20
2.1.4	Puffer und Lösungen	23
2.1.5	Antikörper	25
2.1.6	Oligonukleotid-Primer	26
2.1.7	Bakterienstämme	28
2.1.8	Plasmide	28
2.1.9	Geräte	29
2.1.10	Software und Datenbanken	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellkultur von Prostatakarzinom-Zelllinien	31
2.2.2	RNA-Analyse	31
2.2.3	Bisulfitumwandlung	32
2.2.4	Pyrosequenzierung	32
2.2.5	Standard Endpunkt-PCR	33

2.2.6	Protein-Analyse	33
2.2.7	Plasmid-Transformation	34
2.2.8	Plasmid-DNA Isolation	34
2.2.9	Restriktionsverdau	35
2.2.10	Agarose-Gelelektrophorese / Aufreinigung von DNA-Fragmenten	35
2.2.11	Ligation	35
2.2.12	Klonierung T-REx™ System	36
2.2.13	Funktionelle Versuche	36
3	Ergebnisse	44
3.1	Expression von PITX2 in Zelllinien und Gewebe	44
3.2	Methylierung von PITX2	46
3.3	Expression von PITX1 in Zelllinien und Geweben	49
3.4	Reexpression von PITX2	50
3.4.1	Klonogenitätsassay	50
3.4.2	Stabile PITX2a Zellklone	52
3.4.3	Funktionelle Analysen mit den stabilen PITX2a Zellklonen	54
3.5	Microarray-Analyse der Genexpression in PITX2 exprimierenden Zellklonen	67
3.5.1	Auswertung der Microarray-Ergebnisse	67
3.5.2	Verifizierung der differentiellen Genregulation mittels qRT-PCR	80
3.5.3	Western Blot-Analyse der PITX2 Zielgene	86
3.6	Einfluss von PITX2 auf den Androgen-Rezeptor	87
3.6.1	Luciferase Reporter-Assay	87
3.6.2	Ko-Transfektion von PITX2 und AR	91
3.6.3	Two-Hybrid Luciferase-Assay	94
3.6.4	Lokalisation des AR in Prostatakarzinom-Zelllinien	95
3.7	Einfluss von PITX2 auf den WNT-Signalweg	97
3.8	Experimente zur Stabilisierung der PITX2c Isoform	99
4	Diskussion	102
4.1	PITX2 Isoformen	102
4.2	Funktionelle Auswirkungen der PITX2-Reexpression	107
4.3	Analyse und Auswertung des Microarray Experiments	110
4.4	Auswirkungen auf den WNT-Signalweg	120
4.5	Auswirkungen auf den AR-Signalweg	124
4.6	Fazit	127
5	Literaturverzeichnis	129

6	Abbildungsverzeichnis	146
7	Tabellenverzeichnis	148
8	Abkürzungsverzeichnis	150
9	Anhang	152
9.1	PITX2 Transkript-Varianten	152
9.2	Sequenzen der PITX2 mRNAs und Proteine	153
9.3	Erstellte Plasmid-Vektoren	154
9.4	Übersicht der Signifikanzwerte	156
9.5	Auswertung der Microarray-Daten mittels der DAVID Analyse	165
10	Erklärung	185
11	Danksagung	186

Zusammenfassung

Hypermethylierung und verminderte Expression von *PITX2* im Prostatakarzinom (PCa) sind prognostisch negative Marker nach radikaler Prostatatektomie. Die funktionellen Auswirkungen der *PITX2* Herunterregulation im PCa sind jedoch nicht bekannt. Die zentrale Arbeitshypothese der Arbeit war, dass der Verlust des Transkriptionsfaktors *PITX2* die Verschiebung von β -Catenin vom WNT-Signalweg zum Androgen-Rezeptor (AR) begünstigt und dessen Zielgene verstärkt exprimiert werden. Tatsächlich wiesen Reporter-Assays mit androgenabhängigen Konstrukten in PCa-Zelllinien einen inaktivierenden Effekt von *PITX2* auf die AR-Aktivität nach, der in einer Zelllinie mit einer Abnahme des AR-Proteins einherging. Die Ergebnisse eines Two-Hybrid-Assays lassen eine indirekte Interaktion zwischen dem AR und *PITX2* vermuten. Der erwartete aktivierende Effekt auf den WNT-Signalweg an TCF-Reporterkonstrukten blieb hingegen aus. Zellklone von PCa-Zelllinien mit stabiler oder induzierbarer *PITX2*-Expression proliferierten langsamer mit einem Anstieg der G1-Zellzyklusphase und Anzeichen von Seneszenz. Microarray-Analysen der Genexpression wurden mit je zwei unterschiedlichen induzierbaren *PITX2* Zellklonen von zwei Zelllinien durchgeführt. Nach *PITX2*-Induktion ergaben sich Hinweise auf eine Aktivierung der Zellzyklusinhibitorgene *CDKN1B*, *CDKN2B* und *CDKN1A* und des bekannten PCa-Tumorsuppressors *GADD45A*. Zudem wurde der *PITX2*-Interaktionspartner *PDLIM1* induziert. Zwischen einer androgenunabhängigen und einer androgenabhängigen Zelllinie waren weitere Komponenten des TGF β /BMP-Signalwegs, *BMP2* und *SMAD3*, unterschiedlich reguliert. Dies lässt vermuten, dass *PITX2* auch in die bekannte Interaktion zwischen *SMAD3* und dem AR eingreift. Auch einige Komponenten des WNT-Signalwegs waren verändert exprimiert. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine Regulatorfunktion von *PITX2* auf die Balance zwischen den AR-, WNT- und TGF β /BMP-Signalwegen hin. Dabei könnte insbesondere ein Netzwerk aus den Faktoren *HDAC1*, *SMAD3*, *KAT5*, *EP300/p300*, *PITX2* und *CTNNB1* die beobachtete Inaktivierung des AR durch *PITX2* über die Deacetylierung des Rezeptors erklären. Ferner sprechen große Unterschiede in den Proteinmengen zwischen den *PITX2*-Isoformen a und c und eine Verschiebung in der molekularen Größe der Isoform c für eine posttranslationale Modifikation und einen dadurch resultierenden Abbau dieser Isoform, der durch einen CK2-Inhibitor kurzzeitig vermindert werden konnte.

Summary

DNA hypermethylation and loss of expression of *PITX2* in prostate carcinoma (PCa) are negative prognostic markers for disease progression after radical prostatectomy. The functional consequences of *PITX2* downregulation in PCa are unknown. The initial working hypothesis in this thesis was that the loss of *PITX2* favors a switch from WNT signaling to androgen receptor (AR) signaling leading to increased expression of AR target genes. *PITX2* overexpression diminished the activity of AR-dependent promoter reporter assays, which was associated with a considerable decrease in AR protein in one cell line. A two-hybrid assay hinted at an indirect interaction between AR and *PITX2*. Contrary to expectations, *PITX2* did not enhance WNT signaling as tested by TCF reporter constructs. PCa cell line clones stably or inducibly overexpressing *PITX2* proliferated slower, exhibited signs of senescence and an increased G1 cell cycle phase fraction. Microarray gene expression analyses of each two inducible *PITX2*-overexpressing cell clones from two PCa cell lines revealed an induction of the cell cycle inhibitor genes *CDKN1B*, *CDKN2B* and *CDKN1A*, the well-known PCa tumor suppressor gene *GADD45A* and the *PITX2* interaction partner *PDLIM1*. The expression of the latter gene and further components of the TGF β signaling pathway, like *BMP2* and *SMAD3* genes, differed significantly between androgen-sensitive and -independent cell lines. These observations suggest an influence of *PITX2* on the known interaction between *SMAD3* and the AR. Several components of the WNT signaling pathway were also differentially expressed. In summary, the results of this study suggest a function of *PITX2* in regulating the balance between AR-, WNT-, and TGF β /BMP-signaling pathways in prostatic cells. In particular, the observed negative effect of *PITX2* on AR activity and expression may be mediated by AR deacetylation, as indicated by the changes in expression of *HDAC1*, *SMAD3*, *KAT5*, *EP300/p300*, *PITX2* and *CTNNB1* genes in the microarray results. Finally, large differences in protein expression of the *PITX2a* and *c* isoforms and a shift in the molecular weight of the *c*-isoform suggest a posttranslational modification leading to *PITX2c* degradation. Indeed, a transient stabilization which could be achieved by a CK2-inhibitor.

1 Einleitung

1.1 Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist bei 40-80 jährigen Männern in den westlichen Industriestaaten noch vor dem Bronchial- und dem kolorektalen Karzinom das häufigste Malignom. Bei der Mortalität steht es dagegen in den industrialisierten Staaten unter allen Malignomen "lediglich" an dritter Stelle [1]. Ein erheblicher Anteil der Prostatakarzinome würde undiagnostiziert klinisch latent verlaufen. Die überwiegende Mehrzahl der Prostatakarzinome sind Adenokarzinome.

Den wichtigsten Parameter zur Diagnostik und speziell zur Früherkennung des Prostatakarzinoms stellt der Serum-PSA-Spiegel (Prostata-spezifisches-Antigen) dar. PSA ist eine Serinprotease, die vom Drüsenepithel der Prostata produziert wird. Physiologisch finden sich große Mengen an PSA im Seminalplasma, aus dem sowohl bei benignen als auch bei malignen Erkrankungen höhere PSA-Mengen in das Serum übertreten können. Mit steigenden Serum-PSA-Spiegeln steigt die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms linear an.

Männer mit einem auffällig erhöhten Serum-PSA-Wert oder über die Zeit ansteigenden Werten wird üblicherweise eine Prostatabiopsie zur histologischen Sicherung empfohlen. Das entnommene Gewebe wird durch eine mikroskopisch-pathologische Untersuchung beurteilt. Mit dem Tumornachweis erfolgt die Bestimmung des Differenzierungsgrades (sog. *Grading*) des Tumors, meist mit dem *Gleason-Grading* [2]. Hierzu wird das Karzinom basierend auf der mikroskopischen Architektur der Prostatadrüsen in 5 Differenzierungsgrade eingeteilt. Tumorgewebe mit einer Einstufung von 1 - 3 besitzen noch gut definierbare Drüsenstrukturen. In Tumorgeweben mit einer Einstufung von 4 - 5 sind die Drüsen miteinander verschmolzen oder nicht mehr erkennbar und die Invasivität der Zellen ist deutlich erhöht. Da das Prostatakarzinom üblicherweise heterogen wächst, wird der *Gleason Score* jeweils durch Addieren der Einstufungen für die zwei häufigsten Gewebemuster ermittelt. Der *Gleason-Score* stellt den besten klinischen Prognoseparameter des Prostatakarzinoms dar. Das TNM (Tumor, Node, Metastasis) System nach UICC (*Union for International Cancer Control*) wird zum *Staging* eingesetzt [3]. Die Stufen T2 bis T4 beschreiben die Eindringtiefe des Tumors von nur auf das Organ beschränkt bis

hin zu invasiv in das Nachbarorgan; kleinere pT1 Tumoren werden bei transurethralen Resektionen wegen benigner Hyperplasie entdeckt. Die Stadien N und M beschreiben das Fehlen (N0 oder M0) bzw. Vorhandensein von Lymphknoten- (N1) oder Fernmetastasen (M1a-c).

Die Entwicklung eines Adenokarzinoms der Prostata erfolgt wahrscheinlich über eine prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN). Diese ist durch eine gestörte Histoarchitektur gekennzeichnet, bei jedoch erhaltener Basalzellschicht. Kennzeichen des invasiven Prostatakarzinoms ist dann der Verlust der Basalzellschicht. Prozesse, die eine Prostatakarzinom-Progression fördern, sind auch mit dem Altern assoziiert und beeinflussen Gene, die in Inflammation, oxidativem Stress und zellulärer Seneszenz involviert sind.

Bei der benignen Prostata-Hyperplasie (BPH) handelt es sich dagegen um eine gutartige Vergrößerung der Prostata, deren Prävalenz genauso wie beim Prostatakarzinom mit dem Alter deutlich ansteigt. BPH und Prostatakarzinom können parallel vorliegen. Bei einer BPH findet sich eine Hyperplasie von Stroma- und/oder Epithelzellen in der Transitionalzone der Prostata. Ab dem 60. Lebensjahr liegt bei 50% aller Männer die (histologische) Diagnose einer BPH vor.

Zu den kurativen Therapieverfahren des Prostatakarzinoms gehören die radikale Prostatovesikulektomie (chirurgische Entfernung der Prostata einschließlich der Samenblasen), ggf. gleichzeitig eine chirurgische Entfernung der regionären Lymphknoten (sog. pelvine Lymphadenektomie), sowie die Strahlentherapie. Die Strahlentherapie kann entweder perkutan durchgeführt werden oder als Brachytherapie (interne Strahlentherapie). Bei lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen oder bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen mit hohem Risikoprofil können diese Therapien durch eine Androgendeprivation ergänzt oder beim primär metastasierten Prostatakarzinom ersetzt werden. Sowohl das Wachstum der normalen Prostata als auch das Wachstum von Prostatakarzinomen ist abhängig von Androgenen. Die chirurgische oder chemische Kastration führen beide zu einer signifikanten Verringerung des Tumorumfanges und des Serum-PSA-Spiegels. Die Androgendeprivation verlängert die Zeit bis zur klinischen Progression, jedoch ist ein Überlebensvorteil nicht nachgewiesen.

Androgene binden in epithelialen Prostatazellen an den Androgen-Rezeptor (AR). Dieser transloziert im Anschluss in den Nukleus und reguliert dort die Expression von Genen, die in Prostatawachstum und -differenzierung involviert sind (Abschnitt 1.2). Er reguliert auch die Produktion und Sekretion von PSA und anderen spezifischen Produkten der Prostata.

Trotz Androgendeprivation treten nicht vollständig chirurgisch entfernte Prostatakarzinome wieder auf und wachsen trotz der niedrigen verbleibenden Androgenspiegel. Als biochemisches Rezidiv werden wieder ansteigende PSA-Serumkonzentrationen bezeichnet; geschieht dies unter antiandrogener Therapie, spricht man von einem kastrations-resistenten Prostatakarzinom (CRPC). Metastasen eines Prostatakarzinoms manifestieren sich häufig in regionären und nicht-regionären Lymphknoten und im Knochen. Die Lebenserwartung von CRPC-Patienten ist begrenzt und beträgt im Median 18-24 Monate. In CRPC erlauben vielfältige Mutationen und genetische Aberrationen des AR und seiner Ko-Faktoren eine Aktivierung des AR bei niedrigen systemischen Androgenspiegeln [4, 5]. Dadurch bleiben das weitere Wachstum und das Überleben von CRPC-Zellen möglich (Abschnitt 1.2).

Kastrations-resistentes Wachstum von Prostatakarzinomzellen kann u.a. durch eine Überaktivität von Wachstums- und Überlebenssignalwegen, wie PI3K- (Phosphoinositid-3-Kinase), JAK/STAT- (Januskinase/*signal transduces and activator of transcription*) und MAPK- (mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade) Signalwegen, induziert werden [6, 7]. Die häufig amplifizierte Gene im Prostatakarzinom beinhalten das Proto-Onkogen *MYC* und *BRAF*, wie auch den AR Ko-Aktivator *NCOA2* (*nuclear receptor coactivator 2*) und *SKP2* (*S-phase kinase-associated protein 2*), welches die Degradation von phosphoryliertem p27^{KIP1} fördert [8]. Bekannte Deletionen betreffen den PI3K-Signalweg-Inhibitor *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) und die Zellzyklusregulatoren *TP53*, *RB1* (*retinoblastoma 1*) und *CDKN1B* (p27^{KIP1}) [8]. Der heterozygote Verlust des prostataspezifischen Homeobox-Gens *NKX3.1*, ist mit einer prostatistischen epithelialen Dysplasie und Hyperplasie assoziiert [9].

Über die Hälfte aller Prostatakarzinome beinhalten Fusionsgene, in denen Androgenabhängige oder Prostata-spezifische Promotoren die Expression von onkogenen Transkriptionsfaktoren, meist der ETS-Familie, lenken [10, 11]. Die häufigste Fusion besteht dabei zwischen dem Onkogen *ERG* und dem AR Zielgen *TMPRSS2* [12]. *TMPRSS2*-

ERG Fusionsproteine verändern die AR-Expression und lenken dessen Aktivität in Richtung Zellproliferation um [13]. Die TMPRSS2-ERG Gen-Fusion oder die ERG-Überexpression waren in einigen Studien mit einem früheren biochemischen Rezidiv assoziiert [14, 15], in anderen hingegen mit einer günstigeren Prognose [16].

1.2 Androgen-Rezeptor

Der Androgen-Rezeptor (AR) ist ein Mitglied der Superfamilie Nukleärer Rezeptoren; ihre Mitglieder fungieren als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren. Sie vermitteln die Expression von Zielgenen als Antwort auf die spezifische Ligandenbindung an den jeweiligen Rezeptor. Nukleäre Rezeptoren (NR) können in drei Hauptgruppen unterteilt werden [17-19]. Die klassischen Steroid-Rezeptoren wie der Androgen-Rezeptor, der Estrogen-Rezeptor (ER), der Progesteron-Rezeptor (PR), der Glukokortikoid-Rezeptor (GR) und der Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) werden als Typ 1 Rezeptoren eingruppiert. Diese Rezeptoren bilden Liganden-induzierte Homodimere, die an invertierte Hormon-responsive Elemente (HRE) binden.

1.2.1 Aufbau und Funktion

Das humane *AR Gen* ist auf dem X Chromosom (q11-12) lokalisiert, bestehend aus 8 Exonen, welche für ein Protein aus 919 Aminosäuren mit einer Masse von 110 kDa kodieren. Die molekulare Struktur des AR kann, wie bei allen anderen Mitgliedern der NR-Superfamilie, in vier funktionelle Domänen unterteilt werden. Eine schwach konservierte N-terminale Domäne (NTD), eine stark konservierte DNA-bindende Domäne (DBD) und eine mäßig konservierte Liganden-bindende Domäne (LBD) [20, 21]. Die „Hinge“-Region, eine kurze Aminosäuresequenz, separiert die LBD von der DBD und beinhaltet einen Teil des nukleären Lokalisationssignals (NLS) für den nukleären Import [22].

Die NTD gilt als konstitutiv aktiv und kann in LBD-Deletionsmutanten Transkription unabhängig vom Androgenstimulus aktivieren. Im Gegensatz zu anderen Steroid-Rezeptoren, die die *activation function 2* (AF2) in der LBD für ihre Transkriptionsaktivität nutzen, vermittelt im AR die *activation function 1* (AF1) der NTD die hauptsächliche transkriptionelle Aktivität und ist für die Interaktion mit vielen Ko-Regulatoren verantwortlich [23, 24]. AF1 umfasst zwei *transcriptional activation units* (TAU): TAU-1 und TAU-5. TAU-1 wird für die Agonist-stimulierte AR-Aktivität benötigt, wohingegen TAU-5 konstitutive AR-Aktivität in der Abwesenheit der LBD verleiht [25].

Die DBD besteht hauptsächlich aus zwei Zinkfinger-Domänen. Der erste Zinkfinger enthält ein konserviertes P-Box Motiv, welches spezifische Nukleotide koordiniert. Der zweite Zinkfinger enthält ein konserviertes D-Box Motiv, welches DBD/DBD-Interaktion ermöglicht und somit an der Bildung von Rezeptor-Homodimeren beteiligt ist [26].

Die LBD ermöglicht die Bindung von Liganden, wie Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT), welche primäre Faktoren für die Kontrolle des Androgen-Signalwegs darstellen. Ähnlich wie die AF1-Region in der NTD, interagiert AF2 mit Ko-Regulatoren (SRC-1/p160) [27]. Die meisten der AR-Punktmutationen im Prostatakarzinom sind in der LBD-Region lokalisiert [28].

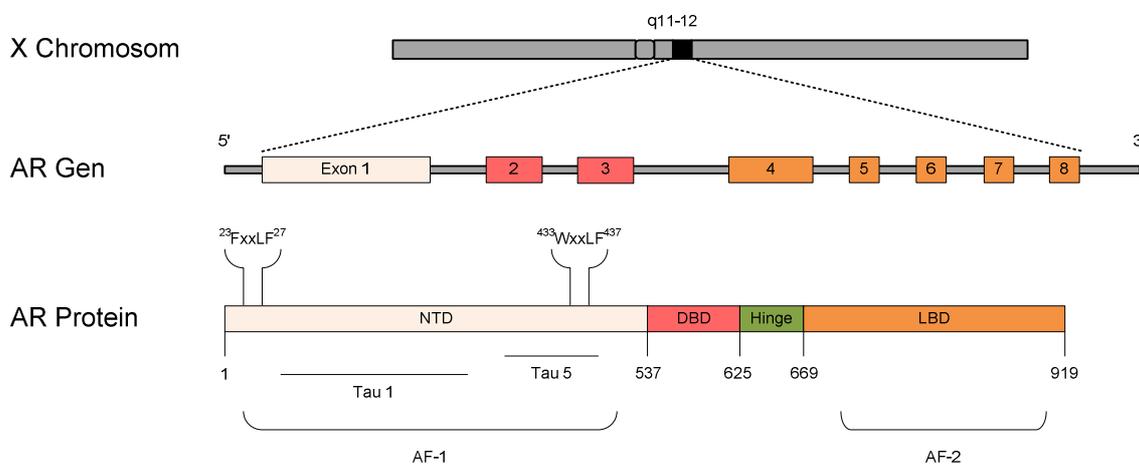


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von Androgen-Rezeptor Gen und Protein mit den Bezeichnungen für die spezifischen Motive und Domänen. Genlokalisierung X Chromosom q11-12. N-terminale Domäne (NTD): Exon 1. DNA-bindende Domäne (DBD): Exone 2 und 3. Ligandenbindende Domäne (LBD): Exone 4 bis 8. Die hervorgehobenen FxxLF- und WxxLF-Motive sind für die Interaktion mit Ko-Aktivatoren wichtig.

Liganden-abhängiger Kerntransport des AR konnte eindeutig mit GFP-gekoppelten AR Konstrukten gezeigt werden [29, 30]. Diese Translokation ist für die Funktion als Transkriptionsfaktor unabdingbar. Wie alle Steroid-Rezeptoren besitzt der AR zwei nukleäre Lokalisationssignale, nämlich NLS1 in der DBD und der Hinge-Region und NLS2 in der LBD [22, 31]. Zusätzlich ist ein nukleäres Exportsignal (NES) in der LBD vorhanden, welches zu einer cytoplasmatischen Lokalisation des AR führt, wenn keine Ligandenbindung vorliegt [32]. Ohne Ligand ist der AR Teil eines Multi-Chaperon-Komplexes, der wesentlich Hsp90 (*heat shock protein 90*) enthält. Der Multi-Chaperon-Komplex stabilisiert Steroid-Rezeptoren in einer Konformation, die sie aufnahmefähig für

Liganden macht [33, 34]. Durch die Bindung von Liganden wird die NES reprimiert und der AR kann in den Nukleus translozieren. Die Bindung von Androgen, wie Testosteron oder DHT, induziert die Dissoziation von Hsp90 aus dem Chaperon-Komplex, was zu einer Konformationsveränderung des AR führt, welche den nukleären Transport ermöglicht [34, 35]. Durch die Inaktivierung von Hsp90 findet keine Dissoziation vom AR statt, wodurch der Liganden-induzierte nukleäre Import des AR verhindert wird [36, 37]. Die Translokation des AR in den Nukleus wird durch die Interaktion mit dem Aktin-bindenden Protein Filamin begünstigt. Diese Interaktion ist von Liganden unabhängig, wird jedoch durch einen Liganden verstärkt [23]. Der Liganden-gebundene AR interagiert als Dimer mit Androgen-responsiven Elementen (ARE) vor allem in Enhancern oder auch Promotoren der Zielgene und wirkt meist als transkriptioneller Aktivator, seltener als Repressor.

1.2.2 Regulation des Androgen-Rezeptors

Die Regulation des AR wird durch eine Vielzahl von Mechanismen erzielt, zu denen Interaktionen mit Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren gehören. Einige davon sind für post-translationale Modifikationen verantwortlich, welche die Aktivität des AR modulieren. Dies kann durch eine Regulation der Proteinstabilität, Interaktionen mit anderen Proteinen, zelluläre Lokalisation und der Struktur des Rezeptors an sich erreicht werden. Kombinationen von verschiedenen Modifikationen agieren miteinander um die Aktivität oder die Interaktionen des AR zu verändern. Eine Vielzahl von post-translationalen Modifikationen des AR ist beschrieben, darunter Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung. Enzyme, die für die Modifikationen des AR verantwortlich sind, können im Prostatakarzinom dysreguliert sein und zu einer aberranten AR-Aktivität führen [38].

Die Acetylierung des AR wird durch die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) bestimmt. Diese Modulierung der AR-Acetylierung ist entscheidend für die Kontrolle der AR-Aktivität während des Zellzyklus und führt zu einem erhöhten Zellüberleben, erhöhter Proliferation und einer erhöhten Genaktivierung durch den AR [39]. Während der transkriptionellen Regulation des AR fungieren Acetyltransferasen wie p300/CBP und p160/SRC als Ko-Aktivatoren. Eine Acetylierung des AR selbst konnte durch p300 und p300/CREB (*cAMP-response element-*

binding protein) und *Tat-interactive* Protein (Tip60) nachgewiesen werden [40-42]. Die Rekrutierung von HDAC1 führt zu einer Deacetylierung des AR und einer Verminderung der AR-Aktivität [41, 43]. Auch eine Hsp90-Acetylierung führt zu einer Destabilisierung des AR und zu dessen Abbau durch das Proteasom [44, 45]. Die AR-Acetylierung wird im Abschnitt 4.4 noch einmal ausführlich diskutiert.

Durch Methylierung von Histonen kann die AR-Aktivität indirekt reguliert werden. Methylierung und Demethylierung von Histonen sind Schlüsselprozesse für die Regulation und Initiation der Transkription. Lysin-Demethylasen (KDM) wie LSD1/KDM1A [46] und Lysin-Methyltransferasen (KMT) fungieren als ko-regulatorische Proteine [47]. Der AR selbst kann durch die Methyltransferase Set9 methyliert werden, dabei fördert Set9 die Interaktion zwischen der N- und C-terminalen Domäne des AR [48, 49]. Eine direkte Demethylierung des AR wurde bis jetzt nicht beschrieben.

Phosphorylierungen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten beeinflussen die AR-Aktivität durch Verstärkung oder Hemmung von Protein-Interaktionen; die Phosphorylierungsstellen befinden sich hauptsächlich, aber nicht ausschließlich in der NTD [50, 51] mit der hormon-unabhängigen Koaktivierungsdomäne AF1. Phosphorylierungen sind in unterschiedlichem Maße von der Anwesenheit von Androgenen abhängig; einzelne Phosphorylierungsstellen werden konstitutiv phosphoryliert, andere werden Androgen-induziert phosphoryliert [52]. Bei der Androgen-induzierten Phosphorylierung werden die Phosphorylierungsstellen durch eine Konformationsänderung zugänglicher für Kinasen [53]. Auch die Lokalisation des AR in der Zelle beeinflusst die Phosphorylierung, jedoch kann auch die Phosphorylierung selbst einen Einfluss auf die Lokalisation ausüben [54].

AKT bindet, aktiviert und phosphoryliert den AR an Ser213 und Ser790 Androgenunabhängig [55]. Eine Mutation dieser Bindestellen hat keinen Einfluss auf die AR-Inhibition durch PTEN, was zu der Annahme führt, dass die Inhibition des AR durch PTEN- nicht über eine verminderte Phosphorylierung, sondern eher durch eine direkte Interaktion zustande kommt [56, 57]. Eine IGF1-induzierte Aktivierung von AKT führt ebenfalls zu einer Ser213 Phosphorylierung [58], was jedoch in einer Inhibition des AR resultiert [51].

GSK3 β , welche durch AKT-vermittelte Phosphorylierung inhibiert wird, katalysiert ebenfalls eine Phosphorylierung des AR, inhibiert dabei jedoch seine transkriptionelle Aktivität durch eine Hemmung der Interaktion zwischen den N- und C-terminalen Regionen. Diese Phosphorylierung verändert nicht die Lokalisation und die Stabilität des AR [59, 60]. AKT-vermittelte Phosphorylierung des AR ist allerdings nicht verantwortlich für die beobachtete Synergie von AR und AKT in der Progression von Prostatakarzinomen [61].

Dagegen sind Fehlregulationen der AR-Phosphorylierung an anderen Stellen für die Entwicklung und Progression des Prostatakarzinoms bedeutsam. Ein Beispiel dafür ist Ser929, welches durch die Aurora A Kinase phosphoryliert werden kann. Diese Kinase ist in zahlreichen Karzinomen, einschließlich dem Prostatakarzinom, häufig überexprimiert und fördert dabei das Zellüberleben, eine Phosphorylierungs-abhängige Transaktivierung und die Induktion von PSA in Anwesenheit oder Abwesenheit von Androgenen [62]. Eine der am besten charakterisierten Stellen ist Ser81, dessen Phosphorylierung in Karzinomen im Vergleich zu normalem Gewebe erhöht ist [63].

Ubiquitinierung spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion, der Kontrolle von Proteinspiegeln sowie des Zellzyklus. Dieser Prozess wird durch eine Serie von Enzymen katalysiert, für die Spezifität ist die beteiligte E3-Ubiquitin-Ligase verantwortlich [64, 65]. Eine Poly-Ubiquitinierung an Lys48 führt zu einem Abbau des Zielproteins durch Proteasomen, die Poly-Ubiquitinierung an Lys63 induziert hingegen Prozesse wie lysosomalen Abbau, aber auch DNA Reparatur oder Signaltransduktion. MDM2 und RNF6 wurden als E3 Ligasen des AR identifiziert [66, 67]. HSP27 verhindert die AR-Ubiquitinierung durch MDM2 indem es mit dem AR assoziiert, in Abhängigkeit von einer Stimulation durch Androgene [68]. *TSG101 (Tumour susceptibility gene 101)* kann die AR-vermittelte Transkription durch eine gesteigerte Mono-Ubiquitinierung von Liganden-gebundenem AR verstärken [69]. AR-Phosphorylierung ist eine Voraussetzung für Ubiquitinierung durch MDM2. Die Aktivierung von AKT durch IGF1 oder IL6 führt zu einer Phosphorylierung und gleichzeitig zu einer Aktivierung von MDM2. Das wiederum ermöglicht einen proteasomalen Abbau des AR nach Ubiquitinierung durch MDM2 [66]. Auch HDAC1 interagiert mit dem AR und MDM2. Es führt in diesem Komplex zu einer Abschwächung der transkriptionellen Aktivität des AR. Die Poly-Ubiquitinierung des AR ist

androgenabhängig und kann durch den AR Ko-Aktivator Tip60 verhindert werden [70]. Die Ubiquitinierung des AR durch RNF6 verbessert dagegen die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren wie ARA54. RNF6 wird während der Prostatakarzinom-Progression hochreguliert und ist für das Tumorwachstum bei niedrigen Androgenspiegeln erforderlich [67].

Deubiquitinasen (DUB, USP) entfernen Ubiquitine von Proteinen. USP10, USP26 und USP22 ko-aktivieren den AR. USP10 deubiquitiniert Chromatin-Proteine an AR-regulierten Genen in Abhängigkeit von Androgenen, um eine transkriptionelle Aktivität zu ermöglichen [71, 72]. Die USP26-Interaktion mit dem AR ist Zelllinien-spezifisch und findet im Nukleus statt [73]. USP22 hat, wie USP10, keinen Einfluss auf die AR-Spiegel. Die AR-USP22 Interaktion findet jedoch nur in Abwesenheit von Androgenen statt [74].

1.3 WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg ist besonders während der Embryogenese von großer Bedeutung, wie zum Beispiel bei der Ausbildung der Körperachse und der Bildung von Organanlagen, oder bei der Differenzierung und Proliferation von Stammzellen. Dabei induziert der WNT-Signalweg die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in mesoderme und endoderme Vorläuferzellen [75]. Die klinische Relevanz des Signalwegs wurde durch Mutationen nachgewiesen, die eine Vielzahl von Erkrankungen, wie Kolon-, Mamma- und Prostatakarzinom, Glioblastome und auch Typ II Diabetes, zur Folge haben [76].

Durch die Bindung von WNT-Proteinen, bestehend aus 19 Cystin-reichen Glykoproteinen, als Liganden an Frizzled (FZD) und LRP Transmembran-Rezeptoren wird einer der drei verschiedenen intrazellulären Signalwege aktiviert. In allen drei Signalwegen wird durch die WNT-Liganden Bindung an den FZD-Rezeptor die Rekrutierung des Dishevelled (Dvl) Proteins hervorgerufen.

1.3.1 Nicht-kanonischer WNT-Signalweg

Im β -Catenin-unabhängigen nicht kanonischen Signalweg, bindet der WNT/FZD/Dvl-Komplex an den Dvl-assoziierten Aktivator für Morphogenese (Daam1). Diese Signalkaskade führt zur Aktivierung von Rac und RhoA GTPasen, welche Zellpolarität vermitteln.

Im Wnt- Ca^{2+} nicht-kanonischen Signalweg bindet der WNT/FZD/Dvl-Komplex an ein G-Protein (ROR 1/2), welches über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zur Aktivierung von Calmodulin-abhängiger Kinase 2, Protein-Kinase C, der Phosphatase Calcineurin und weiterer Signalwege führt.

1.3.2 Kanonische WNT-Signalwege

Der kanonische WNT-Signalweg ist ausgeschaltet, wenn entweder kein WNT-Ligand vorhanden ist oder der Rezeptorkomplex blockiert wird. Mitglieder der Dickkopf-Familie (DKK1-4) binden direkt an einen der Transmembran-Rezeptoren (FZD, LRP5/6) und blockieren dadurch die Bindung von WNT-Liganden. WNT-Inhibitor-Faktor (WIF-1) und Mitglieder der Familie der sezernierten FZD-Rezeptor-Proteine (SFRP1-5) binden WNT-Liganden und verhindern somit die Bindung an Rezeptoren. Im inaktiven Zustand des Signalwegs wird β -Catenin durch einen Destruktionskomplex abgebaut. Der Komplex beinhaltet Axin, *adenomatosis polyposis coli* (APC), Casein Kinase 1α (CK1 α) und GSK3 β . β -Catenin wird durch CK1 α und GSK3 β phosphoryliert und anschließend durch die E3 Ubiquitin-Ligase (*β -transducin repeat-containing protein*) β -TRCP ubiquitiniert. Anschließend kommt es zu einer schnellen Degradation im Cytoplasma durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg. Bei niedrigen β -Catenin-Spiegeln interagieren TCF/LEF Transkriptionsfaktoren mit dem Ko-Repressor Groucho. Dadurch werden die Zielgene des Signalwegs reprimiert.

Die Aktivierung des WNT-Signalwegs erfolgt durch die Stabilisierung von cytosolischem β -Catenin, bedingt durch die Bindung von WNT-Liganden an die Transmembranrezeptoren FZD oder LRP5/6. Dsh wird zur Plasmamembran rekrutiert und interagiert mit einem der FZD-Rezeptoren. LRP5/6 wird durch CK1 α und GSK3 β phosphoryliert. Die Interaktion von Axin mit phosphoryliertem LRP5/6 und Dsh führt zur Inaktivierung des Destruktionskomplexes. Nachfolgend akkumuliert β -Catenin im Cytoplasma, gelangt in den Nukleus und aktiviert WNT-Zielgene durch die Bindung an TCF/LEF. Dabei wird Groucho verdrängt und der β -Catenin/TCF/LEF-Komplex kann mit spezifischen Ko-Aktivatoren interagieren um die Transkription von Zielgenen zu stimulieren. Zu diesen Zielgenen gehören in vielen Zellen – *MYC*, *CCND1* (Cyclin D1), *Survivin*, *AXIN2*. Für β -Catenin wurde auch ein ko-aktivierender Effekt auf den AR, durch eine LBD-Bindung,

beschrieben [77-79]. Dadurch wird die Interaktion von TCF4 mit β -Catenin vermindert und die Stimulation von Zielgenen beeinträchtigt [78, 80-82].

1.4 PITX Gene

Die RIEG/PITX-Familie der Bicoid-verwandten Homeodomäne-enthaltenden Gene beinhaltet drei Mitglieder: *paired-like homeodomain* Gen 1 (*PITX1*), *paired-like homeodomain* Gen 2 (*PITX2*) und *paired-like homeodomain* Gen 3 (*PITX3*), die als Transkriptionsfaktoren fungieren. Die Homeodomäne ist ein 60 Aminosäure langes Polypeptid, mit einer DNA-bindenden Funktion. Die DNA-Bindenspezifität der Gene der Bicoid-Unterfamilie wird durch ein Lysin an Position 50 in der Erkennungshelix der Homeodomäne gewährleistet [83, 84]. *PITX1*, *PITX2* und *PITX3* sind auf Aminosäureebene in Vertebraten hochkonserviert. In der Maus sind beispielsweise die Homeodomänen von *PITX2* und *PITX3* identisch, *PITX1* unterscheidet sich nur um zwei Aminosäuren. Auch in der C-terminalen Sequenz aller drei Proteine liegt ein konservierter Abschnitt vor, der als OAR-Sequenz [85] oder als C-Peptid [86] bezeichnet wird. Namensgebend für die OAR- (*Otp and aristaless*) Domäne waren die Homeobox-Gene *Otp* und *aristaless* [87, 88]. Die OAR-Sequenz ist in mehreren Homeobox-Genen vorhanden. Im Gegensatz dazu ist der N-terminale Abschnitt dieser Proteine sehr unterschiedlich. Die *PITX*-Gene haben sehr unterschiedliche entwicklungs- und gewebespezifische Expressionsmuster, die sich jedoch in einzelnen Fällen überlappen können.

PITX1 wurde erstmals als Transkriptionsfaktor beschrieben, der die Transkription des Pro-Opiomelanocortin-Gens (*POMC*) reguliert und in die Differenzierung von Hypophysenzellen und in die Hypophysenbildung involviert ist [89]. Es spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Hintergliedmaßen, dabei bestimmt *PITX1* die Morphologie von Muskeln, Sehnen und Knochen [90, 91]. Auch die Entwicklung des oralen Epithels, des ersten Branchialbogens und deren Derivate, wie der Gaumen, die Zähne und die Rathke'sche Tasche, werden durch *PITX1* gesteuert [92-94]. In der posterioren Lateralplatte und im extraembryonalen Mesoderm wird *PITX1* ebenfalls exprimiert [94]. Die *PITX1*-Expression ist in verschiedenen humanen Tumorentitäten vermindert. Dazu gehören Magen-, Lungen-, Harnblasen- und Kolonkarzinome [95-97].

Die Expression von *PITX3* ist in der Entwicklung des Mittelhirns besonders ausgeprägt, dabei ist sie auf Neuronen des mesencephalen dopaminergen Systems (*mesDA*) begrenzt

[98]. Extraneuronale PITX3-Expression findet sich sowohl in der Linsenbildung während der Augenentwicklung [99, 100], als auch in Skelettmuskelzellen [101]. Mutationen im *PITX3*-Gen führen im Menschen zu vererbbaarem grauen Star und anteriorer mesenchymaler Segment-Dysgenese (AMSD) [102-104]. Auch bei der Entwicklung der Parkinson-Krankheit sind Mutationen im *PITX3*-Gen, insbesondere Polymorphismen, von Bedeutung [105-109]. Ein Zusammenhang zwischen PITX3 und Tumorerkrankungen ist nicht bekannt.

1.4.1 PITX2 Gene - Aufbau und Funktion

Das *PITX2* Gen liegt auf dem 4q25 Locus und transkribiert drei Hauptisoformen, die durch alternatives Spleißen oder die Verwendung eines alternativen Promotors entstehen [87, 88, 110-112]. Durch das alternative Spleißen kommen PITX2a und PITX2b zustande. PITX2a enthält die Exone 1, 2, 5 und 6. PITX2b ist identisch zu PITX2a, enthält jedoch zusätzlich Exon 3. *PITX2c* wird von einem alternativen Promotor oberhalb von Exon 4 transkribiert. Die N-terminale Sequenz ist in den drei Isoformen sehr unterschiedlich, der C-Terminus, mit der darin enthaltenen Homeodomäne und der OAR-Sequenz ist dagegen bei allen drei Isoformen identisch (Abbildung 1.2). Eine Sonderform stellt PITX2d dar, welches nur im Menschen vorkommt und durch alternatives Spleißen entsteht. Diese Isoform verwendet denselben Promotor wie *PITX2c*, jedoch ist die Homeodomäne trunziert und kann somit DNA nicht binden [113]. Alle *PITX2*-Isoformen sind in der Lage Homodimere zu bilden, Heterodimere können mit PITX2b gebildet werden [113].

Das *PITX2* Gen wurde in Patienten mit Axenfeld-Rieger Syndrom (ARS) identifiziert [87]. ARS ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die durch Fehlbildungen der Augen, Zähne und verschiedener Körpersegmente charakterisiert ist. Die klassischen Veränderungen an den Augen beinhalten u.a. eine Hypoplasie der Iris, Pupillektopie, Polykorie und iridokorneale Verwachsungen. Zusätzlich sind andere Anomalien des Gesichtsfeldes bekannt. Dazu gehören Hypertelorismus, Telekanthus, eine breite und flache Nasenwurzel, sowie Abnormalitäten der Zähne (Mikrodontie, Hypodontie). Auch Hautveränderungen in Bereich des Nabels, Abnormalitäten im Bereich der Hypophyse und der Niere und angeborene Herzfehler wurden beschrieben [114-117]. Patienten, bei denen klassisches ARS vorliegt, tragen alle *PITX2* Mutationen. Auffällig ist dabei eine Anhäufung der Mutationen in der Homeodomäne [87, 118, 119]. Auch andere

Funktionsstörungen der anterioren Segmententwicklung können mit Mutationen im *PITX2* Gen in Zusammenhang gebracht werden. Dazu gehören das Iridogoniodysgenesie-Syndrom und sporadische Fälle von Peters Anomalie [120, 121]. Ein Zusammenhang zwischen Mutationen im *PITX2* Gen und einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Vorhofflimmern ist ebenfalls beschrieben [122].

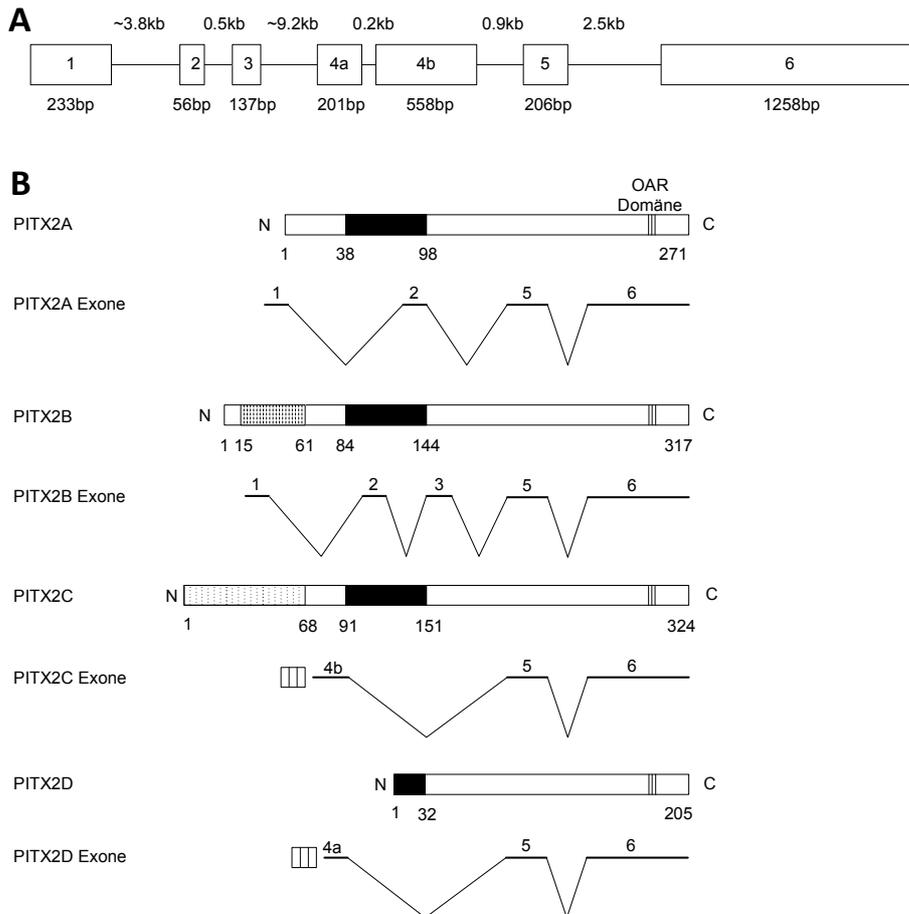


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von *PITX2* Gen und *PITX2* Isoformen. **(A)** *PITX2* Gen mit den jeweiligen kodierenden Exonen. **(B)** *PITX2*-Isoformen A, B, C und D. Jeweils angegeben sind die Exone, die für die Isoformen kodieren und die konservierten Strukturen in der C-terminalen Region. Schwarz: Homeodomäne. Gestreift: OAR-Domäne.

In der Embryonalentwicklung zeigen die *PITX2*-Isoformen eine teilweise überlappende Expression in verschiedenen Geweben bei insgesamt deutlich unterschiedlichen Expressionsmustern. In der Embryonalentwicklung ist die Expression von *PITX2* entscheidend für die Ausbildung der links-rechts Körperachse und die asymmetrische

Entwicklung von Herz, Lunge, Leber, Milz und Darm [88, 123-127]. Die drei PITX2-Isoformen sind in verschiedenen Organen unterschiedlich stark exprimiert. Die PITX2c Dosis ist besonders für die links-rechts Asymmetrie wichtig [128-131]. Auch in der Herzentwicklung ist die Expression der PITX2c-Isoform von essentieller Bedeutung [123, 128, 130-134]. In Myoblasten führt die Überexpression von PITX2c dazu, dass die Zellen in einem undifferenzierten myogenen Stadium verweilen und keine Weiterentwicklung stattfindet [135]. Die PITX2-Expression ist auch notwendig für die korrekte Entwicklung der Augen und Zähne [115, 117, 118, 120, 136]. Auch bei der Ausbildung der Hypophyse ist PITX2 ein wichtiger Faktor [88, 125, 134, 137]. Versuche mit PITX2 *Knockout* Mäusen zeigten, passend zur Symptomatik des ARS beim Menschen, dass durch den Verlust von PITX2 schwere Entwicklungsdefekte in unterschiedlichen Organen, wie dem kardialen System, der Hypophyse, den Augen und Zähnen entstehen. Diese multiplen Fehlbildungen können beim Embryo tödlich sein [112, 124-126].

In adulten Organismen wie in der Embryonalentwicklung agieren die PITX2-Isoformen als transkriptionelle Regulatoren. Alle drei Isoformen sind in der Lage eine Vielzahl von Genen zu transaktivieren. PITX2d besitzt keine aktive Homeodomäne, kann jedoch die transkriptionelle Aktivität der Isoformen PITX2a und PITX2c durch direkte Interaktion inhibieren [113]. PITX2-Isoformen aktivieren die Promotoren der Prokollagen-Lysylhydrolase 1 (PLOD1) und von DLX2 in verschiedenen Zelllinien. Dabei ist die Regulation dieser Zielgene unterschiedlich stark. Die Isoformen von PITX2 können synergistisch zusammenwirken [113]. In der Hypophyse ist *PRL* (Prolactin) ein Zielgen von PITX2, welches durch Pit-1 und PITX2 synergistisch aktiviert wird [118].

PITX2 ist ein Effektor der WNT/ β -Catenin- und Nodal-Signalwege [128, 134, 138]. Es aktiviert auf transkriptioneller Ebene die Expression von Genen, die für die Zellproliferation (*MYC*, *CCND2*, *CCND1*), oder die Zelldifferenzierung (*MyoD*) von Bedeutung sind [134, 138-140]. Verschiedene mit PITX2 interagierende transkriptionelle Regulatoren, darunter β -Catenin, LEF/TCF und YB-1 wurden beschrieben [137, 141].

Im WNT/ β -Catenin-Signalweg ist *PITX2* selbst ein Zielgen und beeinflusst dessen Aktivität in einer komplexen Regulationsschleife. Der regulierte Austausch des PITX2 Ko-Repressors HDAC1 durch β -Catenin verwandelt PITX2 vom Repressor zum Aktivator. Ko-Aktivatoren von PITX2, wie CBP/p300, NLI/Ldb/CLIM und Tip60/TRRAP sind für die Induktion des

Zielgens Cyclin D2 von essentieller Bedeutung [134]. PITX2 fungiert nicht nur als Aktivator des WNT/ β -Catenin-Signalwegs. Auch das *DKK2* Gen, welches für einen Antagonisten des kanonischen WNT-Signalwegs kodiert, ist ein Zielgen von PITX2 [142]. Die Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs führt zu einer Stabilisierung der PITX2-mRNA, die normalerweise einer raschen Degradation unterliegt. Gleichzeitig werden auch instabile mRNAs weiterer Gene, wie *JUN*, *Cyclin D1* und *Cyclin D2*, die an der positiven Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, stabilisiert. PITX2 ist selbst der Mediator für diese Stabilisierung der mRNAs [143]. Im Gegensatz führt die Überexpression von PITX2a in HeLa Zellen über die Akkumulation des Tumorsuppressors p53 und p21^{CIP1} aus dessen Zielgen *CDKN1A* zur Inhibition der Zellproliferation und einem Zellzyklusarrest in der Phase G0/G1 [144].

1.4.2 PITX2 in Tumoren

Es gibt deutliche Hinweise auf eine wichtige Rolle von PITX2 in diversen humanen Tumorerkrankungen. Dabei tritt, abhängig von der Tumorentität, eine Überexpression oder eine Expressionsverminderung von PITX2 auf.

Die Überexpression von PITX2 begünstigt die Tumorgenese im Schilddrüsenkarzinom durch die Regulation von Cyclin D2 auf transkriptioneller Ebene. Diese aberrante PITX2-Cyclin D2-Achse fördert die Proliferation von Karzinomzellen der Schilddrüse [139]. Im Ovarialkarzinom fördert die PITX2-Überexpression die Zellproliferation, Zellmigration und -invasion, wie auch das Tumorwachstum in Maus-Xenograften [145]. Auch im Kolonkarzinom (CRC), im ösophagealen Plattenepithelkarzinom (ESCC) und im Nierenkarzinom ist PITX2 hochreguliert [146-149]. Eine Inaktivierung der PITX2-Überexpression in Hypophysenadenomen induziert Apoptose [150].

In Lymphknoten-negativen Mammakarzinomen und im Prostatakarzinom korreliert die PITX2-Hypermethylierung negativ mit der Expression von PITX2. Die Hypermethylierung von PITX2 geht mit einer schlechten Prognose einher, im Mammakarzinom hinsichtlich des Gesamtüberlebens und im Prostatakarzinom bezogen auf ein biochemisches Rezidiv nach radikaler Prostatatektomie [151-153]. Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass PITX2 in Prostatakarzinom-Knochenmetastasen signifikant gegenüber primären Prostatakarzinom- und Prostatanormalgeweben hochreguliert sei. Die Überexpression der Isoformen PITX2a/b/c stimulierte nach diesem Bericht die Zellmotilität in der

Prostatakarzinom-Zelllinie PC3, dabei vermittelt PITX2a einen zusätzlichen Motilitätsgewinn durch eine nicht-kanonische WNT5a-Stimulation [154].

1.5 Ziel der Arbeit

Die Expression von PITX2 ist im Prostatakarzinom signifikant herunterreguliert [153]. Die Hypermethylierung von PITX2 wurde zuvor schon als prognostischer Marker identifiziert. Über die molekulare Funktion von PITX2 im Prostatakarzinom ist jedoch nahezu nichts bekannt (Ref. 145 erschien erst kürzlich). Es ist denkbar, dass hierbei die Bedeutung von PITX2 als Zielgen des WNT-Signalwegs relevant ist. In vielen normalen Geweben dient PITX2 als Aktivator für weitere Zielgene durch eine Komplexbildung mit β -Catenin und TCF/LEF. Diese Zielgene können wiederum den Androgen-Rezeptor hemmen. Im Prostatakarzinom besteht in dieser Hinsicht ein gewisser Antagonismus zwischen Androgenantwort und kanonischem WNT-Signalweg [80, 155], da β -Catenin im Nukleus die Möglichkeit hat mit dem Androgen-Rezeptor oder mit TCF/LEF zu interagieren (Abbildung 1.3 A).

Die Arbeitshypothese beinhaltetete, dass im Prostatakarzinom die Expression von PITX2 stark vermindert ist und daher eine verstärkte Aktivierung der Zielgene des WNT-Signalwegs nicht mehr stattfindet. Aufgrund dessen wird eine Repression des Androgen-Rezeptors über diesen Signalweg verhindert und es findet dadurch eine Umlenkung von β -Catenin in Richtung des Androgen-Rezeptors statt (Abbildung 1.3 B).

Ziel der Arbeit war zu untersuchen, auf welche Weise die Herunterregulation von PITX2 die Progression des Prostatakarzinoms fördert und speziell, wie PITX2 mit der Androgenantwort und dem WNT-Signalweg interagiert.

Daraus ergibt sich die Fragestellung, wie sich eine Reexpression von PITX2 in Prostatakarzinom-Zelllinien auswirkt und ob es die Funktion eines Tumorsuppressors ausüben kann. Um einen besseren Überblick über die Funktion von PITX2 zu bekommen, ist die Information wesentlich, welche Gene durch eine Reexpression von PITX2 reguliert werden.

Darüber hinaus sind die Unterschiede zwischen den drei PITX2-Isoformen von Bedeutung, da die einzelnen Isoformen verschiedene Funktionen besitzen und diese sich in unterschiedlicher Weise auf das Prostatakarzinom auswirken könnten.

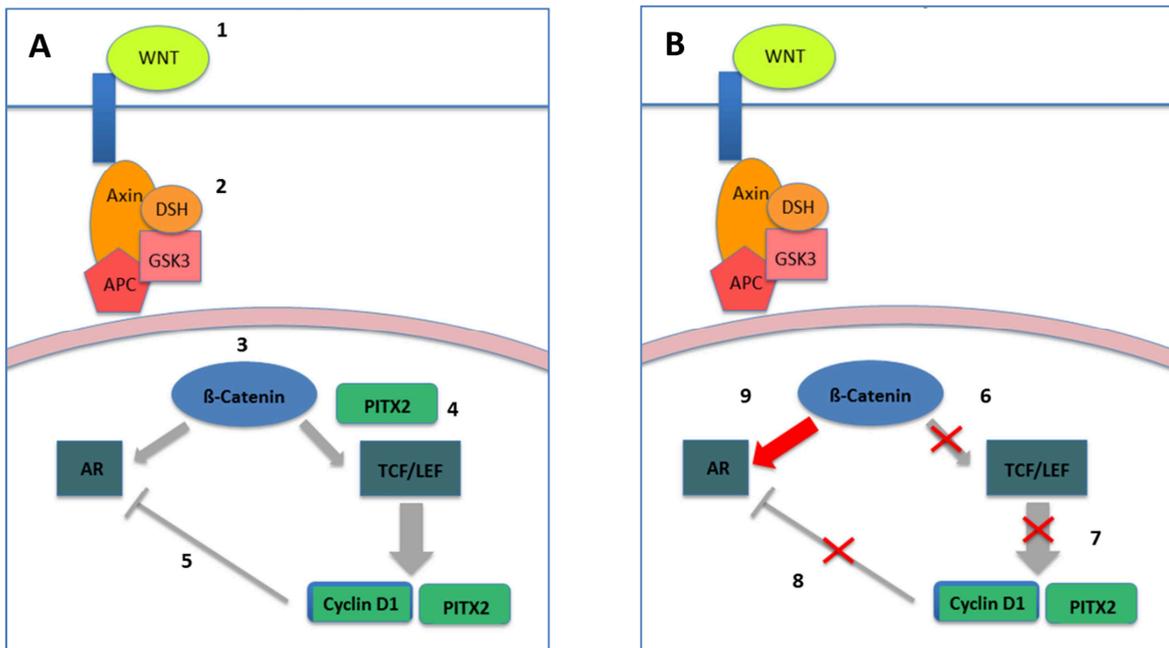


Abbildung 1.3: Arbeitshypothese: Umlenkung von β -Catenin zum AR. **A (1)** Ein WNT-Ligand bindet an Rezeptoren und aktiviert den Signalweg. **(2)** Die Rekrutierung von Dsh führt zur Inaktivierung des Destruktionskomplexes und **(3)** β -Catenin kann in den Nukleus translozieren und hat die Möglichkeit an den AR oder an TCF/LEF zu binden. **(4)** Durch eine Bindung von β -Catenin an TCF/LEF werden Zielgene aktiviert. PITX2 bildet einen Komplex mit TCF/LEF und β -Catenin, was zu einer verstärkten Aktivierung der Zielgene führt. **(5)** Zielgene wie Cyclin D1 sind in der Lage den AR zu reprimieren. **B (6)** Im Prostatakarzinom ist PITX2 herunterreguliert und kann nicht mit β -Catenin und TCF/LEF komplexieren. **(7)** Dadurch liegt keine verstärkte Expression der Zielgene vor und **(8)** der AR wird weniger stark reprimiert. **(9)** β -Catenin zieht eine Bindung an den AR gegenüber dem WNT-Signalweg vor.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Prostata-Gewebeproben

RNA wurde aus benignen und Karzinomgeweben wie beschrieben [156] extrahiert. Alle Gewebe wurden durch radikale Prostatektomie in den Jahren 1997 bis 2001 von Patienten, die an der Urologischen Klinik behandelt wurden, erhalten. Das Gewebeset enthält 47 Tumorgewebe und 13 benigne Gewebe aus Prostatae, mit einem Karzinom (Tabelle 2.1). Die benignen Gewebe wurden Patienten im Alter zwischen 55 und 75 Jahren entnommen, die Tumorgewebe stammen von Patienten im Alter zwischen 59 und 76 Jahren. Die benignen Gewebe wurden aus Arealen entnommen, die so weit wie möglich entfernt vom Prostatakarzinom lagen. Diese Proben wurden durch eine Eosin-Hämatoxylin Färbung histologisch bestätigt. Die histologische Diagnose, als auch die *Gleason* Einstufung der Tumore wurde anhand der *TNM Guidelines* der UICC (*Union for International Cancer Control*) von 1997 durchgeführt. Alle Patienten stimmten der Verwendung der Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke zu und die vorliegende Untersuchung wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität gebilligt.

Von den 47 Prostatakarzinom-Gewebeproben waren 20 als pT2, 25 als pT3 und 2 als pT4 eingestuft. Lymphknotenmetastasen waren zum Zeitpunkt der Prostatektomie in 12 der Patienten vorhanden, dagegen waren keine Fernmetastasen nachweisbar. Die Gleason Summe in den Tumorproben war kleiner als 7 in 13 Fällen, gleich 7 in 26 Fällen und größer als 7 in 8 Fällen. Der Krankheitsverlauf der Patienten im Anschluss an die Operation wurde über unterschiedlich lange Zeiträume, mit einem Median von 64 Monaten, beobachtet. Follow-Up Daten waren für 45 der 47 Patienten vorhanden. 18 Patienten bekamen ein biochemisches Rezidiv, welches durch einen PSA Wert > 0,2 ng/ml in zwei aufeinander folgenden Messungen definiert wurde.

Tabelle 2.1: Klinische Parameter von Prostatakarzinom Gewebeproben

Probe	Alter	T- Stadium	Regionale Lymphknoten Metastasen	Biochem. Rezidiv	Fern- Metastasen	Gleason Score
pTu 36	72	pT3b	pN0	R1	M0	7

pTu 38	75	pT2b	pN0	R0	M0	7
pTu 50	67	pT3b	pN1	R1	M0	7
pTu 65	62	pT3b	pN0	R1	M0	7
pTu 83	76	pT3b	pN0	R0	M0	7
pTu 89	68	pT2b	pN0	R0	M0	3
pTu 93	73	pT3b	pN0	R1	M0	7
pTu 95	74	pT3b	pN1	R1	M0	10
pTu 97	71	pT3a	pN0	R0	M0	7
pTu 99	67	pT2b	pN0	R0	M0	5
pTu 101	68	pT3a	pN0	<i>N/V</i>	M0	8
pTu 105	59	pT3a	pN0	R0	M0	5
pTu 107	59	pT3a	pN0	R1	M0	7
pTu 117	68	pT3b	pN0	R0	M0	5
pTu 119	63	pT3b	pN1	<i>N/V</i>	M0	9
pTu 121	65	pT2b	pN0	R0	M0	6
pTu 127	71	pT2b	pN0	R0	M0	6
pTu 133	72	pT2b	pN1	R1	M0	7
pTu 137	73	pT2b	pN0	R0	M0	8
pTu 139	65	pT3b	pN1	R1	M0	9
pTu 141	69	pT2b	pN0	R0	M0	4
pTu 145	70	pT4	pN1	R0	M0	7
pTu 161	64	pT2b	pN0	R0	M0	5
pTu 163	65	pT3a	pN1	R0	M0	5
pTu 169	72	pT3a	pN0	R0	M0	7
pTu 171	61	pT2b	pN0	R1	M0	5
pTu 175	73	pT2b	pN0	R0	M0	8
pTu 183	67	pT3a	pN0	R0	M0	6
pTu 187	68	pT2b	pN0	R0	M0	8
pTu 189	63	pT2b	pN0	R0	M0	7
pTu 191	72	pT2b	pN0	R0	M0	7
pTu 205	73	pT3a	pN0	R0	M0	7
pTu 209	71	pT3a	pN0	R0	M0	7
pTu 213	59	pT2a	pN0	R0	M0	7
pTu 215	58	pT3a	pN0	R0	M0	7
pTu 217	62	pT2b	pN0	R0	M0	8
pTu 219	64	pT4	pN1	R0	M0	7
pTu 225	62	pT3b	pN0	R0	M0	6
pTu 227	72	pT2a	pN1	R0	M0	7
pTu 230	68	pT2a	pN0	R1	M0	7
pTu 232	70	pT2b	pN1	R1	M0	7
pTu 236	74	pT3a	pN0	R0	M0	7
pTu 238	62	pT2a	pN0	R0	M0	6
pTu 245	66	pT3a	pN0	R0	M0	7
pTu 247	55	pT3b	pN1	R1	M0	7
pTu 253	61	pT3a	pN1	R0	M0	7
pTu 256	71	pT3b	pN0	R0	M0	7

2.1.2 Prostatakarzinom-Zelllinien

Die Zelllinie LNCaP wurde aus einer Lymphknoten-Metastase eines Prostatakarzinom Patienten isoliert. Das Wachstum dieser Zelllinie ist vom AR abhängig, welcher eine Mutation in der Ligandenbindungs-Domäne besitzt. Die Zelllinie 22Rv1 ist eine humane epitheliale Prostatakarzinom-Zelllinie, welche aus einem Xenotransplantat des primären Prostatakarzinoms CWR22 in der Maus etabliert wurde. 22Rv1 exprimiert, zusätzlich zum wildtypischen AR, auch eine Spleißvariante für ein konstitutives aktives Rezeptorprotein. Das Wachstum wird daher nur schwach durch Androgene stimuliert. Die Zelllinie PC3 wurde aus einer Knochenmetastase eines Prostatakarzinom-Patienten isoliert, die DU145 aus einer Prostatakarzinom-Metastase im Gehirn. Das Wachstum beider Zelllinien ist androgenunabhängig und sie exprimieren kein PSA und minimal den AR. Die MDA PCa2b Zelllinie wurde aus einer Knochenmetastase eines androgenunabhängigen Prostatakarzinoms isoliert; ihr Wachstum ist stark abhängig von Androgen. VCaP ist eine androgenabhängige Zelllinie, die aus einer Knochenmetastase eines Patienten mit kastrations-resistentem Prostatakarzinom isoliert und anschließend in Maus Xenograften passagiert wurde. Die Zelllinie PNT2 wurde aus adulten prostaticen Epithelzellen und BPH1 aus Gewebe einer BPH etabliert. Beide Zelllinien wurden durch Transfektion mit einem SV40 tragenden Plasmid immortalisiert. Humane Prostataepithel-Zellen (PrEC) wurden als primäre Zellen von der Firma Lonza bezogen.

2.1.2.1 Medien und Zusätze

Für die Kultivierung der Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP, PC3 und 22Rv1 wurde RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAXTM-I (Gibco) mit 10% FCS verwendet. Bei der Kultivierung der stabil transfizierten Zelllinien wurde dem Medium zusätzlich 5 µg/ml Blasticidin beigefügt. Das Selektionsmedium für die Zelllinie PC3 enthielt 150 µg/ml Zeocin, für die Zelllinie 22Rv1 800 µg/ml Zeocin.

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 2.2: Chemikalien, Reagenzien und Kits

Chemikalien, Reagenzien, Kits	Hersteller
Allgemeine Chemikalien	
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck

Chemikalien, Reagenzien, Kits	Hersteller
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇)	Merck
Kaliumhexacyanidoferrat(III) (K ₃ Fe(CN) ₆)	Merck
Kaliumhexacyanidoferrat(II) (K ₄ Fe(CN) ₆)	Merck
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Merck
SDS	Merck
EDTA	Merck
NP-40	Merck
DOC	Sigma
Tween-20	Sigma
Triton X100	Sigma
50x TAE Buffer	5-PRIME
Agarose	Sigma
Ethanol	Merck
Methanol	Merck
2-Propanol	Merck
Salzsäure 25% (HCl)	Merck
Chloroform	Merck
Glutaraldehyd 25%	Merck
Formaldehyd 37%	Merck
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck
<u>RNA Isolation, Reverse Transkription, PCR</u>	
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen
dNTP Mix	Fermentas
HotStarTaq DNA Polymerase Kit	Qiagen
6x DNA Loading Dye	Thermo
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
<u>Zellkultur, Transfektion, Behandlungen</u>	
PBS Dulbecco	Biochrom
FCS (fötale Kälberserum)	Biowest

Chemikalien, Reagenzien, Kits	Hersteller
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX-I	Gibco
Trypsin-EDTA	Sigma
Penicillin, Streptomycin	Sigma
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma
Zeocin	InvivoGen
Blasticidin	PAA
Tetracyclin	Sigma
X-Gal	Peqlab
R1881 C-III	Sigma
5-Aza-2'-Desoxyazacytidin (Aza)	Sigma
Suberoylanilid-Hydroxamsäure / Vorinostat (SAHA)	Cayman Chem. Company
CK2 Inhibitor V, Quinalizarin	Calbiochem
GSK3 XIII Inhibitor	Calbiochem
Optimem	Gibco
X-tremeGENE 9 DNA Transfektionsreagenz	Roche
Lipofectamine RNAiMAX Transfektionsreagenz	Invitrogen
 <u>Bakterienkultur</u>	
Difco Luria Agar Base, Miller	BD
Luria Broth	Invitrogen
Ampicillin	Sigma
ZR Plasmid Miniprep Classic Kit	Zymo Research
QIA Filter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
One Shot TOP10 competent <i>E.coli</i> Zellen	Invitrogen
XL-2 <i>Blue</i> ultrakompetente Zellen	Stratagene
 <u>Protein-Isolation, Western Blot</u>	
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma
Pierce BCA Protein Assay	Thermo
Lämmli Probenpuffer	Biorad
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo
10x Tris/Glycin/SDS Puffer	Biorad
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore
<i>Whatman Paper</i>	Whatman
Milchpulver, entfettet	Drogerie
ECL <i>Advance Western Blotting Detection Kit</i>	GE Healthcare
<i>High performance chemiluminescence film Amersham Hyperfilm ECL</i>	GE Healthcare
 <u>Klonierung, Reporter Assay</u>	
<i>Restriction Digest Puffer</i>	Fermentas

Chemikalien, Reagenzien, Kits	Hersteller
<i>Bam</i> HI	Fermentas
<i>Not</i> I	Fermentas
<i>Xho</i> I	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
10x Ligation Puffer	Fermentas
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
Dual-Luciferase Reporter-Assay System	Promega
Pyrosequenzierung	
TOPO TA Cloning <i>Kit For Sequencing</i> (enthält pCR4- TOPO Vector)	Invitrogen
PyroMark PCR Kit	Qiagen
1x <i>Coraload Concentrate</i>	Qiagen
Streptavidin Sepharose <i>Beads</i>	Amersham
PyroMark Gold Q24 Reagenz	Qiagen

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.3: Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse

Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen	Endkonz.	Menge
Protein Lysis Puffer RIPA		
NaCl 5 M	150 mM	3 ml
NP-40	1%	1 ml
DOC	0.5%	0.5 g
SDS 10%	0.1%	1 ml
EDTA 0.5 M	1 mM	200 µl
Tris pH 7,6 1 M	50 mM	5 ml
dest. H ₂ O		auf 100 ml
*frischen Protease Inhibitor Cocktail und Phosphatase Inhibitor Cocktail je 10 µl/1 mL RIPA zugeben		
Transfer Puffer 5x Stocklösung		
Tris	0.28 M	34 g
Glycin	0.5 M	144 g
dest. H ₂ O		auf 2 l
Elektrophorese Puffer		
10x Tris/Glycine/SDS Buffer (Biorad)	1x	100 ml
dest. H ₂ O		auf 1l
Transfer Puffer 1x		

Transfer Puffer 5x Stocklösung	1x	200 ml
Methanol	10%	100 ml
dest. H₂O		auf 1 l
<u>TBS 10x</u>		
Tris	0.5 M	24 g
NaCl	1.5 M	88 g
dest. H₂O		auf 1l
* pH 7.6 mit HCl einstellen		
<u>Waschpuffer (TBST)</u>		
TBS Puffer 10x	1x	100 ml
Tween 20	0.1%	0.5 ml
dest. H₂O		auf 1l
<u>Blockierlösung</u>		
Milchpulver	5%	2,5 g
TBST 1x	1x	50 ml
<u>Protein Stripping Lösung</u>		
Glycin	1.5%	15 g
SDS 10% Lösung	0.1%	1 ml
Tween 20	1%	1 ml
dest. H₂O		auf 100 ml
*pH 2 mit HCl einstellen		

Tabelle 2.4: Lösungen für Immuncytochemie

Lösungen für Immuncytochemie	Endkonz.	Menge
<u>Fixierlösung</u>		
Formaldehyd	4%	5,4 ml
dest. H₂O		auf 50 ml
<u>Permeabilisierlösung</u>		
Triton X100	0,5%	0,25 ml
PBS		auf 50 ml
<u>Blockierlösung</u>		
BSA	1%	0,5 g
PBS		auf 50 ml

Tabelle 2.5: Puffer und Lösungen für SA-β-Galaktosidase Assay

Puffer und Lösungen für SA-β-Galaktosidase Assay	Endkonz.	Menge
<u>Citrat-/ Phosphatpuffer</u>		

Na₂HPO₄	200 mM	63,15 ml
C₆H₈O₇ x H₂O	100 nM	36,85 ml
*pH 6 einstellen		
Fixativ		
Formaldehyd 37%	2%	2,7 ml
Glutaraldehyd	0,2%	0,4 ml
PBS		auf 50 ml
X-Gal Färbelösung		
NaCl	150 mM	1,5 ml
MgCl₂	2 mM	0,1 ml
K₃Fe(CN)₆	5 mM	2,5 ml
K₄Fe(CN)₆	5 mM	2,5 ml
X-Gal	1 mg/ml	1,25 ml
Citrat-/ Posphatpuffer		auf 50 ml

Tabelle 2.6: Lösung für Zellzyklus-Analysen

Lösung für Zellzyklus-Analyse	Enkonz.	Menge
<u>Nicolettipuffer</u>		
Triton X100	0,1%	0,1 ml
C₆H₅Na₃O₇	0,1%	29,4 g
Propidiumiodid	50 µg/ml	2,5 ml
dest. H₂O		auf 100 ml

Die Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische und Zellkultur-Experimente wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner und Sarstedt erworben.

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.7: primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
<u>Primärantikörper</u>		
PITX2 (C-16) (sc-8748)	WB 1:200 ICC 1:50	Santa Cruz
AR (N-20) (sc-816)	WB 1:1000 ICC 1:50	Santa Cruz
P21 (C-19) (sc-397)	WB 1:400	Santa Cruz
P27 (F-8) (sc-1641)	WB 1:400	Santa Cruz
α-Tubulin (ab-4047)	WB 1:100000	Abcam
<u>Sekundärantikörper</u>		
Rabbit anti-Goat IgG HRP (P0160)	WB 1:10000	Dako
Goat anti-mouse IgG HRP (sc-2005)	WB 1:10000	Santa Cruz
Goat anti-rabbit IgG HRP (sc-2004)	WB 1:10000	Santa Cruz

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A11008)	ICC 1:500	Invitrogen
Alexa Fluor 488 rabbit anti-goat IgG (A11078)	ICC 1:500	Invitrogen
Rhodamin Phalloidin (PHDR1)	ICC 1:1000	Cytoskeleton

2.1.6 Oligonukleotid-Primer

DNA Sequenzen, Anlagerungs-Temperatur, Produktgrößen und die benutzte Software um die Primer zu entwerfen, die in PCR, qRT-PCR und Pyrosequenzierung eingesetzt wurden, sind in der nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 2.8: Primer für Endpunkt und qRT-PCR

GEN (Transkript)		DNA Sequenz	Ann.T. [°C]	Produkt [bp]	Design
<u>Amplifizierungs- primer</u>					
<i>PITX2</i> Iso ab	Fw	CCCGGATCCATGGAGACCAACTGC CGCAA	81,0	816/ 954	PyroMark
<i>PITX2</i> Iso ab 2HS	Fw	CCCGGATCCTGGAGACCAACTGCC GCAAAC	80,1	816/ 954	PyroMark
<i>PITX2</i> Iso c	Fw	CCCGGATCCATGAACTGCATGAAA GGCCC	78,2	975	PyroMark
<i>PITX2</i> Iso abc	Rv	CCCGCGGCCGCTCACACGGGCCGG TCCACT	89,5		PyroMark
<i>PITX2 Ex12</i>	Fw	CCTGCAGTCCTCTCAGGC	58,0	146	PyroMark
	Rv	CGGCAGTTGGTCTCCATT	58,0		
<i>PITX2 Ex56</i>	Fw	CGGCAGCGGACTCACTTTAC	61,7	178	PyroMark
	Rv	TGCGCTCCCTCTTTCTCCAT	63,0		
<i>PITX1</i>	Fw	CCAGCGAGTCGTCTGACA	57,9	152	PyroMark
	Rv	TGTGAAGTGCGTACGTTGC	57,8		
<i>TBP</i>	Fw	ACAACAGCCTGCCACCTTA	57,7	120	PyroMark
	Rv	GAATAGGCTGTGGGGTCACT	57,5		
<i>AR</i>	Fw	GCCCATGACTATTACTTTCC	54,0	86	PyroMark
	Rv	ATGTGAGAGCTCCATAGTGAC	52,7		
<i>BMP2</i>	Fw	AGACCACCGGTTGGAGAG	56,9	106	PyroMark
	Rv	CCGGGTTGTTTTCCCACTC	61,1		
<i>IRS1</i>	Fw	AGTGAGGATTTAAGCGCCTAT	55,8	113	PyroMark
	Rv	GATTTGCTGAGGTCATTTAGG	55,0		
<i>CDKN2B</i>	Fw	GCGGGGACTAGTGGATAAGG	59,4	79	PyroMark
	Rv	GCCTCCGCAAACGGTTGA	64,0		

GEN (Transkript)		DNA Sequenz	Ann.T. [°C]	Produkt [bp]	Design
CDKN1B	Fw	AGGCGGAGCACCCCAAGC	66,7	113	PyroMark
	Rv	CTGGCTCGCCTCTTCCATG	62,8		
CDKN1A	Fw	GGAAGACCATGTGGACCTGT	58,2	146	PyroMark
	Rv	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	58,6		
SMAD3	Fw	AAGGCTGGGGAGCGGAGTA	62,9	58	PyroMark
	Rv	TCAATCCAGCAGGGGGTAC	59,3		
SOX2	Fw	GCGCATGGACAGTTACGC	59,8	150	PyroMark
	Rv	AGGGCGCTCACGTCGTAG	61,0		
PDLIM1	Fw	TGGCTGCGTCGATTGGAAAT	64,5	91	PyroMark
	Rv	CGGTCCCGCAGCTTCACAA	66,4		
KRT6A	Fw	CACTAAAGTGCCTCTGCTAG	52,5	186	PyroMark
	Rv	TGGGTGCTCAGATGGTATAG	54,6		
GADD45A	Fw	TTTTTGCCGGGAAAGTCGCT	64,7	77	PyroMark
	Rv	CATTCAGATGCCATCACCG	59,4		
CTNN1B	Fw	GTGCTGAAGGTGCTATCTG	52,7	127	PyroMark
	Rv	GAGTCAAAGACAGTTCTG	48,6		

Tabelle 2.9: PITX2 Assays für Pyrosequenzierung

Assay	DNA Sequenz	Produkt [bp]	Design
Hs_PITX2_01_PM	Sequence to Analyze CGAGAGGAAAACAGGGACAGAGGTCCGGCGGC	160	Qiagen PM00019418
	Sequence to Analyze Bisulfite Converted YGAGAGGAAAATAGGGATAGAGGTYGGYGGT		
	Anzahl CPGs 3		
Hs_PITX2_03_PM	Sequence to Analyze GCGGGGCACTTAGGAGCCAACCGAGGAGCAGGA GCACGGA	144	Qiagen PM00113218
	Sequence to Analyze Bisulfite Converted GYGGGGTATTTAGGAGTTAATYGAGGAGTAGGA GTAYGGA		
	Anzahl CPGs 3		
Hs_PITX2_04_PM	Sequence to Analyze SGGCCGAAGAGTCGGGAGCCGGAGCCGGGAGA GCCGA	147	Qiagen PM00113225
	Sequence to Analyze Bisulfite Converted BGGTYGAAGAGTYGGGAGTYGGAGTYGGGAGAG YGA		
	Anzahl CPGs 5		

2.1.7 Bakterienstämme

Kompetente *E.coli* One Shot TOP10 Zellen (Invitrogen) oder ultrakompetente XL-2 *Blue* Zellen (Stratagene) wurden für Klonierungsexperimente mit Plasmiden transformiert. Bakterienstocks mit darin enthaltenen Expressionsplasmiden wurden zur Plasmid-Isolation und zur Langzeitlagerung angefertigt. Die Richtigkeit der Sequenzen wurde durch Sanger-Sequenzierung bestätigt.

2.1.8 Plasmide

Tabelle 2.10: Plasmide

Plasmid	Promoter	Insert	Resistenzen (Bakterien/Zellen)
<u>T-REx System</u>			
pcDNA 4/TO	CMV, 2xTetO ₂	Kein Insert	Ampicillin/ Zeocin
pcDNA 4/TO/ <i>lacZ</i> [<i>lacZ</i>]	CMV, 2xTetO ₂	β-Galactosidase	Ampicillin/ Zeocin
pcDNA 6/TR	CMV, Rabbit β-globin intron II	TetR	Ampicillin/ Blasticidin
<u>PITX2-Expressions-Vektoren</u>			
pcDNA4/TO.PITX2a [PITX2a]	CMV, 2xTetO ₂	PITX2 cDNA Isoform 1, Übereinstimmung mit Transkript Variante PITX2-002 (ENST00000355080) (ensembl)	Ampicillin/ Zeocin
pcDNA4/TO.PITX2c [PITX2c]	CMV, 2xTetO ₂	PITX2 cDNA Isoform 3, Übereinstimmung mit Transkript Variante PITX2-005 (ENST00000306732) (ensembl)	Ampicillin/ Zeocin
<u>Luciferase Reporter Plasmide</u>			
pGL3-Basic Vektor	Kein Promotor	Luciferase	Ampicillin
p850 Vektor	LINE-1 konstitutiv	Luciferase	Ampicillin
pARE-Luc	Androgen Responsive Elemente	Luciferase	Ampicillin
pMMTV-Luc	4 GREs Glukokortikoid Responsive Elemente	Luciferase	Ampicillin
pPSA61-Luc	6,1 kb PSA Fragment	Luciferase	Ampicillin
pPB-Luc	Ratten Probasin	Luciferase	Ampicillin

	Promoter (AR-Bindestelle)		
pGL4.31	Minimaler adenoviraler Promotor	Luciferase Bindestellen für GAL4 DNA Bindedomäne	Ampicillin Hygromycin
pBind iD	CMV SV40	Luciferase GAL4 Fusionsprotein Id Potein	Ampicillin
pAct MyoD	CMV SV40	VP16 Fusionsprotein MyoD Protein	Ampicillin Neomycin
pBind	CMV SV40	GAL4 Fusionsprotein Luciferase	Ampicillin
pAct	CMV SV40	VP16 Fusionsprotein	Ampicillin Neomycin
pwtAct	CMV SV40	VP16 Fusionsprotein AR Wildtyp	Ampicillin Neomycin
pAct.PITX2a	CMV SV40	VP16 Fusionsprotein PITX2a	Ampicillin Neomycin
pwtBind	CMV SV40	GAL4 Fusionsprotein Luciferase AR Wildtyp	Ampicillin
pBind.PITX2a	CMV SV40	GAL4 Fusionsprotein Luciferase PITX2a	Ampicillin
TOPflash	TK Minimal Promotor	3 Wildtyp TCF Bindestellen Luciferase	Ampicillin
FOPflash	TK Minimal Promotor	3 mutierte TCF Bindestellen Luciferase	Ampicillin
<u>Andere Plasmide</u>			
pSG5 AR	SV40	AR wt	Ampicillin
β-Catenin wt (pcDNA3.1/Zeo)	CMV	Humanes <i>CTNNB1</i>	Ampicillin Zeocin
β-Catenin mut (pcDNA3.1/Zeo)	CMV	Humanes <i>CTNNB1</i> Mutation an Position S33Y	Ampicillin Zeocin
pT109-Luc [157] (pXP2)	TK Minimal Promotor	Luciferase	Ampicillin

2.1.9 Geräte

Tabelle 2.11: Geräte

Geräte	Hersteller
5415D Zentrifuge	Eppendorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vortexer	Neolab
Avanti 30 Zentrifuge	Beckman Coulter
Allegra 25R Zentrifuge	Beckman Coulter
Schüttler	Neolab
Incubator Shaker Innova 4200	New Brunswick Scientific
Trio Thermoblock	Biometra

T3 Thermocycler	Biometra
Tube Roller	Benchmark
Mini-PROTEAN Tetra System	Biorad
Power Supply Power Pac 200	Biorad
Power Supply	Biometra
Nanodrop 2000	Nanodrop technologies
ABI Prism 7500 fast	Applied Biosystems
Gel Dokumentationssystem	Intas
ELISA Easy Reader EAR 400 AT	SLT Labinstruments Austria
MiniLumat LB 9506	EG&G Berthold
BD LSRFortessa Cell Analyzer	BD Biosciences
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen
PyroMark Q24 Pyrosequencer	Biotage
Curix 60 (Entwicklermaschine)	Agfa
CanoScan 4400F	Canon

2.1.10 Software und Datenbanken

Die genome browser Datenbanken UCSC (<http://genome.ucsc.edu/> Version GRCh37/hg19) und ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) wurden für verschiedene Analysen und als Referenzen für diverse Gene benutzt. Expressionsdatensätze wurden von der NCBI GEO Datenbank heruntergeladen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>). Mit Hilfe der String 9.1 Datenbank (<http://string-db.org/>) wurde ein eigenes Netzwerk von ausgewählten Genen erstellt. PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) wurde hauptsächlich für die Literaturrecherche benötigt. Zur Verwaltung der Literatur wurde das Thomson Reuters Endnote X5 Literaturprogramm verwendet. PyroMark Assay Design Version 2.0 (Qiagen) wurde zum Design von Primern genutzt. Die Pyrosequenzierdaten wurden mit der PyroMark Q24 Software (Qiagen) analysiert. Die 7500 Software Version 2.0.5 diente zur Programmierung und Auswertung der qRT-PCRs am ABI7500fast Gerät (Applied Biosystems). IBM/SPSS Version 20 und Excel 2010 wurden zur statistischen Analyse der Daten genutzt. Mit Hilfe von DAVID *Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) wurden die Microarray-Datensätze analysiert und ausgewertet. Für die Vorhersage von spezifischen Phosphorylierungsstellen in PITX2c wurde der *PhosphoMotif Finder* (http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder) und die KinasePhos 2.0 Software (<http://kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw>) genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur von Prostatakarzinom-Zelllinien

Alle invasiven Prostatakarzinom-Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank (Hereaus) kultiviert (siehe Abschnitt 2.1.2.1). Um die Prostatakarzinom-Zelllinien zu passagieren, wurden sie durch Zugabe von Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst und die Reaktion mit FCS-haltigem Medium nach 5 min abgestoppt. Die Zellen wurden in eiskaltem FCS mit DMSO (Verhältnis 9:1) über Nacht bei -70°C und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.2 RNA-Analyse

2.2.2.1 RNA-Isolation und reverse Transkriptase PCR

Totale RNA wurde aus subkonfluenten Zellkulturen mit dem RNA Mini Kit (Qiagen) isoliert, aufgereinigt und in 35 µl eluiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde am Nanodrop bestimmt. Die cDNA Synthese (2 µg) erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Darin enthalten ist ein zusätzlicher, vom Hersteller empfohlener DNase Verdau um die genomische DNA aus den Proben zu entfernen. Das finale Elutionsvolumen betrug 30 µl in Wasser. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert, die RNA bei -70°C.

2.2.2.2 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Die Genexpressionsanalysen wurden am ABI7500fast (Applied Biosystems) durchgeführt. Jeder 20 µl Reaktionsansatz bestand aus 1 µl cDNA Probe (1:10 verdünnt, entspricht etwa 7 ng cDNA), 1x QuantiTect SybrGreen PCR Mastermix (Qiagen) und 10 pmol Oligonukleotidprimern (Tabelle 2.8). Jede Probe wurde als Duplikat gemessen. Die selbsterstellten Primer (siehe Abschnitt 2.1.10) wurden von MWG Operon synthetisiert. Die PCR Bedingungen waren wie im folgenden Abschnitt beschrieben: Aktivierung der HotStar-Polymerase bei 95°C für 15 min, anschließend folgten 35 bis 40 Amplifizierungszyklen, die sich aus der Denaturierung bei 94°C für 15 s, Anlagerung bei der spezifischen Temperatur der Primer Sets für 20 s, die Extension bei 72°C für 30 s und eine finale Extension bei 72°C für 10 min zusammensetzte. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte durch einen Temperaturgradienten von 50°C bis 95°C mit einer Erhöhung der Temperatur um 0,2°C/sec. Die experimentelle Variation für die Quantität des PCR Produkts lag in jeder Probe unter 10%. Die relative Expression wurde durch eine Standardkurve oder durch die

Pfaffl-Methode bestimmt. Zur Normalisierung der mRNA Expression und zur Qualitätskontrolle der cDNA wurde das *housekeeping* Gen *TBP* mitgemessen.

2.2.3 Bisulfitumwandlung

Genomische DNA (1 µg) wurde mit Natrium Bisulfit behandelt um unmethylierte Cytosine zu Uracil zu konvertieren, dabei bleiben die methylierten Cytosine unverändert. Verwendet wurde das EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben. Das finale Elutionsvolumen betrug 20 – 25 µl.

2.2.4 Pyrosequenzierung

Semi-quantitative Messungen der Methylierung wurde an spezifischen CpG-Stellen in der PITX2 Sequenz mit drei fertigen PyroMark Assays (Qiagen) durchgeführt (Tabelle 2.9). Die Pyrosequenzierung wurde an einem Biotage PyroMark Q24 Gerät durchgeführt. Verwendet wurden PyroMark Gold Q24 Reagenzien (Qiagen). Die Daten wurden im Anschluss mit der PyroMark Q24 Version 2.0 Software analysiert.

Um die zu sequenzierenden PCR Produkte herzustellen, wurde die bisulfit-konvertierte DNA wie im folgenden Abschnitt beschrieben, amplifiziert. Jede der 50 µl PCR Reaktionen enthielt 1x *Coraload Concentrate* (enthält 1,5 mM MgCl₂), 10 µmol dNTPs, 20 pmol des jeweiligen Primerassays (Tabelle 2.9), 4 U HotStarTaq DNA Polymerase und 2,5 µl bisulfit-konvertierte DNA. Die PCR umfasste die Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 15 min, 45 Zyklen mit: Denaturierung bei 95°C für 30 sec, Anlagerung bei 55°C für 30 sec, Extension bei 72°C für 30 sec und eine finale Extension bei 72°C für 10 min. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 2% Agarosegel überprüft und für die Pyrosequenzierung vorbereitet.

Das biotinylierte PCR-Produkt (20 – 30 µl) wurde an 2 µl Streptavidin Beads (Amersham Biosciences) in 40 µl Binding Puffer, bei stetiger Bewegung für 15 min auf einem 96-Well-Schüttler, gebunden. Die DNA gebundenen Beads wurden anschließend in der PyroMark Q24 Vakuum Workstation angesaugt, in 70% Ethanol gewaschen, in 0,2 M NaOH denaturiert und in Waschpuffer (Qiagen) neutralisiert. Die Beads mit der gebundenen DNA wurden in die Wells einer 24-Well Pyrosequenzierplatte (Qiagen), die 0,33 mM Sequenzierprimer und 25 µl *Annealing* Puffer (Qiagen) enthält, gegeben. Das Gemisch wurde für 2 min bei 80°C denaturiert und anschließend für mindestens 15 min

heruntergekühlt. In der Zwischenzeit wurde der Sequenzierensatz mit Substrat, Enzym und dNTPs (Qiagen) beladen. Die Auswertung erfolgte anhand des Mittelwertes der Methylierung für jeden einzelnen Assay.

2.2.5 Standard Endpunkt-PCR

Die Amplifizierung der cDNA wurde mit den Enzymen und Reagenzien des HotStarTaq DNA Polymerase Kits (Qiagen) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl und enthielt 1x PCR Puffer, 5-10 pmol je Oligonukleotid-Primer, 5 nmol dNTPs, 1 U Taq Polymerase, Wasser und 2 µl cDNA (1:10 vorverdünnt). Die PCR Reaktionen wurden im Biometra Thermocycler mit dem folgenden PCR-Programm durchgeführt. Enzymaktivierung bei 95°C für 15 min mit darauf folgenden 30-45 Zyklen bestehend aus: Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Anlagerung bei der angegebenen Temperatur für die jeweiligen Primer (Tabelle 2.8) für 30 sec, Extension bei 72°C für 30 sec und finale Extension bei 72°C für 10 min. Die PCR Produkte wurden zur weiteren Auswertung auf ein Agarose-Gel mit 6x DNA *Loading dye* (Thermo) und GeneRuler *Ladder Mix* (Thermo) aufgetragen.

2.2.6 Protein-Analyse

2.2.6.1 Proteinextraktion und Western Blot

Für die Ganzzellproteinextraktion wurden die Zellen in RIPA Puffer (Tabelle 2.3) auf Eis für 5-10 min lysiert und bei 15.000 g für 10 min zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Pierce BCA-Protein Assay Kit (Thermo) nach Herstellerangaben durchgeführt und bei 570 nm Absorption am ELISA Reader gemessen. 5 - 30 µg Protein (je nach Proteinlysate) wurden mit Lämmli Probenpuffer (Biorad) gemischt, bei 95°C für 5 min denaturiert und über eine SDS-Page im 10 – 12% Gelen in Mini-PROTEAN Tetra Cell Kammern (Biorad) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die separierten Proteine 75 min bei 180 mA auf eine PVDF Membran in Transferpuffer (Tabelle 2.3) geblottet. Die Membranen wurden in der Blockierlösung (Tabelle 2.3) für eine Stunde geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (Tabelle 2.7) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Membranen 3x 10 min mit Waschpuffer (Tabelle 2.3) gewaschen. Die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 2.7) wurde 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Detektion wurde das ECL advanced Kit (GE Healthcare) verwendet.

Chemilumineszenz wurde durch die Exposition der Blots auf fotosensitive Filme (Amersham Bioscience) detektiert. Als Kontrolle für die Verwendung von gleichmäßigen Proteinmengen wurde α -Tubulin (Tabelle 2.7) auf denselben Blots verwendet.

2.2.6.2 Immuncytochemie

Die Zellen wurden auf 30 mm Deckgläschen ausgesät und mit 4% Formaldehyd (Tabelle 2.4) für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurde mit 0,1% Triton X100 (Tabelle 2.4) für 30 min permeabilisiert und mit 1% BSA in 0.2% PBS-T für 30 min blockiert. Die Zellen wurden jeweils eine Stunde mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:50 (Tabelle 2.7) und dem Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 (Tabelle 2.7) inkubiert. Zwischen den Antikörper-Inkubationsschritten wurden die Deckgläschen 3x 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Orientierung wurde der Zellkern mit 1 μ g/ml DAPI bzw. das Aktincytoskelett mit Phalloidin gefärbt und das Präparat mit *Mounting* Medium (Dako) eingedeckelt. Die immuncytochemischen Färbungen wurden am Mikroskop Nikon Eclipse 400 mit dem Fluoreszenzfilter GFP (R)-LP/HQ-FITC-LP (Ex 400-500, DM 505, BA 510) und dem DAPI Filter angeregt und mit Hilfe der NIS-Elements Software ausgewertet. Die Bilder entstanden in 400x Vergrößerung mit einem PlanFluor Objektiv.

2.2.7 Plasmid-Transformation

Die Transformation von kompetenten *E.coli* One Shot TOP10 oder ultrakompetenten XL-2 *blue* Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die transformierten Bakterien wurden auf Agarplatten, die Difco Agar und 100 μ g/ml Ampicillin enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubator kultiviert.

2.2.8 Plasmid-DNA Isolation

Mini-Kulturen wurden aus Einzelklonen erstellt. Dafür wurden die Bakterien in LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C im Inkubator kultiviert. Maxi-Kulturen wurden aus frischen Mini-Kulturen erstellt und 1:500 in LB-Medium und 100 μ g/ml angesetzt und mindestens 12 h bei 37°C im Inkubator kultiviert. Bakterienstocks wurden mit frischen Maxi-Kulturen und 20% Glycerol erstellt und anschließend bei -70°C weggefroren. Der Rest der Maxi-Kulturen wird in die Plasmid Isolation eingesetzt.

Plasmid-DNA aus Mini-Kulturen wurde mit dem ZR Miniprep Classic Kit (Zymo) nach Angaben des Herstellers isoliert. Für die Maxi-Kulturen wurde das QIA Filter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die korrekte Insertion und Orientierung der integrierten DNA in den Plasmiden wurde durch spezifische Kontrollrestriktionen und Sequenzierung der Plasmide sichergestellt.

2.2.9 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdau-Ansätze wurden mit Restriktionsenzymen von Fermentas und New England Biolabs in den dazu gehörigen Reaktionspuffern durchgeführt (Tabelle 2.2). Für einen Reaktionsansatz wurde üblicherweise ein Volumen von 50 µl gewählt, 1x Reaktionspuffer und 10 U des Restriktionsenzym pro µg Plasmid DNA eingesetzt. Die Dauer und die Temperatur des Inkubationsansatzes sowie die Inaktivierungsbedingungen sind abhängig von den benutzten Enzymen. Der pcDNA 4/TO Vektor und das PITX2 Insert wurden vor der Ligation mit BamHI (*forward*) und NotI (*reverse*) geschnitten (Abschnitt 2.2.11)

2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese / Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Elektrophorese von PCR-Produkten oder geschnittenen und ungeschnittenen Plasmiden wurde ein 0,7 – 2% (in 1x TAE Puffer) Agarose-Gel, abhängig von der Fragmentgröße, benötigt. Die Gelelektrophorese wird bei 120 V in 1x TAE Puffer durchgeführt. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente wurden die Gele im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und am Geldokumentations-Gerät fotografiert. Die geschnittenen Fragmente (Abschnitt 2.2.9) wurden zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen und, falls nötig, mit dem NucleoSpin Extract II Gel Extraction Kit (Machery-Nagel) nach Herstellerangaben ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.2.11 Ligation

DNA Fragmente (Insert) und Vektoren wurden mit Hilfe des Enzyms T4 DNA Ligase bei Zugabe des T4 Reaktionspuffers über Nacht bei 16°C kloniert - standardmäßig in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor : Insert). Für die anschließende Transformation (Abschnitt 2.2.7) wurden immer frische Ligationsansätze verwendet.

2.2.12 Klonierung T-REx™ System

Das T-REx™ System (Invitrogen) enthält die Vektoren pcDNA4/TO, pcDNA4/TO/lacZ und pcDNA6/TR (Tabelle 2.10) um eine Tetracyclin-regulierte Expression von transfizierten Genen zu ermöglichen. Alle drei Vektoren enthalten einen starken CMV Promotor. Der Leervektor pcDNA4/TO enthält zusätzlich zwei Tetracyclin (Tet) Operator Stellen (2x TetO2) oberhalb der multiple cloning site (MCS), in welche das zu untersuchende Gen kloniert werden kann. Um in Säugetierzellen eine Selektion durchführen zu können, enthält der Vektor zusätzlich ein Zeocin-Resistenz-Gen. Der Kontrollvektor pcDNA4/TO/lacZ enthält das LacZ Gen, welches für β -Galaktosidase kodiert. Der pcDNA6/TR Vektor kodiert für das Tet-Repressor (TR) Protein und enthält für die Selektion in Säugetierzellen ein Blasticidin-Resistenz-Gen. Der TR blockiert in Abwesenheit von Tetracyclin die Expression des Gens, welches in den pcDNA4/TO Vektor kloniert wurde. Zugabe von Tetracyclin verhindert diese Repression und das zu untersuchende Gen kann transkribiert werden. Dieser Ablauf wird als induzierbares System bezeichnet. Die Zelllinien PC36TR und 22Rv16TR, welche den Tet-Repressor stabil exprimieren, wurden in unserem Labor hergestellt. Der pcDNA4/TO Vektor kann durch die Zeocin-Resistenz auch außerhalb des induzierbaren Systems für transiente und stabile Transfektionen genutzt werden.

2.2.12.1 Klonierung PITX2-Isoformen

Die PITX2-Isoformen a und c wurden durch eine PCR mit spezifischen Primern (Tabelle 2.8), die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und NotI enthielten, aus cDNA der Zelllinie 22Rv1 amplifiziert. Im Anschluss wurden die Amplifikate und der pcDNA4/TO Vektor mit den Restriktionsenzymen geschnitten (Abschnitt 2.2.9), auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgereinigt (Abschnitt 2.2.10). Die Ligation erfolgte wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben. Die Sequenz der pcDNA4/TO PITX2a und pcDNA4/TO PITX2c Plasmide wurde durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.2.13 Funktionelle Versuche

2.2.13.1 Transiente und stabil induzierbare Expression von PITX2-Expressionsplasmiden

Die Zelllinien LNCaP, 22Rv1 und PC3 wurden, bei einer Konfluenz von 70 – 80%, in 6-Loch Platten mit 1 μ g Plasmid transfiziert. Dafür wurde das X-treme GENE 9 DNA Transfektionsreagenz (Roche) in einem Verhältnis von 3:1 (Reagenz: DNA) nach

Herstellerangaben verwendet. Untransfizierte Zellen und mit dem Leervektor pcDNA4/TO transfizierte Zellen wurden immer als Kontrolle mitgeführt. Für die transiente Transfektion wurden die Zellen nach 24 – 72 h geerntet und für unterschiedliche Versuche verwendet. Eine transiente Transfektion wurde auch mit diversen anderen Expressionsplasmiden und Reporterkonstrukten in den folgenden Abschnitten durchgeführt.

Um stabil transfizierte und induzierbare Klone herzustellen (22Rv16TR und PC36TR mit pcDNA4/TO PITX2a transfiziert) wurden die transfizierten Zellen nach 48 h in 10 cm Kulturplatten, in einem Verhältnis von 1:2 - 1:3, umgesetzt und mit dem Selektionsantibiotikum Zeocin für 2 - 4 Wochen kultiviert, bis die nicht transfizierten Zellen starben. Im Anschluss wurde geerntet oder gefärbt. Die Zelllinie LNCaP wurde mit 600 µg/ml, 22Rv1 mit 800 µg/ml und PC3 mit 150 µg/ml Zeocin selektiert. Zusätzlich enthielt das Selektionsmedium auch Blasticidin, damit für den pcDNA6/TR Vektor ebenfalls ein Selektionsdruck vorhanden war. Um Einzelkolonien zu isolieren, wurden kleine Filterpapierstücke mit Trypsin getränkt, vorsichtig auf den Einzelkolonien platziert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde jedes einzelne Filterpapier in eine Kammer einer 24-Loch Platte mit Selektivmedium transferiert. Nach und nach wurden die ausgewählten Zellklone expandiert und in größere Platten umgesetzt, um genug Zellen für die Analysen zu erhalten. Jeder der einzelnen stabilen Zellklone wurde durch qRT-PCR mit Primern für PITX2 und mittels Western Blot auf die induzierbare Expression von PITX2a überprüft. Dafür wurde jeder Klon im induzierten (Behandlung für 24 h mit 1 µg/ml Tetracyclin) und nichtinduzierten Zustand analysiert. Die meisten der stabilen Klone, in 22Rv1 wie auch PC3, zeigten eine induzierbare Expression von PITX2a. In der Zelllinie 22Rv1 wurden die induzierbaren Klone B1, B21 und C11 ausgewählt, in der Zelllinie PC3 die Zellklone A5, A12 und A14.

2.2.13.2 Behandlung mit Tetracyclin

Zellen wurden über 24 - 96 h mit 1 µg/ml Tetracyclin (Sigma) in 6-Loch Platten behandelt. Dabei wurde alle 24 h frisches Medium mit Tetracyclin zugegeben.

2.2.13.3 Behandlung mit siRNA

Als Positivkontrolle für den sauren β -Galaktosidase-Assay (Abschnitt 2.2.13.10) wurden Zellen mit 10 nM Snail siRNA [158] für 48 h transfiziert. Dafür wurde das Lipofectamine RNAiMAX Transfektionsreagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.13.4 Behandlung mit DNA Methylierungs- und HDAC-Inhibitoren

Zellen wurden mit 2 μ M DNA-Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-Desoxyazacytidin (Aza) (Sigma) für 72 h behandelt, dabei wurde alle 24 h frisches Medium mit Aza zugegeben. Der HDAC-Inhibitor SAHA (Suberoylanilid Hydroxamsäure / Vorinostat) (Cayman Chem. Company) wurde in einer Konzentration von 2,5 μ M für die letzten 24 h der Zellkultivierung hinzugegeben. Die Behandlungen wurden einzeln und in Kombination durchgeführt. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst.

2.2.13.5 Behandlung mit CK2- und GSK3-Inhibitoren

Zuvor mit 1 μ g PITX2c für 24 h transient transfizierte Zellen (Abschnitt 2.2.13.1) wurden für 4 h, 8 h und 24 h mit 20 μ M CK2 Inhibitor V, Quinalizarin (Calbiochem) und 20 μ M GSK3 XIII Inhibitor (Calbiochem) behandelt.

2.2.13.6 Behandlung mit synthetischem Androgen

Zellen wurden für 48 h mit 10 nM synthetischem Androgen R1881 (Sigma) in 6-Loch Platten behandelt.

2.2.13.7 Klonogenitätsassay

LNCaP, 22Rv1 und PC3 Zellen mit einer Konfluenz von 60 – 70% wurden mit 1 μ g PITX2a, PITX2a oder dem Leervektor pcDNA4/TO für 48 h in 6-Loch Platten in Duplikaten transfiziert. Nach den 48 h wurden die Zellen 1:2 in 10 cm Schalen aufgeteilt. Nach weiteren 24 h wurde mit der Zeocin-Selektion begonnen; dabei wurde regelmäßig frisches Selektionsmedium zu den Zellen gegeben. Die Zelllinie LNCaP wurde mit 600 μ g/ml, 22Rv1 mit 800 μ g/ml und PC3 mit 150 μ g/ml Zeocin für 2 - 4 Wochen behandelt, bis sich sichtbare Kolonien bildeten und anschließend mit Giemsa gefärbt (Abschnitt 2.2.13.8).

2.2.13.8 Giemsa Färbung

Die GIEMSA Färbung dient zur Visualisierung der Vermehrung und speziell der Klonogenität der Zellen. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen erst mit PBS, dann mit PBS/Methanol im Verhältnis 1:1 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit 100% Methanol fixiert. Das Methanol wurde abgesaugt und die Zellen mit GIEMSA Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) für 2 min inkubiert. Die GIEMSA Lösung wurde in mehreren Waschschritten entfernt, bis nur noch die gefärbten Zellen sichtbar waren. Die Färbung und die Koloniebildung wurden mit Hilfe des CanoScan 4400F (Canon) dokumentiert.

2.2.13.9 Proliferationsassay

Die stabilen PITX2a Zellklone B1 und B21 (22Rv1) und A5 und A14 (PC3) wurden in 6-Loch Platten in einer definierten Zellmenge von 8×10^4 (22Rv1) und 6×10^4 (PC3) ausgesät. Nach 24 h wurde mit der Tetracyclin-Behandlung begonnen. Die Dauer der Behandlung betrug insgesamt 96 h (Abschnitt 2.2.13.2). Als Referenz diente die jeweilige Mutterzelllinie, sowie die nichtinduzierten PITX2a Zellklone. Alle 24 h wurden die Zellen in Duplikaten ausgezählt und am Ende des Versuches statistisch ausgewertet.

2.2.13.10 SA- β -Galaktosidase Assay

PITX2a Zellklone B1 und B21 (22Rv1) und A5 und A14 (PC3) wurden in 6-Loch Platten ausgesät und für 48 h mit Tetracyclin (Abschnitt 2.2.13.2) behandelt oder lagen unbehandelt vor. Zusätzlich wurden Zellen mit PITX2a und PITX2c transient für 48 h transfiziert (Abschnitt 2.2.13.1). Als Positivkontrolle lagen mit Snail siRNA transfizierte Zellen vor (Abschnitt 2.2.13.3). Als Negativkontrolle dienten die unbehandelten Mutterzelllinien 22Rv1 und PC3. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und im Anschluss 3 - 5 min bei RT mit Fixativ (Tabelle 2.5) fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die x-Gal Färbelösung (Tabelle 2.5) auf die Zellen gegeben und für 2 h bis über Nacht bei 37°C im Brutschrank (ohne CO₂) inkubiert, bis eine blaue Färbung der Zellen sichtbar war. Die Reaktion konnte durch Waschen mit PBS abgestoppt werden.

Durch die Hydrolyse des zugegebenen X-Gal durch das lysosomale Enzym β -Galaktosidase entsteht unter sauren Bedingungen (pH 6) ein blauer Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo), der als Nachweis für Seneszenz in Zellen dient.

2.2.13.11 Analyse des Zellzyklus

Für die Zelllinie PC3 (Zellklone A5 und A14) wurden 7×10^4 Zellen/Kammer und für die 22Rv1 (Zellklone B1 und B21) $8,5 \times 10^4$ Zellen/Kammer in 6-Loch Platten ausgesät. Die 22Rv1 Zellen wurden 96 h und die PC3 Zellen 48 h mit Tetracyclin behandelt (Abschnitt 2.2.13.3). Als Referenz diente die jeweilige Mutterzelllinie, sowie die unbehandelten Zellklone. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und für 5 min mit Trypsin behandelt um die Zellen zu lösen. Das Medium, sowie das zum Waschen verwendete PBS, wurde zusammen mit den in Trypsin gelösten Zellen in Polystyren-Reagenzgläser mit Rundboden (BD Biosciences) überführt, 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, erneut 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 250 μ l Nicoletti-Puffer (Tabelle 2.6) aufgenommen und sorgfältig gevortext. Die Zellen wurden auf Eis und dunkel bis zur Messung am BD LSRFortessa *cell analyzer* (BD Biosciences) gelagert. Die Zellzyklus-Analyse erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Auswertung der Messungen wurde mit der FACSDiva Software Version 6.2 erstellt und im Anschluss statistisch ausgewertet.

2.2.13.12 Luciferase Reporter-Assay

Durch den Luciferase Reporter-Assay kann der Einfluss von PITX2 auf die Aktivierung von androgenabhängigen Reporterkonstrukten gemessen werden. Dafür wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion mit einer Menge von 7×10^4 Zellen/Kammer für die PC3 und $8,5 \times 10^4$ Zellen/Kammer für die 22Rv1 in Triplikaten in 6-Loch Platten ausgesät und am Folgetag mit verschiedenen Konstrukten unter Verwendung des X-treme GENE 9 DNA Transfektionsreagenz (Roche) in einem Verhältnis von 3:1 (Reagenz: DNA) nach Herstellerangaben transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 350 μ l PLB (Passive Lysis Buffer; Promega) lysiert und die Reporteraktivität mit dem Dual-Luciferase Reporter-Assay System (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers im MiniLumat LB 9506 (EG&G Berthold) als RLU (relative light units) für 5 s gemessen und im Anschluss statistisch ausgewertet.

Die verwendeten Luciferase Reporterkonstrukte wurden freundlicherweise von PD Mag. Dr. rer. nat. Marcus V. Cronauer aus der Arbeitsgruppe für molekulare Endokrinologie der Universitätsklinik für Urologie in Ulm zur Verfügung gestellt.

Für die Experimente wurden 200 ng/Kammer der Reporterkonstrukte ARE-Luc, PB-Luc, MMTV-Luc und PSA61-Luc (Tabelle 2.10) transfiziert. Das PB-Luc Plasmid enthält einen Teil des Ratten-Probasin Promotors. PSA61-Luc enthält ein 6,1 kb großes Fragment des PSA-Promotors. Im MMTV-Luc Reporterkonstrukt liegen vier verschiedene glukokortikoidresponsibile Elemente (GREs) vor, die auch auf andere Steroidhormonrezeptoren ansprechen. Das ARE-Luc Konstrukt enthält ausschließlich mehrere AREs zusammen mit einem minimalen Promotor. Es wurden in verschiedenen Kombinationsansätzen bei insgesamt 400 ng/Kammer die Expressionsplasmide für AR und PITX2a (Tabelle 2.10) mit den Reporterkonstrukten ko-transfiziert. Alle Ansätze wurden in der Zelllinie PC3 mit R1881 behandelt (Abschnitt 2.2.13.6). R1881 wurde dem Medium am Tag der Transfektion zugegeben. In der Zelllinie 22Rv1 lagen alle Transfektionsansätze mit und ohne Behandlung von R1881 vor. P850-Luc diente als Positivkontrolle (Tabelle 2.10).

2.2.13.13 Two Hybrid Luciferase Reporter-Assay

Der Two Hybrid Luciferase Reporter-Assay ermöglicht den Nachweis einer direkten Protein-Protein Interaktion in Zelllinien, unter Verwendung der DNA-Bindedomäne des Hefeproteins GAL4 und der Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16. In diesem Experiment wurden der AR und PITX2a jeweils mit der DNA-Bindedomäne (pBind) und der Aktivierungsdomäne (pAct) fusioniert. Die Fusionskonstrukte werden mit einem Reporterplasmid transfiziert, das GAL4 Bindestellen enthält, welche die Expression des Luciferase-Gens kontrollieren. Wenn die Proteine des AR und von PITX2 miteinander interagieren, sollten GAL4 DNA-Bindedomäne und VP16-Aktivierungsdomäne einen funktionellen Transkriptionsaktivator bilden, welcher durch die Expression des Luciferase Reportergens detektiert werden kann.

Die verwendeten Luciferase Reporterkonstrukte und die Kontrollvektoren wurden freundlicherweise von PD Mag. Dr. rer. nat. Marcus V. Cronauer aus der Arbeitsgruppe für molekulare Endokrinologie der Universitätsklinik für Urologie in Ulm zur Verfügung gestellt.

Dafür wurden 250 ng je Plasmid/Kammer in Duplikaten, wie im oberen Abschnitt 2.2.13.12 beschrieben, in die Zelllinie PC3 transfiziert, gemessen und ausgewertet. Die verwendeten Konstrukte wtAct, pBind/PITX2a, wtBind, pAct/PITX2a, pAct und pBind (Tabelle 2.10) wurden 1:1 mit dem pGL4.31 Luciferase Reporterkonstrukt (Tabelle 2.10)

transfiziert. Die Kombinationstransfektion aus piD und pMyoD (Tabelle 2.10) diene als Positivkontrolle.

2.2.13.14 TOPflash/FOPflash Luciferase Reporter Assay

Durch die Verwendung des TOPflash/FOPflash Luciferase Reporter-Assays kann die Aktivität des TCF/ β -Catenin Signalwegs bestimmt werden. Das TOPflash Konstrukt enthält 3 wildtypische TCF Bindestellen (Tabelle 2.10) oberhalb eines Thymidin Kinase (TK) Minimalpromotors, welche bei Aktivierung des Signalwegs durch die Ko-Transfektion von mutiertem β -Catenin zur Transkription des Reportergens führen. Die Negativkontrolle FOPflash enthält drei mutierte TCF Bindestellen (Tabelle 2.10).

Für den Reporter-Assay wurden 500 ng TOPflash oder FOPflash pro Kammer in Triplikaten, wie im oberen Abschnitt 2.2.13.12 beschrieben, in die Zelllinie PC3 transfiziert, gemessen und ausgewertet. Dabei wurden je 500 ng der Expressionsplasmide für PITX2a, β -Catenin wt oder β -Catenin mut (Tabelle 2.10) alleine oder in Kombination ko-transfiziert. P850-Luc diene als Positivkontrolle (Tabelle 2.10).

2.2.13.15 Microarray

Die Analyse und die statistische Auswertung der Microarrays wurden freundlicherweise im Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die Qualität der RNA-Präparationen der PC3 Mutterzelllinie und der Zellklone A5, A14, sowie der 22Rv1 Mutterzelllinie und der Zellklone B1 und B21 wurden mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers nach dem Protokoll des Herstellers geprüft. Alle Proben zeigten eine sehr gute und vergleichbare RNA-Qualität (RNA *Integrity Number* - RIN 10). Die RNA wurde durch eine photometrische Messung am Nanodrop quantifiziert.

Die cDNA-Synthese und die anschließende Biotin-Markierung der aRNA wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (3' IVT Express Kit; Affymetrix, Inc.): 100 ng der RNA wurden zu cDNA konvertiert, während der anschließenden *in vitro* Transkription wurde die entstehende aRNA mit Biotin markiert. Nach der Fragmentierung wurde die markierte aRNA auf Affymetrix PrimeViewTM Human Gene Expression Microarrays nach dem Protokoll des Herstellers für 16 h bei 45°C hybridisiert, mit Streptavidin /Phycoerythrin gefärbt und gescannt. Die Daten Analyse der Affymetrix CEL Dateien

wurde mit Hilfe der GeneSpring GX Software (Version 12.5; Agilent Technologies) durchgeführt.

Die Roh-Signalintensitäten der einzelnen *Probes* der Affymetrix *Probesets* wurden über alle Arrays quantil-normalisiert und anschließend mit dem *Robust-Multi-array-Average* (RMA)-Algorithmus zu einem normalisierten *Probeset*-Signal aufsummiert. Abschließend wurde die Signalintensitäten jedes *Probesets* eines jeden Arrays durch den Median der betreffenden Signalintensitäten aller Arrays geteilt (*Baseline-Transformation*).

Nachdem die einzelnen Replikate ihren jeweiligen experimentellen Konditionen zugeordnet worden waren, wurden nicht exprimierte Transkripte wie folgt von der weiteren Analyse ausgeschlossen: Die Signalintensität eines gegebenen *Probesets* musste sich bei mindestens drei der vier Replikate in mindestens einer der beiden (oder beiden) zu vergleichenden Konditionen innerhalb der oberen 80% der Signalverteilung des jeweiligen Arrays befinden.

Signifikant differentiell exprimierte Transkripte wurden mit einem ungepaarten t-Test ermittelt, die resultierenden p-Werte wurden anschließend gegen multiples Testen korrigiert (Benjamini-Hochberg FDR). Als Signifikanzschwelle wurde $p_{(corr)} < 0.01$ gewählt.

Aus den Daten wurden drei Excel Arbeitsmappen erstellt. Sie enthielten die in induzierten Proben gegenüber den nichtinduzierten Proben differentiell veränderten Gene der Zelllinie 22Rv1, der Zelllinie PC3 bzw. die Gene, die in beiden Zelllinien gleichermaßen differentiell exprimiert wurden („*Match*“). Innerhalb der 22Rv1 und PC3 Arbeitsmappen wurde in der Analyse noch einmal zwischen induzierten Proben gegenüber nichtinduzierten Proben und nichtinduzierten Proben gegenüber der Mutterzelllinie unterschieden. In den so erstellten Excel-Dateien wurden mehrfach vorhandene Identifier eines Gens entfernt und die Daten nach *Fold-Change* Werten sortiert. Um die Menge an Daten einzugrenzen, wurden die Gene, die einen *Fold-Change* Wert $< 1,50$ zeigten, in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. Mit Hilfe der DAVID *Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis* Plattform wurden die einzelnen Genlisten hinsichtlich ihrer molekularen Funktion, ihrer biologischen Prozesse und ihrer Signalweg-Zugehörigkeit analysiert und ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von PITX2 in Zelllinien und Gewebe

Mittels quantitativer Realtime PCR (qRT-PCR) wurde das PITX2-mRNA Expressionsprofil in verschiedenen Zelllinien sowie in Prostatakarzinom- und benignen Geweben überprüft. Die verwendeten Assays erfassten entweder alle Isoformen, also PITX2a, PITX2b und PITX2c (Assay PITX2 Ex 56) oder nur die Transkripte PITX2a und PITX2b (Assay PITX2 Ex 12).

Für das Expressionsprofil wurden insgesamt vier androgenabhängige (22Rv1, MDA PCa2b, VCaP, LNCaP) und zwei androgenunabhängige (PC3, DU145) Prostatakarzinom-Zelllinien ausgewählt. Als Normalkontrollen dienten vier Zelllinien aus gutartigen Prostatageweben (PrEC09, PrEC06, PNT2 und BPH1). Die Transkripte PITX2a und PITX2b waren in der Tumorzelllinie 22Rv1 und in deutlich geringerem Ausmaß auch in PC3 und DU145 exprimiert. Bei allen Normalkontrollen zeigte sich nur eine schwache Expression von PITX2a und PITX2b. Eine Expression von PITX2c konnte in PC3 und DU145 nachgewiesen werden. Auch die benigne Zelllinie BPH1 zeigte eine deutliche Expression von PITX2c (Abbildung 3.1).

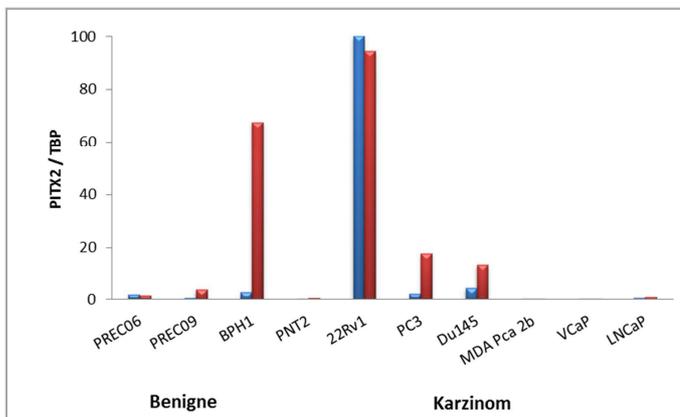


Abbildung 3.1: Vergleich der Expression der Transkripte PITX2a und PITX2b (PITX2 Ex 12: blau) mit der Expression aller PITX2 Transkripte (PITX2 Ex 56 = PITX2a, PITX2b und PITX2c: rot) mittels qRT-PCR. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Der Mittelwert wurde zugelassen, wenn weniger als 10% Abweichung vorlagen.

Die Karzinomgewebe zeigten eine signifikant erniedrigte Expression, gegenüber den benignen Prostatageweben, in denen die Expression deutlich nachweisbar war (Abbildung 3.2). Hierfür wurde ebenfalls der Assay PITX2 Ex 56 verwendet, der alle drei PITX2 Transkripte erfasst.

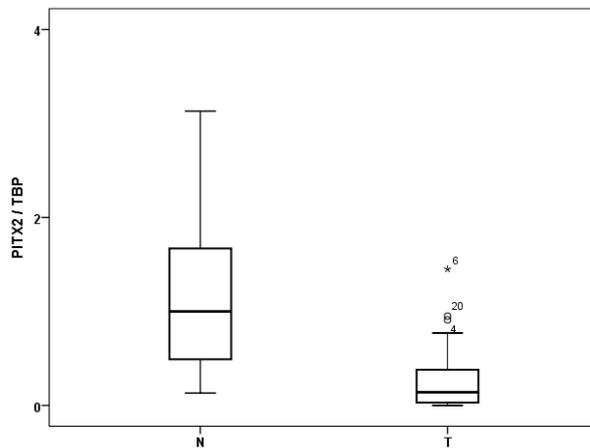


Abbildung 3.2: Vergleich des PITX2 mRNA Expressionsprofils in Prostatakarzinomen ($n=45$) und Prostata-Normalgeweben ($n=13$). T = Prostatakarzinomgewebe. N= Prostatanormalgewebe. Für die Expressionsanalyse wurde der Assay verwendet, der alle PITX2 Transkripte beinhaltet (PITX2 Ex 56). Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,0001$.

Neben den Analysen auf der mRNA-Ebene wurde mittels eines Western Blots der Expressionsstatus von PITX2 auf der Proteinebene untersucht. Da im Kontext der Fragestellung auch die Expression des AR eine zentrale Rolle spielt, wurde auch dessen Expression überprüft. Dafür wurde das gleiche Zelllinien-Set wie für die PITX2 mRNA Analysen gewählt, zudem vier Gewebepaare, bestehend aus Tumor- und Normalgeweben der Prostata.

In den Zelllinien zeigte sich keine Expression von PITX2; lediglich in der Zelllinie 22Rv1 ließ sich eine geringe Expression auf der Höhe der vorhergesagten 30 kDa (siehe Positivkontrolle, Abbildung 3.3) erkennen. Die Expression des AR war in den Karzinomzelllinien VCaP, MDA PCa 2b, LNCaP und 22Rv1 deutlich in Höhe von 110 kDa nachzuweisen. Auch die bekannten Spleißvarianten des AR in 22Rv1 und VCaP waren detektierbar (Abbildung 3.3 A). Sowohl in den zwei androgenunabhängigen Prostatakarzinom-Zelllinien als auch in den benignen Zelllinien BPH1 und PNT2 wurde erwartungsgemäß keine Expression des AR detektiert (Abbildung 3.3 A).

In den Gewebepaaren lag die Expression von PITX2 auf Proteinebene unter der Nachweisgrenze. Der AR war in allen Gewebeproben, Tumor wie Normal, nachzuweisen, die Expressionsstärke des AR zeigte keinen Zusammenhang mit dem Gewebestatus (Abbildung 3.3 B).

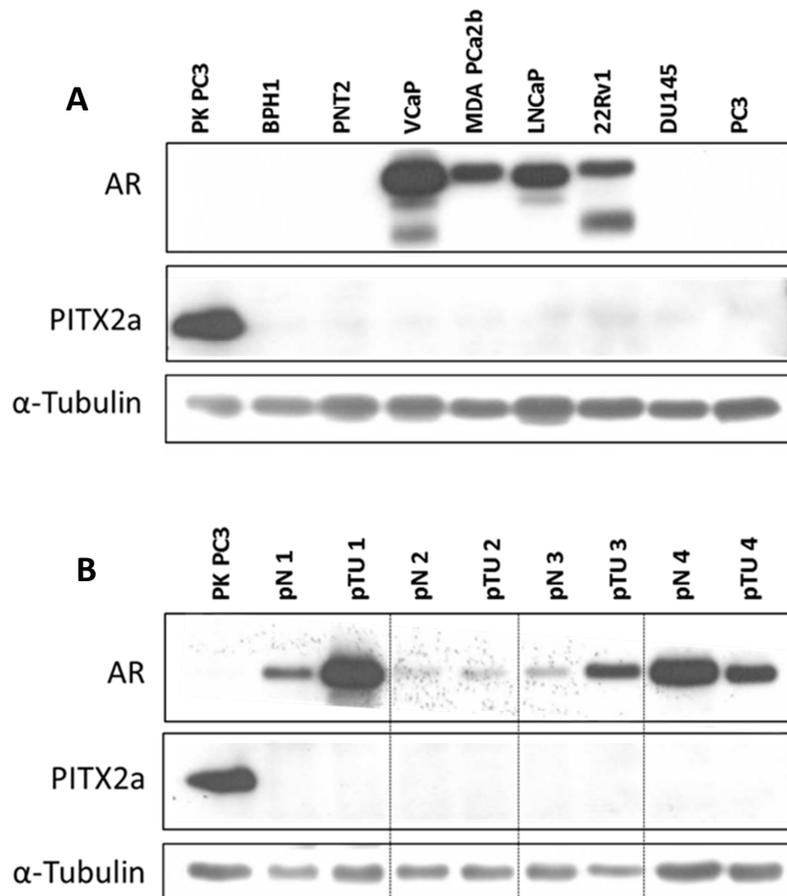


Abbildung 3.3: Expressionsstatus von PITX2 und AR in benignen und Karzinomzelllinien (**A**) und in vier verschiedenen Gewebepaaren (**B**) auf Proteinebene. **pN**: Normalgewebe der Prostata. **pTU**: Tumorgewebe der Prostata. **PK**: Positivkontrolle, PC3 Zelllinie transient mit PITX2a transfiziert. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

3.2 Methylierung von PITX2

Der Methylierungsstatus des PITX2 Gens wurde in den verschiedenen Zelllinien untersucht (s. Abschnitt 3.1). Hierzu wurden drei verschiedene Pyrosequenzierungs-Assays der Firma Qiagen verwendet, die auf drei verschiedene Positionen im Gen zielen, Assay 1 auf CpG-Stellen im 5'-Bereich zwischen Exon 1 und 2, Assay 2 im Abschnitt zwischen Exon 4b und 5 und Assay 3 zwischen Exon 5 und 6. Assay 1 erfasst die Transkripte von PITX2a und PITX2b, Assay 2 das Transkript von PITX2c und Assay 3 alle drei PITX2-Transkripte (Abbildung 1.2).

Die Auswertung der Pyrosequenzierung ergab eine unterschiedliche Methylierung in den einzelnen Zelllinien und auch zwischen den einzelnen Assays. Die niedrigste Methylierung wurde in den benignen Zellen PrEC09, PrEC06 und PNT2 beobachtet. BPH1 (70%), 22Rv1 (90%) und LNCaP (80%) zeigten die höchste Methylierung im Bereich des Assays 1. In PC3 (85 – 95%) und VCaP (65 – 85%) war eine starke Methylierung im Bereich der Assays 2 und 3 vorhanden. Die Methylierung in DU145 und MDA PCa2b lag in allen drei Assays nur mäßig stark vor (Abbildung 3.4 A). Es bestand kein konsistenter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Methylierungsassays und der Genexpression der einzelnen Zelllinien (Abbildung 3.4 B).

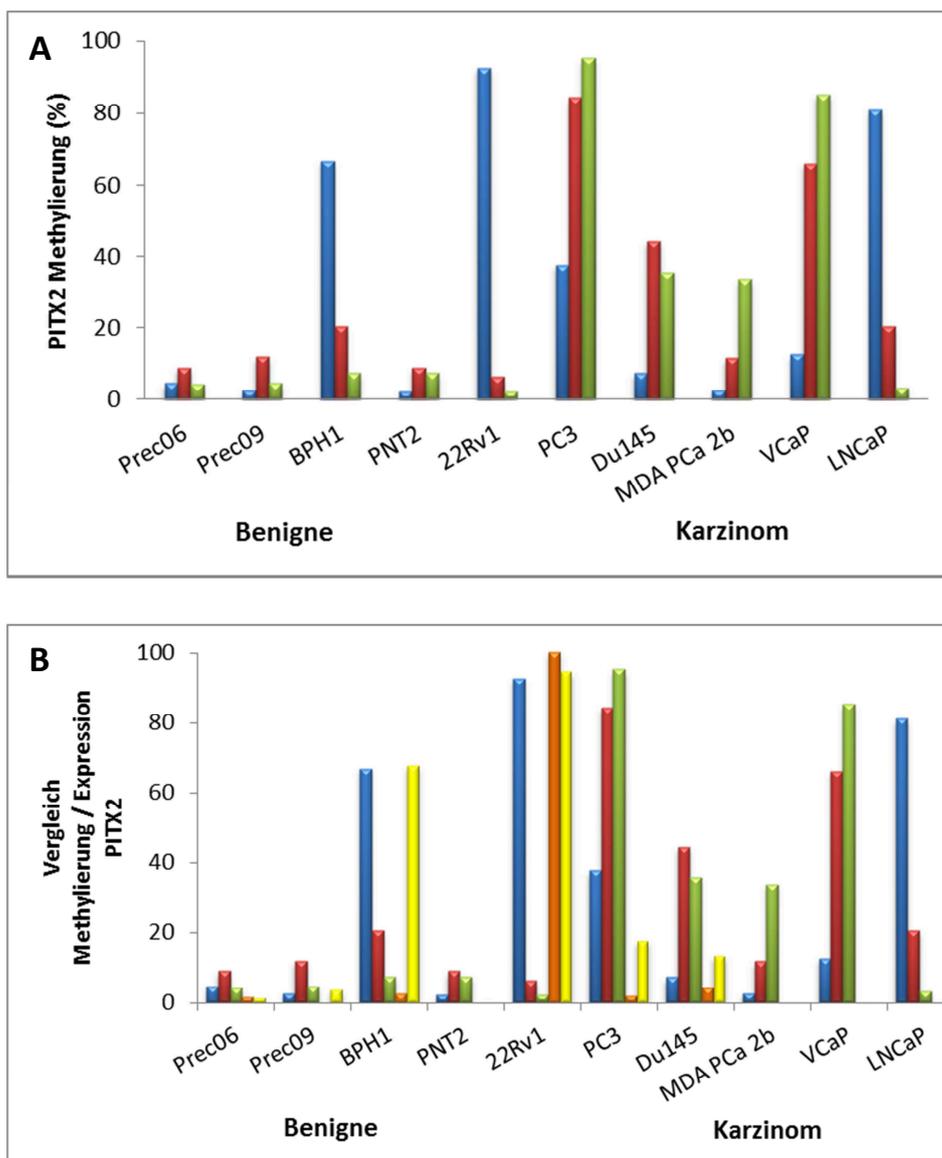


Abbildung 3.4: (A) Ergebnisse der Methylierungsanalysen (Pyrosequenzierungsassays) an drei verschiedenen Positionen im PITX2 Gen in verschiedenen Tumorzelllinien und benignen Zelllinien. **Assay 1:** blau, Transkripte PITX2a und PITX2b. **Assay 2:** rot, Transkript PITX2c. **Assay 3:** grün,

Transkripte PITX2a, PITX2b und PITX2c. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Der Mittelwert wurde zugelassen, wenn weniger als 10% Abweichung vorlagen. **(B)** Vergleich zwischen den Methylierungs- und Expressionsanalysen von PITX2 in den Tumor- und benignen Zelllinien. Expression **PITX2 Ex 12**: orange. Expression **PITX2 Ex 56**: gelb.

Um den Einfluss der DNA-Methylierung auf die Genexpression von PITX2 und AR zu überprüfen, wurden die Zelllinien LNCaP, 22Rv1 und PC3 mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-Desoxyazacytidin (Aza) und dem HDAC-Inhibitor SAHA (Suberoylanilid Hydroxamsäure / Vorinostat), jeweils einzeln und in Kombination, behandelt. Im Anschluss wurde eine qRT-PCR für die Gene *CDKN1A* (p21), *PITX2a* und *AR* durchgeführt. Als Kontrolle diente die Expression von p21, dessen zu erwartender Anstieg für die verschiedenen Behandlungen deutlich zu erkennen war (Abbildung 3.5 A).

Eine signifikante Steigerung der PITX2 Ex 56 Expression konnte in der PC3 Zelllinie durch Aza-Behandlung und der Kombinationsbehandlung erzielt werden, in der 22Rv1 nur durch die Aza-Behandlung. In der Zelllinie LNCaP stieg die PITX2 Ex 56 Expression durch die Behandlung mit SAHA und nochmals stärker durch die Kombinationsbehandlung signifikant an (Abbildung 3.5 B).

Zusätzlich wurde die Expression der PITX2 Exone 1 und 2 untersucht, um eventuelle Effekte der Behandlung auf diesen Abschnitt des Gens überprüfen zu können (Abbildung 3.5 C). Der einzig signifikante Behandlungseffekt wurde durch eine Kombinationsbehandlung in der Zelllinie PC3 erzielt (Abbildung 3.5 C).

In den drei untersuchten Zelllinien, 22Rv1, LNCaP und PC3, lag nur in der PC3 eine sehr starke Methylierung von über 80% in der Region bei Exon 5/6 vor, welche mit einer sehr geringen PITX2-Expression einherging. Während in der Region bei Exon 1/2 der Zelllinien 22Rv1 und LNCaP eine hohe Methylierung von 80 – 90% auftrat, wies sie in der PC3 einen mittleren Wert von etwa 40% auf. Die Expression von PITX2 war in 22Rv1 relativ stark, gering in PC3 und nicht nachweisbar in LNCaP (Abbildung 3.4). Mit Hilfe von Methylierungsinhibitoren konnte in PC3 die Methylierung inhibiert und somit die Expression von PITX2 erhöht werden. Die Inhibition der Methylierung zeigte in 22Rv1 keinen Effekt auf die PITX2-Expression. In der LNCaP war der Effekt durch die Methylierungsinhibitoren auf die PITX2-Expression jedoch etwas stärker.

Die Expression der AR-mRNA wurde durch Aza-Behandlung und die Kombinationsbehandlung in allen drei Zelllinien reprimiert (Abbildung 3.5 D). Trotz der sehr niedrigen basalen Expression konnten Unterschiede in PC3 festgestellt werden.

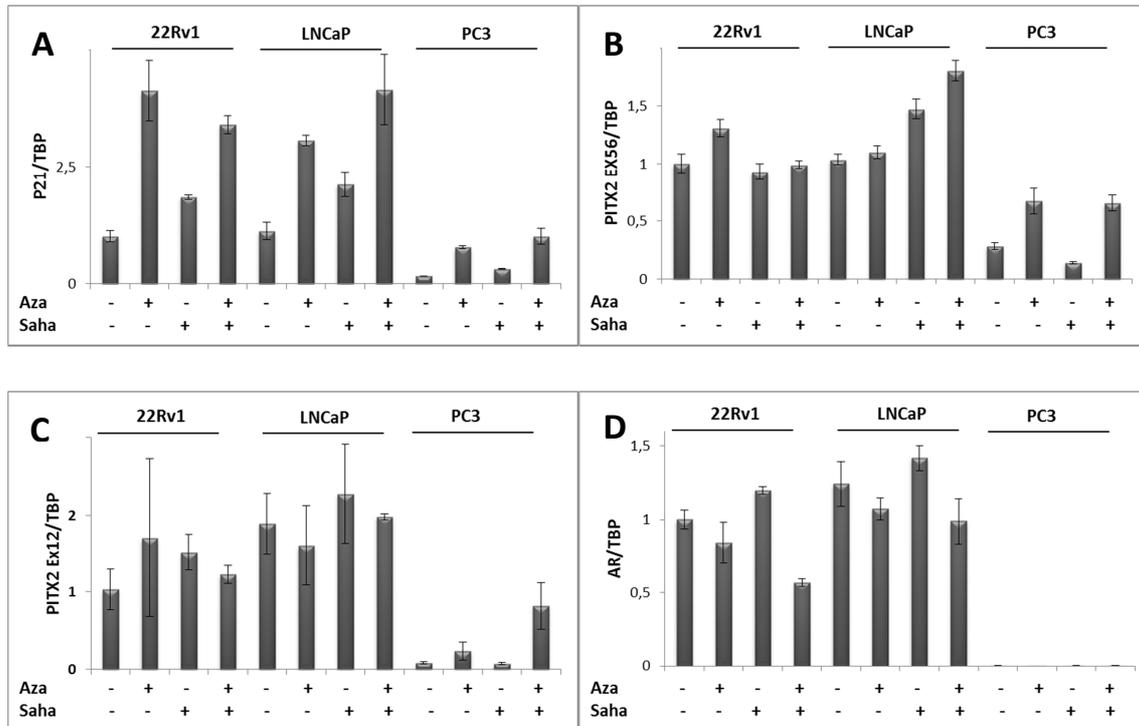


Abbildung 3.5: Expression von p21 (A), PITX2 Ex 56 (B), PITX2 Ex 12 (C) und AR (D) nach Behandlung der Zelllinien 22Rv1, LNCaP und PC3 mit den epigenetischen Inhibitoren 5-Aza-2'-Desoxyazacytidin (Aza) oder SAHA oder ihrer Kombination. Die Aza-Behandlung erfolgte für 72 h mit 2 µM, die SAHA-Behandlung nur für die letzten 24 h mit 2,5 µM. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind den Tabellen 9.1 und 9.2 zu entnehmen.

3.3 Expression von PITX1 in Zelllinien und Geweben

Das Expressionsprofil von *PITX1*, ein anderes Gen der RIEG/PITX Homeobox Familie, wurde ebenfalls mittels qRT-PCR überprüft. Im Vergleich zu *PITX2* war die Expression von *PITX1* sowohl in Geweben als auch Zelllinien durchgehend niedriger. In denselben Geweben, in denen bereits die Expression des *PITX2* Gens untersucht worden war (Abbildung 3.2), erfolgte analog eine Expressionsanalyse für das *PITX1* Gen. Wie bei *PITX2* fand sich ein signifikanter Unterschied der Expressionsmuster von malignen und benignen Geweben, jedoch weniger stringent (Abbildung 3.6 B). Bei den Zelllinien fand sich die stärkste *PITX1* Expression in DU145, die anderen Zelllinien exprimierten das Gen dagegen

eher schwach (Abbildung 3.6 A). Der Vergleich der Tumor- und Normalgewebe zwischen *PITX1* und *PITX2* zeigte eine gute Korrelation der beiden Gene mit Spearman $\rho = 0,5284$.

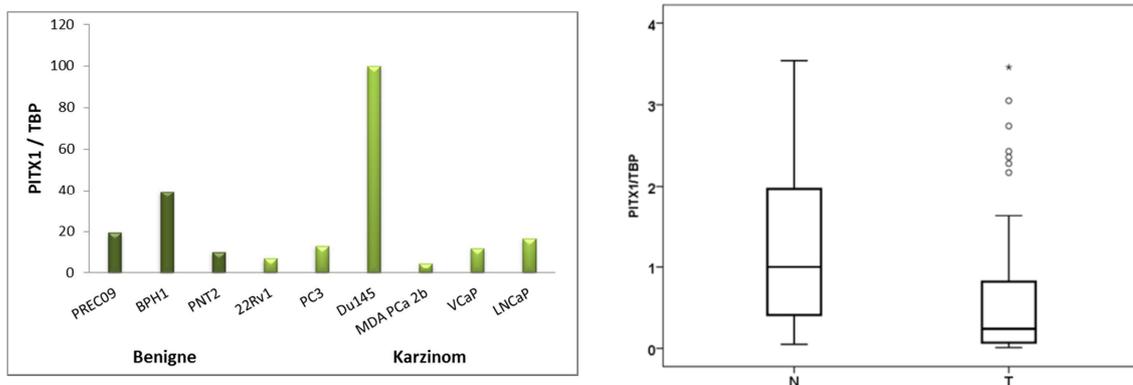


Abbildung 3.6: (A) Expressionsstatus von PITX1 in verschiedenen Tumorzelllinien und benignen Zelllinien. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Der Mittelwert wurde zugelassen, wenn weniger als 10% Abweichung vorlagen. (B) Vergleich der PITX1 mRNA-Expression in benignen (n=13) und malignen Prostatageweben (n=46). T = Prostatakarzinomgewebe. N= Prostatanormalgewebe. Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,0408$

3.4 Reexpression von PITX2

Für die PITX2-Reexpression wurden zunächst die einzelnen Isoformen (PITX2a, PITX2b, PITX2c) amplifiziert und in den Expressionsvektor pcDNA4/TO kloniert. Dabei handelt es sich um einen Vektor des induzierbaren "T-REx Systems" (Siehe Abschnitt 3.4.2). Die Klonierung gelang für PITX2a und PITX2c, jedoch nicht für PITX2b. Die Amplifizierungsprimer für PITX2a und b sind identisch, da die Sequenzen N- und C-terminal keine Unterschiede beinhalten. Durch eine gelelektrophoretische Auftrennung konnten die unterschiedlich großen Amplifikate zwar unterschieden und eluiert werden, nach Sequenzierung war aber nur PITX2a und nicht PITX2b nachweisbar. Alle klonierten Sequenzen wurden durch Sanger-Sequenzierung auf Vollständigkeit und Mutationen überprüft.

Danach wurden die Expressionskonstrukte in PC3-Zellen transfiziert und im Western Blot die gebildeten Proteine nachgewiesen (Abbildung 3.45)

3.4.1 Klonogenitätsassay

Klonogenitätsassays sollten klären, ob PITX2a und PITX2c einen Effekt, auf die Fähigkeit der Prostatakarzinom-Zelllinien Klone zu bilden, ausüben (Abbildung 3.7 - 9). Hierfür

wurden die Zelllinien 22Rv1, LNCaP und PC3 mit pcDNA 4/TO PITX2a, pcDNA 4/TO PITX2c oder dem Leervektor pcDNA 4/TO für 48 h transfiziert und danach über 3 Wochen mit Zeocin selektiert. In allen drei Zelllinien bildeten sich durch die Transfektion mit PITX2a und PITX2c jeweils im Vergleich zum Leervektor deutlich weniger Klone. Der Effekt war in der 22Rv1 Zelllinie durch PITX2a etwas stärker ausgeprägt (Abbildung 3.7); die Zelllinie LNCaP zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der PITX2a- und PITX2c-Transfektion (Abbildung 3.8). In der Zelllinie PC3 war nach der PITX2a-Transfektion fast kein Klon mehr sichtbar (Abbildung 3.9).

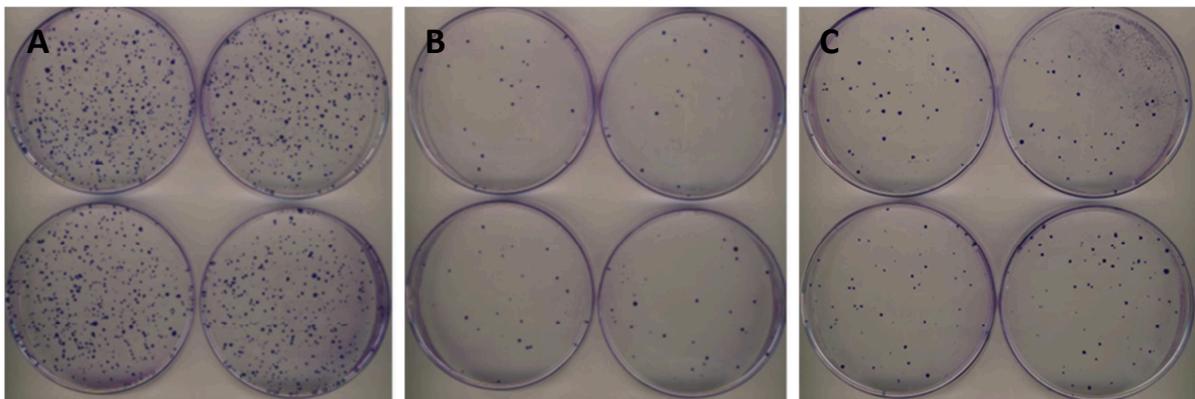


Abbildung 3.7: Klonogenitätsassay mit pcDNA 4/TO PITX2a (B) und pcDNA 4/TO PITX2c (C) im Vergleich zum Leervektor pcDNA 4/TO (A) in der Zelllinie 22Rv1. Die Zellen wurden für 48 h mit den Plasmiden transfiziert und im Anschluß für 3 Wochen mit Zeocin selektiert. Die Färbung erfolgte in 10 cm-Schalen.

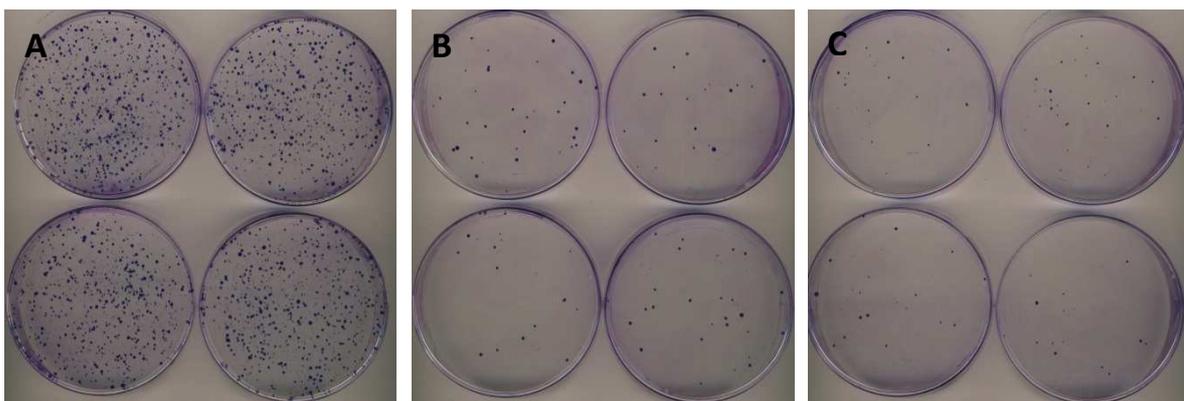


Abbildung 3.8: Klonogenitätsassay mit pcDNA 4/TO PITX2a (B) und pcDNA 4/TO PITX2c (C) im Vergleich zum Leervektor pcDNA 4/TO (A) in der Zelllinie LNCaP. Die Zellen wurden für 48 h mit den Plasmiden transfiziert und im Anschluß für 3 Wochen mit Zeocin selektiert. Die Färbung erfolgte in 10 cm-Schalen.

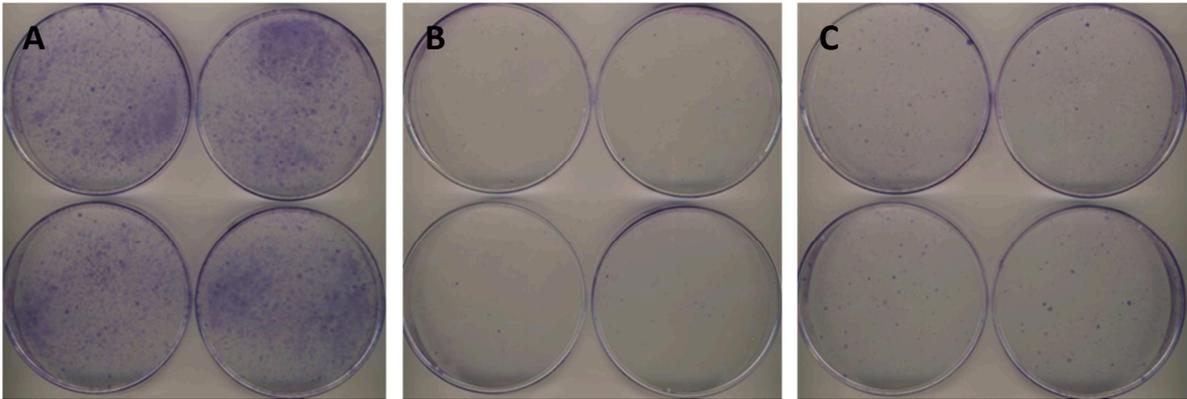


Abbildung 3.9: Klonogenitätsassay mit pcDNA 4/TO PITX2a (**B**) und pcDNA 4/TO PITX2c (**C**) im Vergleich zum Leervektor pcDNA 4/TO (**A**) in der Zelllinie PC3. Die Zellen wurden für 48 h mit den Plasmiden transfiziert und im Anschluß für 2 Wochen mit Zeocin selektioniert. Die Färbung erfolgte in 10 cm-Schalen.

3.4.2 Stabile PITX2a Zellklone

Die stabile Transfektion mit pcDNA4/TO PITX2a wurde in Varianten der Zelllinien 22Rv1 und PC3 durchgeführt, die den Tet-Repressor (pcDNA6/TR) stabil exprimieren. Dieses Verfahren (T-REx System) ermöglicht es, durch die Zugabe von Tetracyclin die Expression von PITX2 gezielt einzuschalten. Auf dem pcDNA 4/TO Plasmid befinden sich Tetracyclin-Operator Stellen, die durch die Tetracyclin Repressoren, für die das regulatorische Plasmid pcDNA 6/TR kodiert, inhibiert werden. Durch die Zugabe von Tetracyclin werden die Operator-Stellen freigegeben und das klonierte Gen, in diesem Fall PITX2a, kann exprimiert werden.

Nach Selektion wurden insgesamt 18 Zellklone der Zelllinie PC3 einzeln expandiert und mittels qRT-PCR auf induzierbare Expression von PITX2 analysiert. Von diesen erwiesen sich 13 als positiv (Abbildung 3.10). Die Zellklone der Zelllinie 22Rv1 wurden gleichermaßen überprüft. Auch in dieser Zelllinie erwiesen sich eine Vielzahl von Klonen als positiv (Daten nicht gezeigt). Keiner der Klone exprimierte PITX2 stabil in hohem Maße. Demgegenüber fielen auch einige der Klone mit induzierbarer PITX2-Expression durch langsames Wachstum auf. In der Zelllinie LNCaP konnten keine Klone mit stabiler oder induzierbarer Expression von PITX2 erhalten werden.

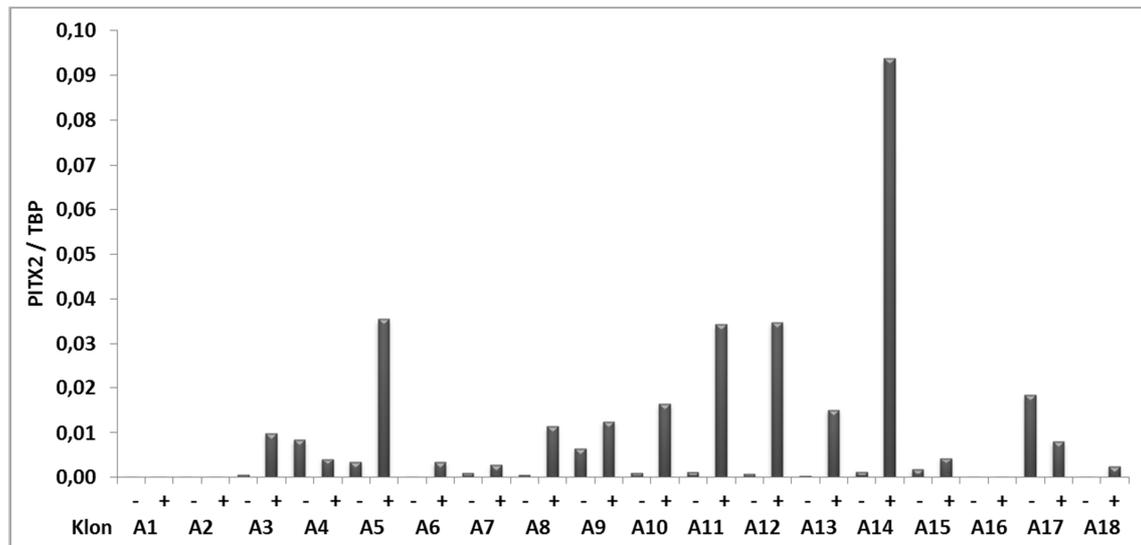
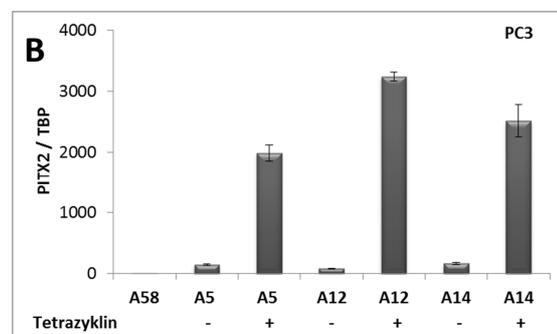
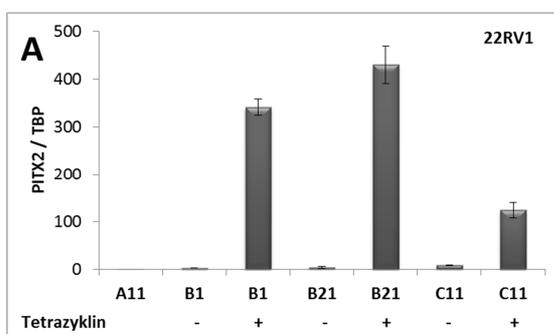


Abbildung 3.10: Expression von PITX2 in den expandierten stabilen PC3 PITX2a Klonen mit (+) und ohne (-) Tetracyclin-Induktion für 24 h. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten mit dem Assay PITX2 Ex 56. Der Mittelwert wurde zugelassen, wenn weniger als 10% Abweichung vorlagen.

Für genauere Analysen wurden pro Zelllinie drei Klone ausgewählt. In der Zelllinie 22Rv1 wurden die ausgewählten Klone als B1, B21 und C11 und in der Zelllinie PC3 als A5, A12 und A14 bezeichnet. Bei A11 (22Rv1) und A58 (PC3) handelte es sich jeweils um die Mutterzelllinie, die den Repressionsvektor pcDNA6/TR enthält. Nach Zugabe von Tetracyclin war nach 24 h die Reexpression von PITX2a in beiden Zelllinien auf RNA-Ebene deutlich nachweisbar, verglichen mit der nichtinduzierten Kontrolle und der Mutterzelllinie (Abbildung 3.11 A und B). Auch auf Proteinebene war nach 24 h die PITX2a Induktion im Vergleich zur nichtinduzierten Kontrolle sichtbar (Abbildung 3.11 C und D).



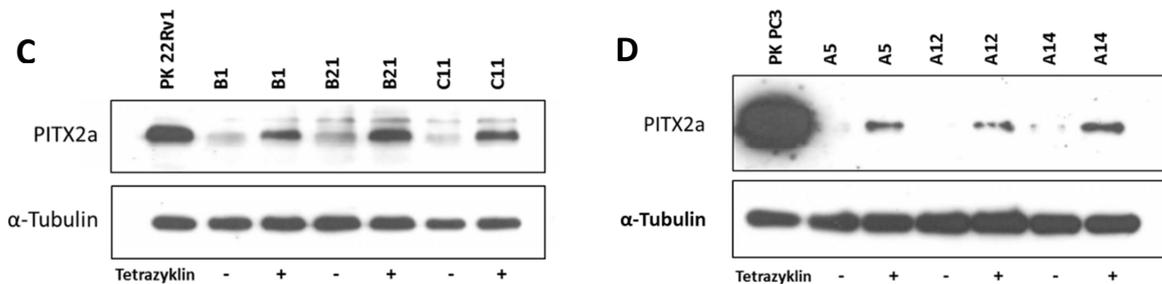


Abbildung 3.11: (A) PITX2a mRNA Reexpression in Klonen der Zelllinie 22Rv1 nach Tetracyclin-Behandlung (+) über 24 h in den Zellklonen A5, A12 und A14 (B) PITX2a mRNA Reexpression in Klonen der Zelllinie PC3 nach Tetracyclin-Behandlung (+) über 24 h in den Zellklonen B1, B21 und C11. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind der Tabelle 9.10 zu entnehmen. (C) Western Blot der induzierten 22Rv1 Klone B1, B21 und C11 nach Tetracyclin-Behandlung (+) für 24 h (D) Western Blot der induzierten PC3 Klone A5, A12 und A14 nach Tetracyclin-Behandlung (+) für 24 h; α -Tubulin diente in beiden Western Blots als Ladekontrolle.

3.4.3 Funktionelle Analysen mit den stabilen PITX2a Zellklonen

Auch im nichtinduzierten Zustand war in allen Zellklonen, insbesondere auf RNA-Ebene, eine leicht erhöhte Expression von PITX2a gegenüber der Mutterzelllinie nachweisbar, die durch die Tetracyclin-Behandlung jeweils deutlich verstärkt wurde. Proliferationskurven mit zwei positiven PITX2a Klonen jeweils aus den Zelllinien 22Rv1 und PC3 zeigten, dass die Reexpression von PITX2a mit einer Proliferationshemmung der Zellen einhergeht. Nach 24 h wurde mit der Tetracyclin-Behandlung begonnen. Bereits 48 h nach der Induktion mit Tetracyclin verlangsamte sich die Proliferation der induzierten PITX2a Klone in beiden Zelllinien deutlich. In der 22Rv1 war der hemmende Effekt noch stärker als in der PC3. Nach insgesamt 96 h kam es zu einer erheblichen Hemmung der Proliferation der PITX2a Klone im Vergleich zu nichtinduzierten Kontrollen und den Mutterzelllinien PC3 und 22Rv1 (Abbildung 3.12).

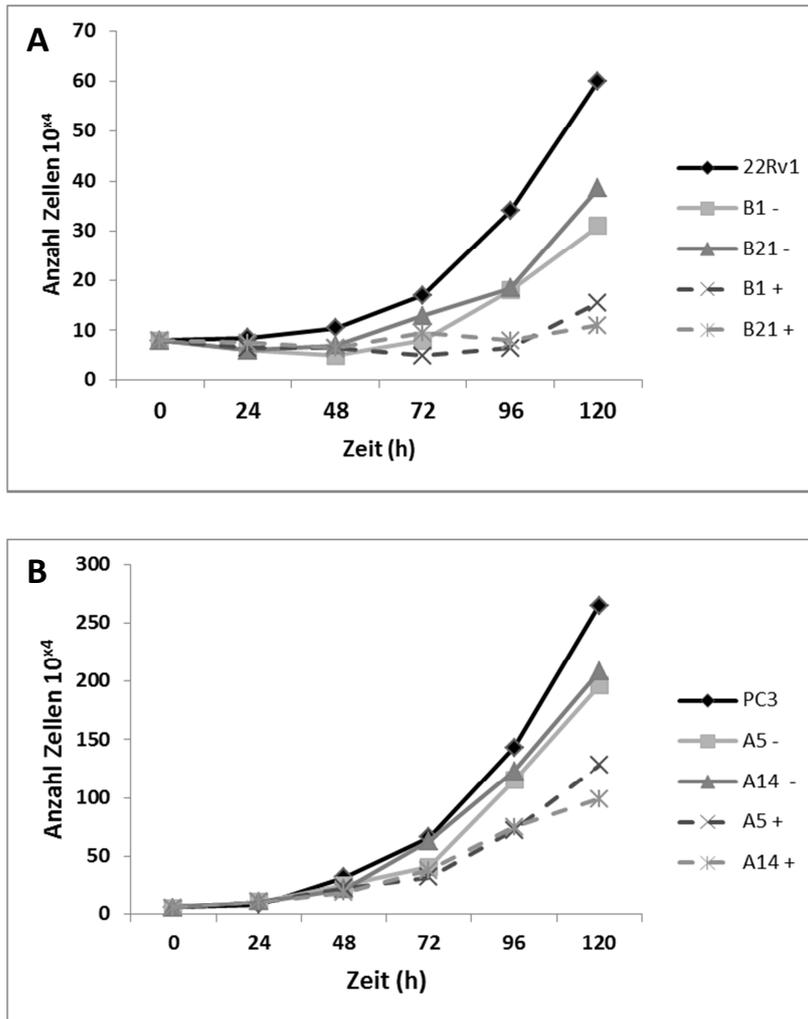


Abbildung 3.12: (A) Wachstumskurve der stabil transfizierten 22Rv1 pcDNA 4/TO PITX2a Klone mit (+) und ohne (-) Tetracyclin Behandlung für 96 h (Zugabe nach 24 h). Die 22Rv1 Zelllinie dient als Wachstumskontrolle. (B) Wachstumskurve der stabil transfizierten PC3 pcDNA 4/TO PITX2a Klone mit (+) und ohne (-) Tetracyclin Behandlung für 96 h (Zugabe nach 24 h). Die PC3 Zelllinie dient als Wachstumskontrolle. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Der Mittelwert wurde zugelassen, wenn weniger als 10% Abweichung vorlagen.

Zusätzlich wurden FACS-Analysen durchgeführt, um zu prüfen, ob die deutlich verlangsamte Proliferation der induzierten 22Rv1 und PC3 Zellklone durch einen Zellzyklusarrest hervorgerufen wird. Hierfür wurden die PITX2a-Zellklone der Zelllinie 22Rv1 (Zellklon B1 und B21) 48 h und 96 h mit Tetracyclin behandelt. Die PITX2a-Klone der Zelllinie PC3 (Zellklon A5 und A14) wurden nur 48 h mit Tetracyclin behandelt, da diese Zelllinie ein anderes Wachstum als die 22Rv1 zeigte und eine Behandlung über 96 h nicht möglich war.

Die Zellklone der 22Rv1 zeigten generell einen starken Anstieg der G1 Phase gegenüber der Mutterzelllinie. Dieser Effekt wurde durch die Induktion mit Tetracyclin noch verstärkt

(Abbildung 3.13) und nahm nach 96 h noch weiter zu (Abbildung 3.14). In der Zelllinie PC3 ist der Unterschied zwischen Mutterzelllinie und den Klonen nicht signifikant. Der Trend war jedoch derselbe wie in der 22Rv1 (Abbildung 3.15). Anzeichen für Apoptose, durch einen Anstieg der subG1 Phase, sind in beiden Zelllinien nicht erkennbar.

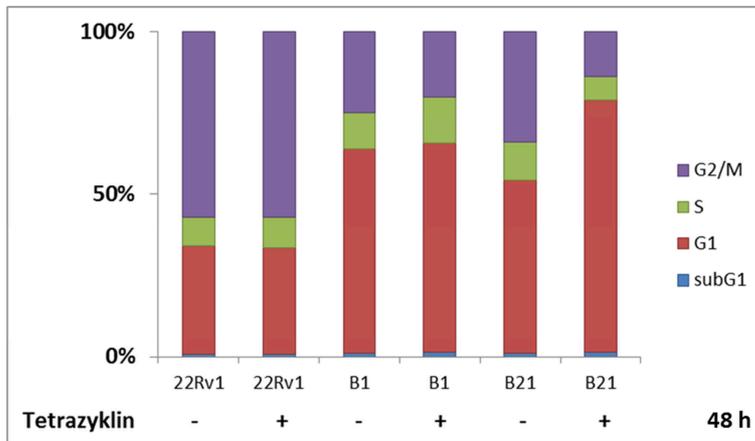


Abbildung 3.13: FACS-Analysen der Zellzyklusverteilung der 22Rv1 pcDNA 4/TO PITX2a Klone B1 und B21 mit (+) und ohne (-) Tetracyclin-Behandlung für 48 h. Die Mutterzelllinie 22Rv1 dient als Referenz.

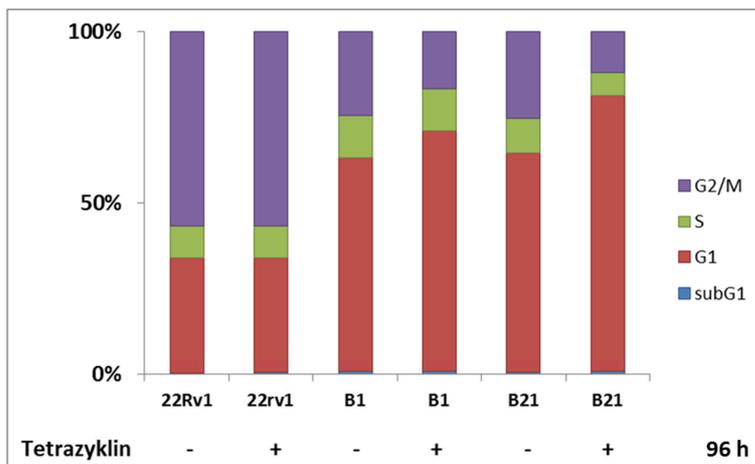


Abbildung 3.14: FACS-Analysen der Zellzyklusverteilung der 22Rv1 pcDNA 4/TO PITX2a Klone B1 und B21 mit (+) und ohne (-) Tetracyclin-Behandlung für 96 h. Die Mutterzelllinie 22Rv1 dient als Referenz.

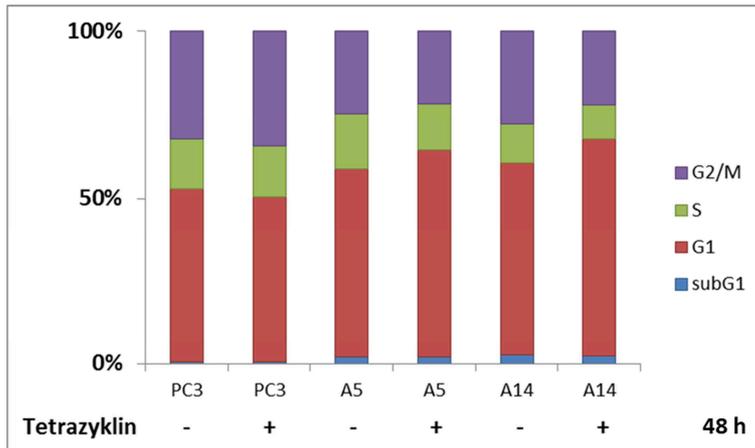


Abbildung 3.15: FACS-Analysen der Zellzyklusverteilung der PC3 pcDNA 4/TO PITX2a Klone A5 und A14 mit (+) und ohne (-) Tetracyclin-Behandlung für 48 h. Die Mutterzelllinie PC3 dient als Referenz.

Da die Reexpression von PITX2 keine Apoptose induziert, die Proliferation jedoch signifikant gehemmt (Abbildung 3.12) und ein Anstieg der Zellen in der G1 Phase erkennbar ist (Abbildung 3.13 – 15), wurde mittels saurem β -Galaktosidase-Assay überprüft, ob Anzeichen für Seneszenz vorhanden sind (siehe 2.2.13.10). Die mit PITX2a oder PITX2c transient transfizierten 22Rv1 Zellen zeigten, wie die Positivkontrolle (mit Snail siRNA behandelte Zellen), eine deutliche Blaufärbung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.16 A). Auch in den nichtinduzierten PITX2a Zellklonen war eine Blaufärbung erkennbar, die durch die PITX2 Induktion noch deutlich verstärkt werden konnte (Abbildung 3.16 B). Derselbe Effekt war auch in der PC3 Zelllinie zu erkennen. In diesen Zellen war die Blaufärbung noch stärker und zusätzlich erkennt man deutlicher einen morphologischen Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle einerseits und den transient transfizierten Zellen sowie den PITX2a Zellklonen andererseits (Abbildung 3.17 A und B).

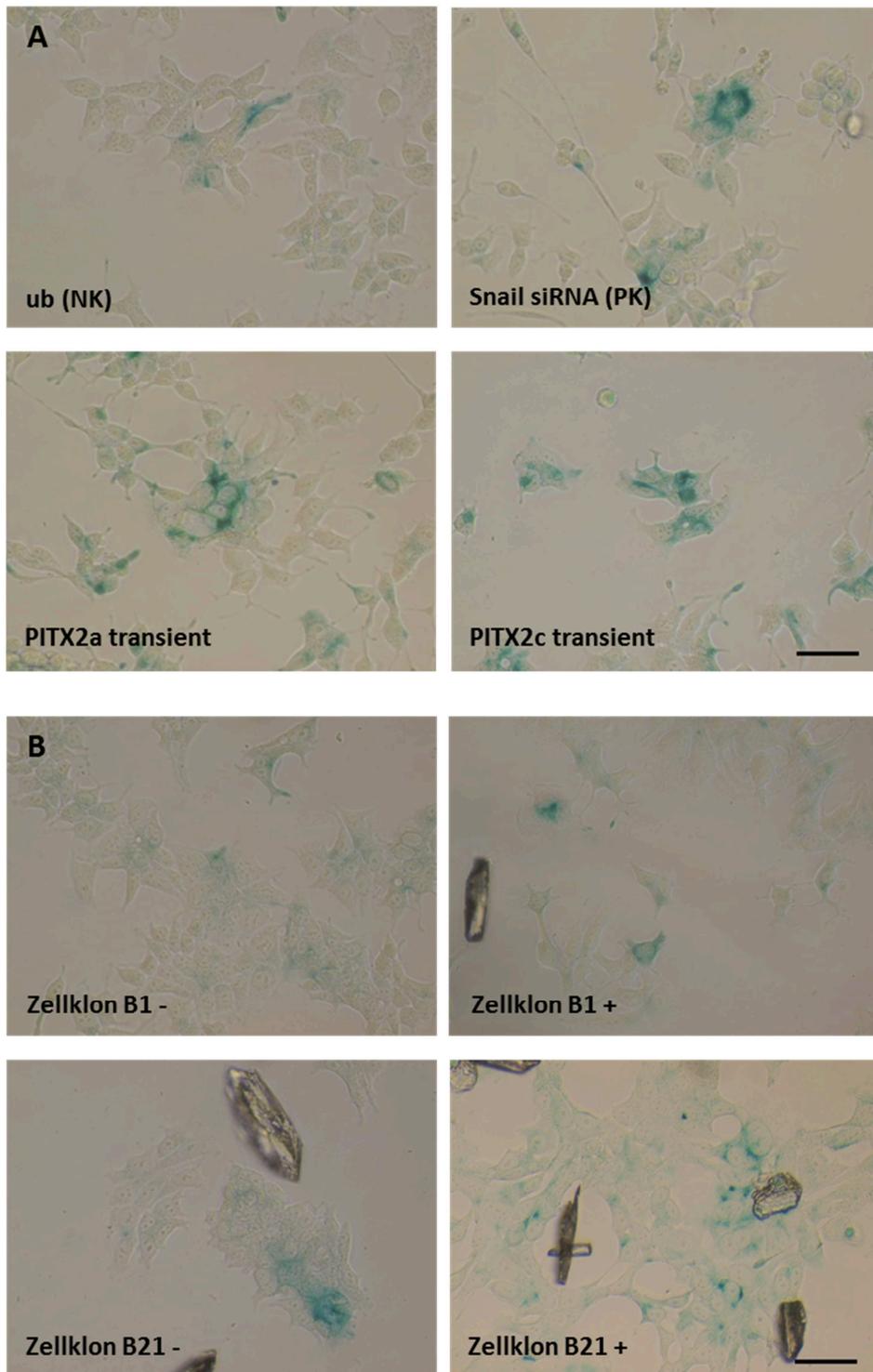


Abbildung 3.16: (A) Die Zellen wurden 48 h entweder mit PITX2a / PITX2c transient transfiziert oder mit siRNA gegen Snail (Positivkontrolle) behandelt. Als Negativkontrolle diente die unbehandelte 22Rv1. (B) Die PITX2a Zellklone (B1 und B21) wurden für 48 h mit Tetracyclin induziert (+) oder liegen nichtinduziert vor (-). **20x** Vergrößerung. **Maßstab:** 50 µm.

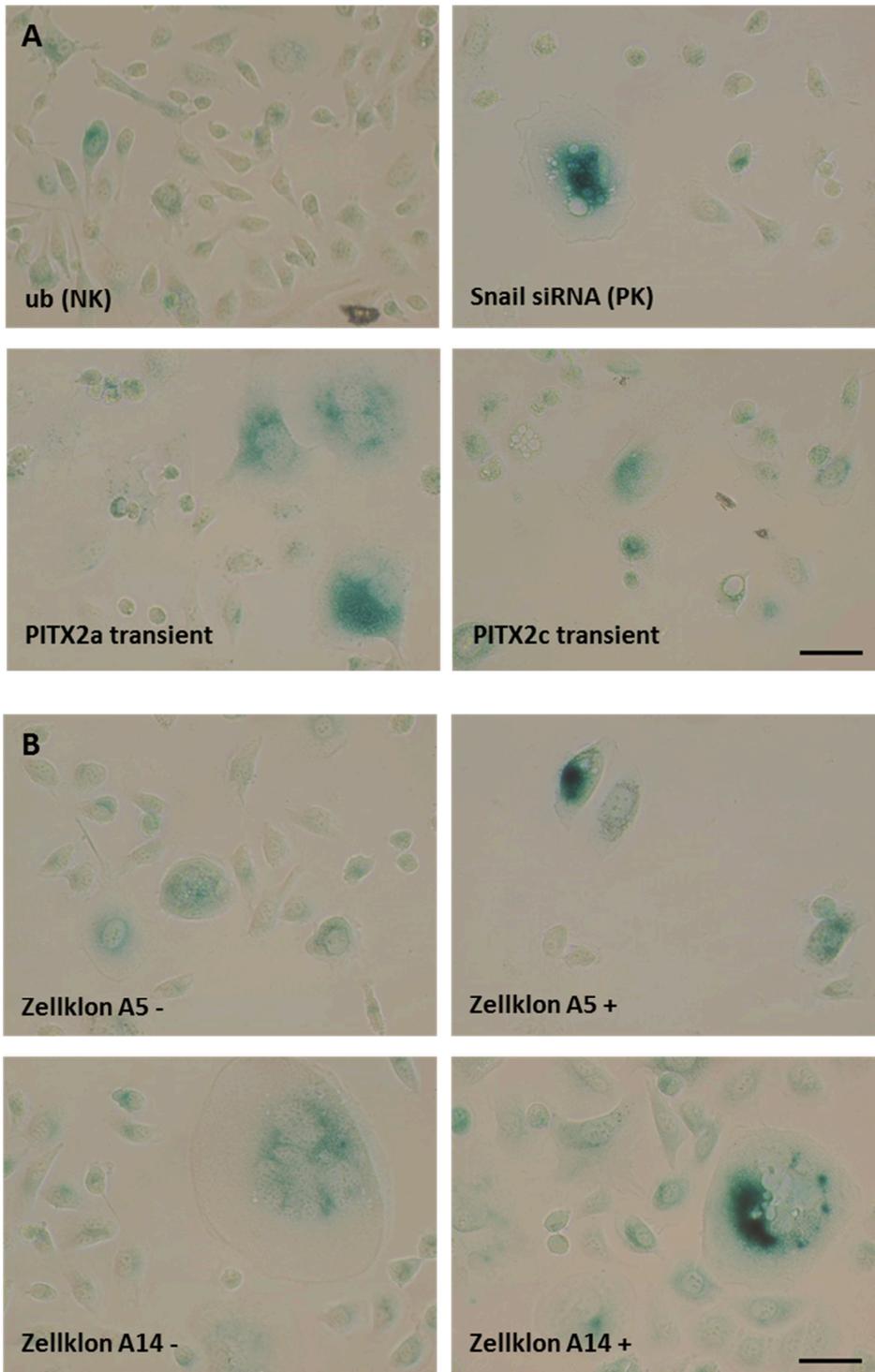


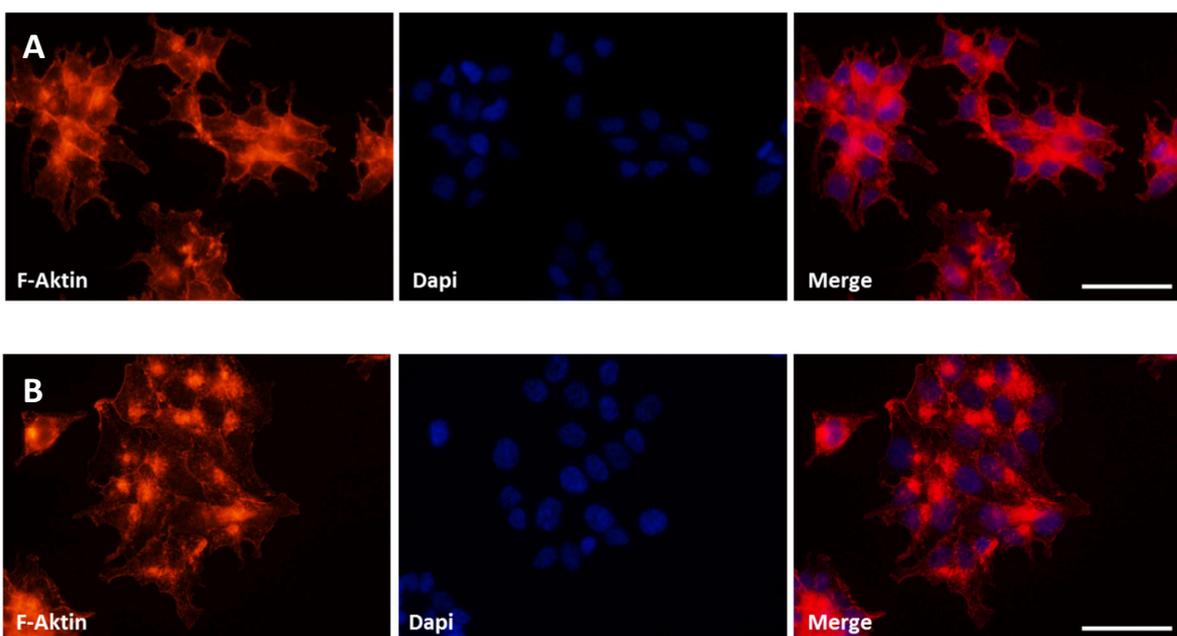
Abbildung 3.17: (A) Die Zellen wurden 48 h entweder mit PITX2a / PITX2c transient transfiziert oder mit siRNA gegen Snail (Positivkontrolle) behandelt. Als Negativkontrolle diente die unbelandete PC3. (B) Die PITX2a Zellklone (A5 und A14) wurden für 48 h mit Tetracyclin induziert (+) oder liegen nichtinduziert vor (-). **20x** Vergrößerung. **Maßstab:** 50 µm.

Um die morphologischen Unterschiede zwischen den Mutterzelllinien 22Rv1 und PC3 und den mit PITX2a stabil transfizierten Zellklonen zu zeigen, wurden immuncytochemische Fluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dafür wurden die 22Rv1 Zellklone B1 und B21 für

48 h mit Tetracyclin behandelt, um PITX2a zu induzieren. Auch die PC3 Zellklone A5 und A14 wurden für 48 h mit Tetracyclin induziert. Für die Analyse wurden sowohl die jeweiligen Mutterzelllinien 22Rv1 und PC3, als auch die PITX2a Zellklone, nichtinduziert und induziert, immunocytochemisch ausgewertet. Um das Cytoskelett der Zellen darzustellen, wurde Rhodamin-markiertes Phalloidin gegen filamentöses Aktin verwendet. Eine DAPI-Färbung diente zur Markierung der Zellkerne.

Die unbehandelten 22Rv1 Zellen wuchsen in losen Verbänden. Die einzelnen Zellen bildeten viele einzelne Zellfortsätze (Abbildung 3.18 A). Bei den Zellklonen war kein morphologischer Unterschied zwischen den induzierten und den nichtinduzierten Zellen sichtbar, sie unterschieden sich jedoch beide stark von der Mutterzelllinie. Die Zellen tendierten dazu übereinander zu wachsen und bildeten abgegrenzte Zellinseln. Die einzelnen Zellen wuchsen flächendeckender und bildeten keine Zellfortsätze (Abbildung 3.18 B – E).

Die Zellen der PC3 Zelllinie wuchsen vereinzelt. Die Zellen wiesen verschiedene Größen auf und unterschieden sich untereinander stark (Abbildung 3.19 A). In den PITX2-transfizierten Klonen nahm, auch ohne Tetracyclin-Induktion, der Größenunterschied zwischen den Zellen zu. Einzelne Zellen vergrößerten ihr Volumen sehr stark (Abbildung 3.19 B – E). Zusätzlich zu der Volumenzunahme bildeten einige Zellen überdurchschnittliche lange Fortsätze (Abbildung 3.19 B und C).



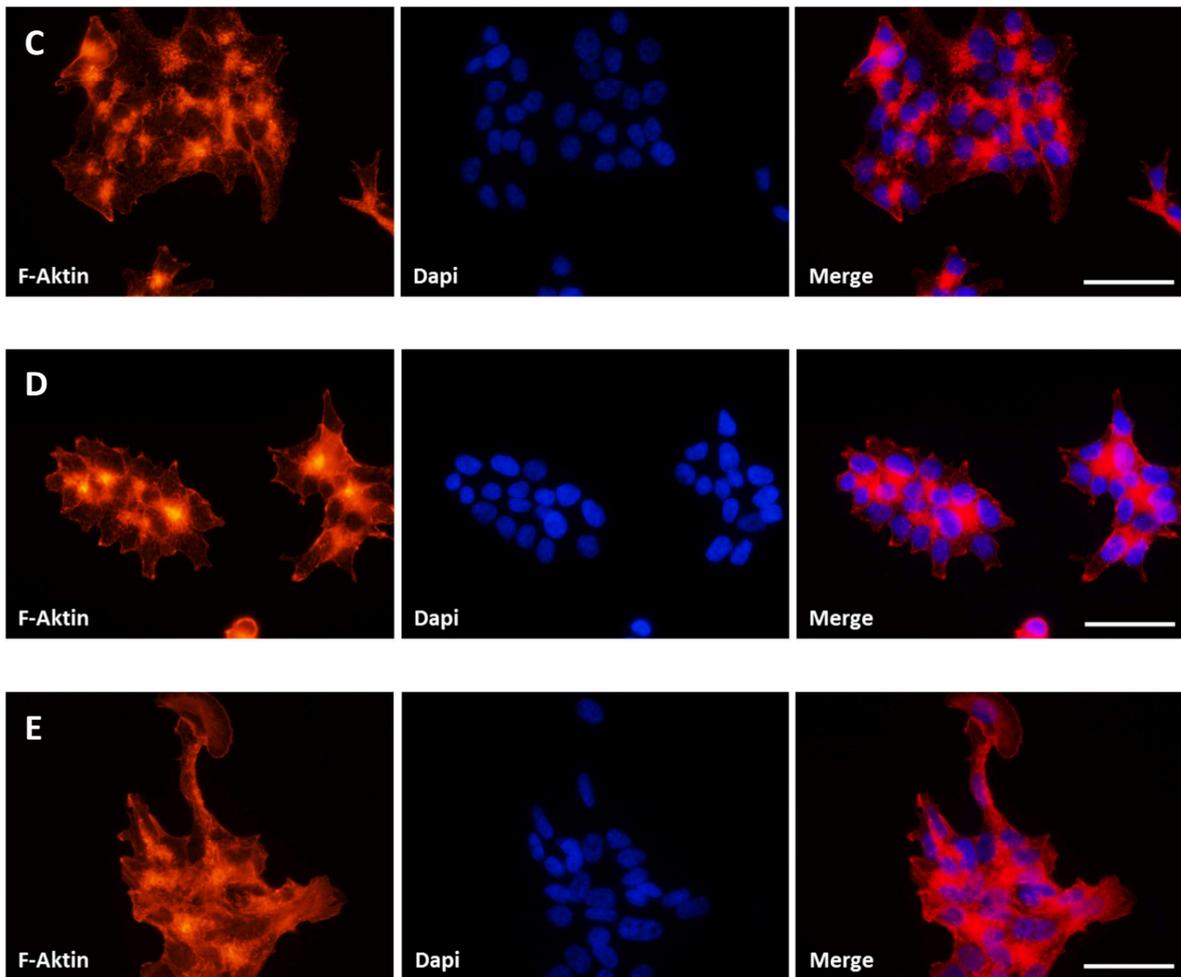
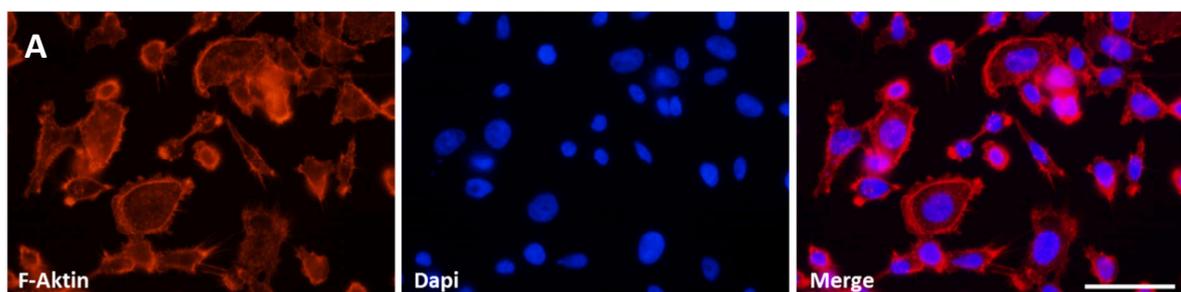


Abbildung 3.18: Immuncytochemische Fluoreszenzfärbung der 22Rv1 pcDNA 4/TO PITX2a Klone. (A) unbehandelte 22Rv1 Zelllinie. (B) Zellklon B1 ohne Tetracyclin-Induktion. (C) Zellklon B1 nach 48 h Tetracyclin-Behandlung. (D) Zellklon B21 ohne Tetracyclin-Induktion. (E) Zellklon B1 nach 48 h Tetracyclin-Behandlung. **F-Aktin** = Färbung des filamentösen Aktins in den Zellen. **Dapi** = Färbung des Zellkerns. **Merge** = übereinandergelegtes Bild aus F-Aktin- und Dapi-Färbung. **40x** Vergrößerung. **Maßstab:** 25 µm.



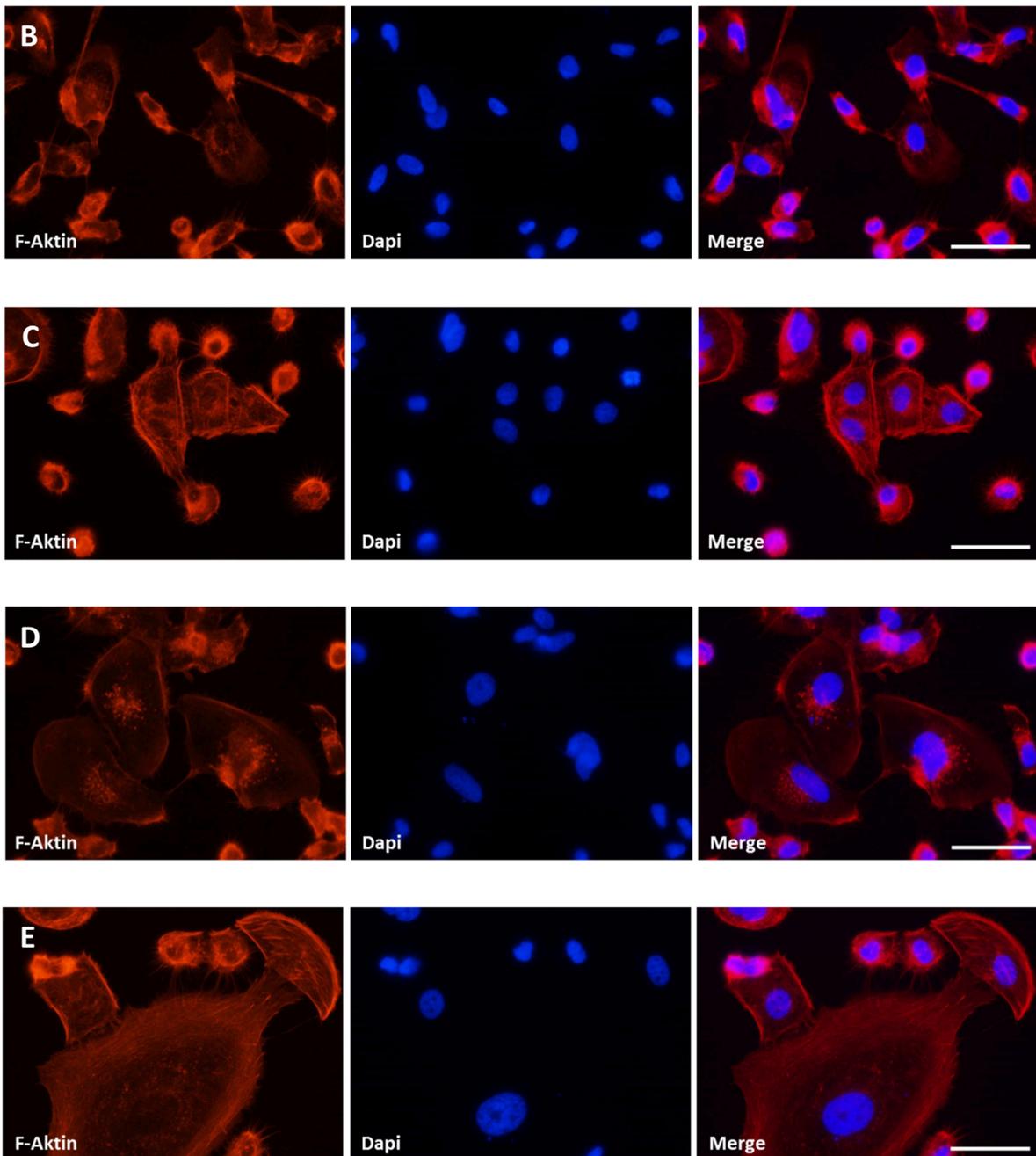


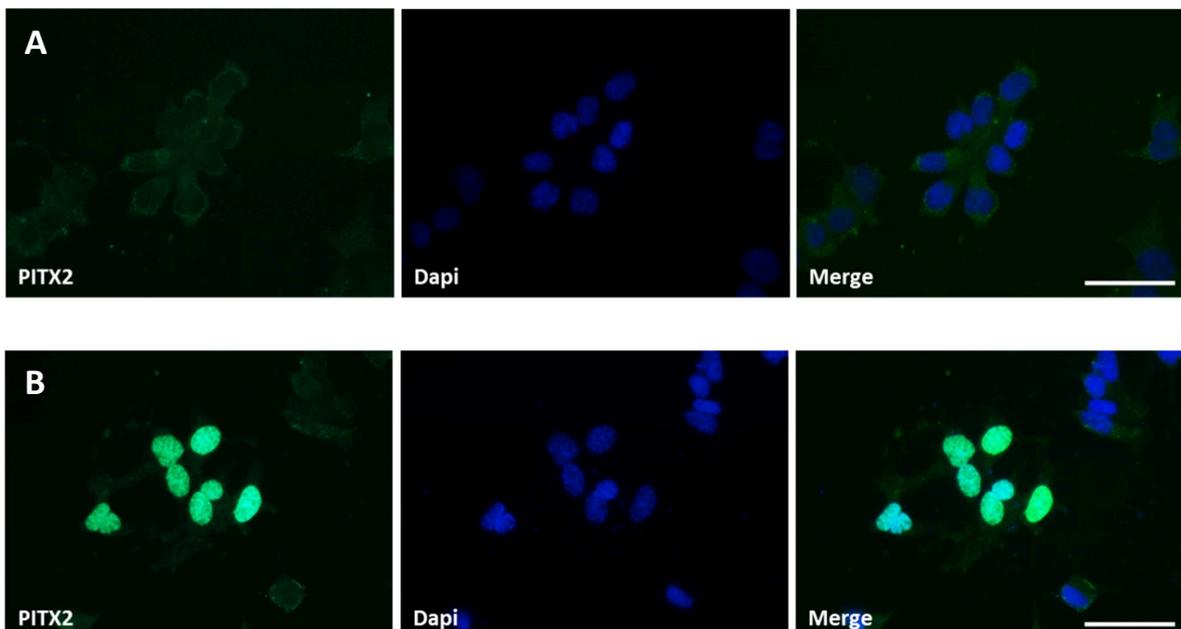
Abbildung 3.19: Immunocytochemische Fluoreszenzfärbung der PC3 pcDNA 4/TO PITX2a Klone. (A) unbehandelte PC3 Zelllinie. (B) Zellklon A5 ohne Tetracyclin-Induktion. (C) Zellklon A5 nach 48 h Tetracyclin-Behandlung. (D) Zellklon A14 ohne Tetracyclin-Induktion. (E) Zellklon A14 nach 48 h Tetracyclin-Behandlung. **F-Aktin** = Färbung des filamentösen Aktins in den Zellen. **Dapi** = Färbung des Zellkerns. **Merge** = übereinandergelegtes Bild aus F-Aktin- und Dapi-Färbung. **40x** Vergrößerung. **Maßstab:** 25 µm.

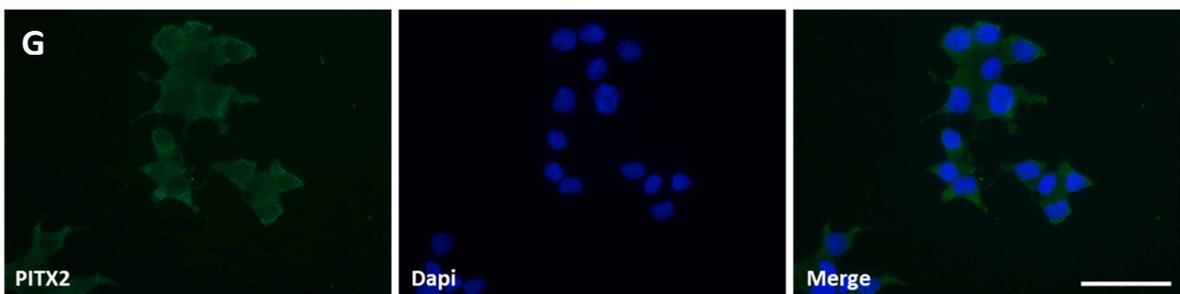
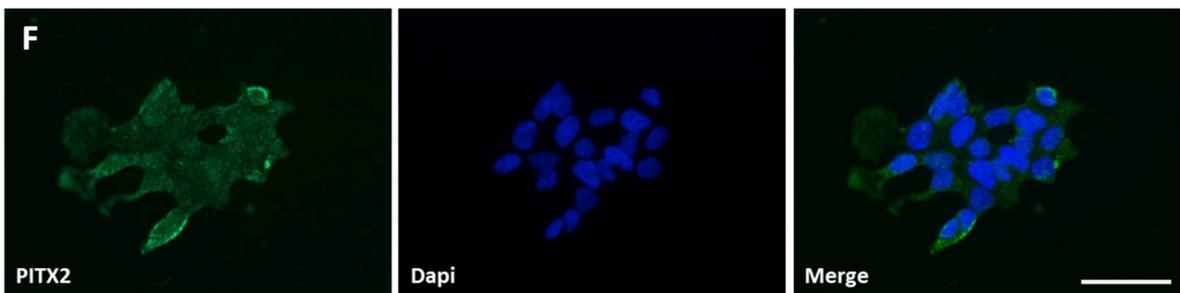
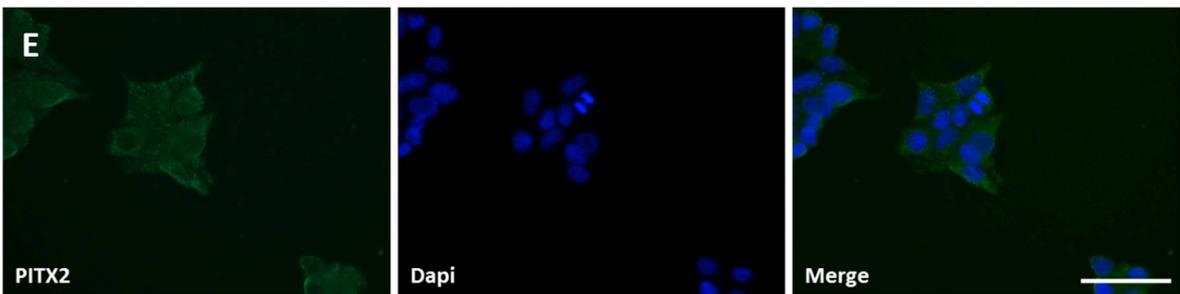
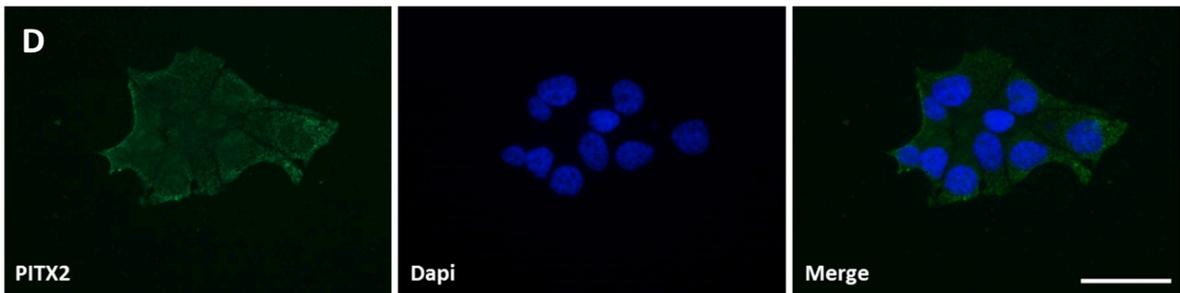
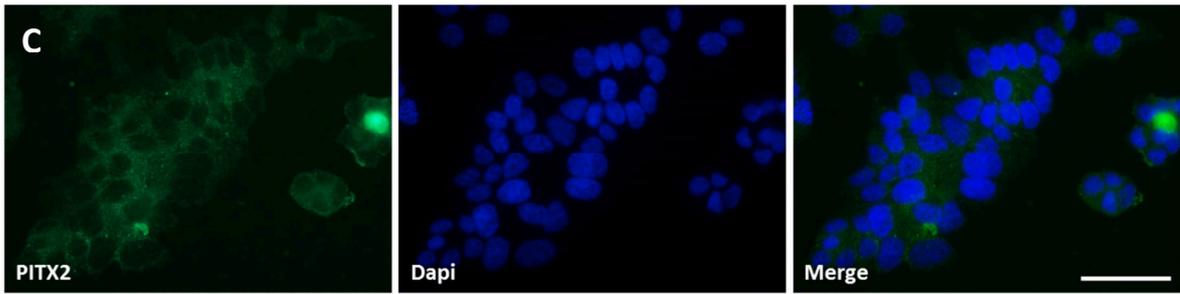
Zusätzlich zur immunocytochemischen Auswertung der morphologischen Beschaffenheit und des Aufbaus des Cytoskeletts der PITX2 Zellklone wurde auch die PITX2-Expression in induzierten und nichtinduzierten Zellklonen der Zelllinien 22Rv1 und PC3 verfolgt. Die

Zellklone zeigten starke Unterschiede im Ausmaß der PITX2-Expression nach Induktion durch Tetracyclin.

Die endogene PITX2-Expression in der Zelllinie 22Rv1 zeigte sich als deutliche Färbung im Cytoplasma, jedoch nicht im Zellkern (Abbildung 3.20 A). Durch die transiente PITX2 Transfektion nahm die Expression im Zellkern sehr stark zu und war deutlich zu erkennen (Abbildung 3.20 B). In den 22Rv1 Zellklonen B1, B21 und C11 lag im nichtinduzierten Zustand eine deutliche Färbung des Cytoplasmas, jedoch nur eine schwache bis gar keine Färbung des Zellkerns vor (Abbildung 3.20 C, E und G). Die PITX2-Induktion durch die Zugabe von Tetracyclin für 48 h ging mit einer deutlichen Zunahme der Expression im Kern einher (Abbildung 3.20 D, F und H). Hierbei war die Expression von PITX2 nach Induktion im Zellklon C11 am stärksten (Abbildung 3.20 H). In den nichtinduzierten Zellen war die basale Expression von PITX2 vor allem im Cytoplasma zu erkennen, durch die Aktivierung von PITX2 verlagerte sich diese Expression in den Zellkern.

In der Zelllinie PC3 war keine endogene PITX2-Expression detektierbar. Die Expression nach transienter PITX2a Transfektion zeigte ein ähnliches Muster wie in der 22Rv1 (Abbildung 3.21 A). Auch in den Zellklonen A5, A12 und A14 lag im nichtinduzierten Zustand eher eine cytoplasmatische und nur eine sehr schwache Expression von PITX2 im Zellkern vor (Abbildung 3.21 B, D und F). Nach PITX2-Induktion mittels der Zugabe von Tetracyclin wurde auch hier eine stärkere Expression von PITX2 im Zellkern deutlich (Abbildung 3.21 C, E und G).





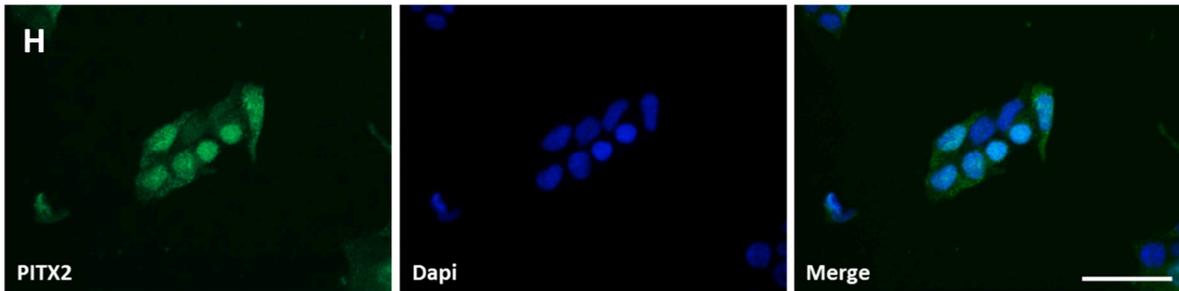
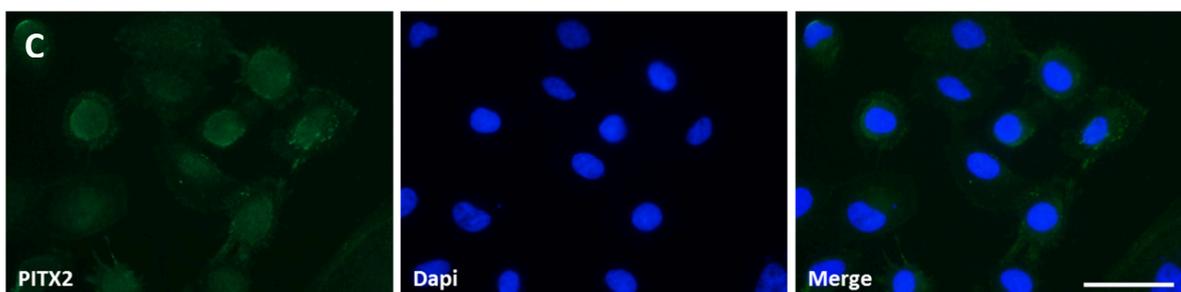
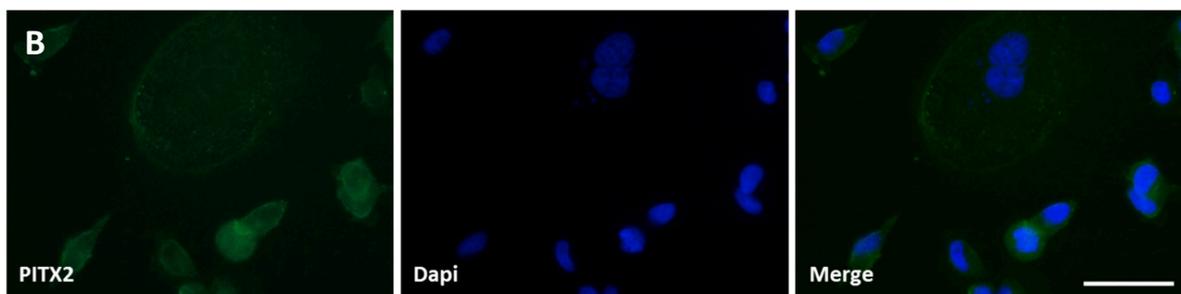
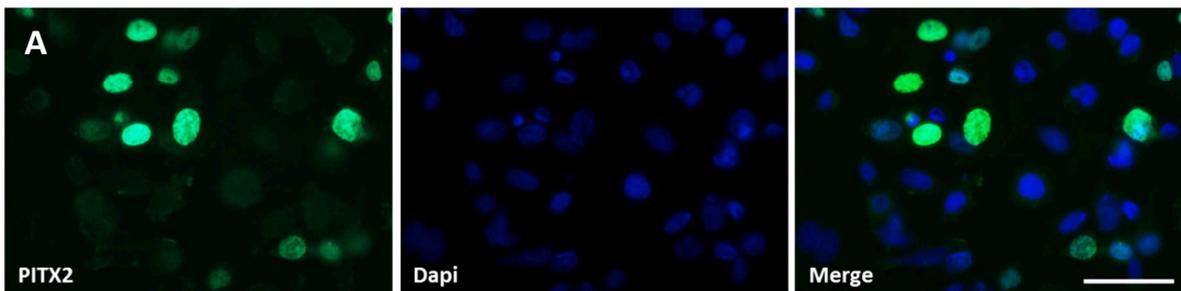


Abbildung 3.20: Immunocytochemie-Färbung der PITX2-Expression in der Zelllinie 22Rv1. **(A)** Endogene PITX2-Expression. **(B)** Transiente PITX2-Expression nach 48 h. **(C)** PITX2-Expression in stabilem Zellklon B1 ohne Tetracyclin-Induktion. **(D)** PITX2-Expression in stabilem Zellklon B1 nach Tetracyclin-Induktion für 48 h. **(E)** PITX2-Expression in stabilem Zellklon B21 ohne Tetracyclin-Induktion. **(F)** PITX2-Expression in stabilem Zellklon B21 nach Tetracyclin-Induktion für 48 h. **(G)** PITX2-Expression in stabilem Zellklon C11 ohne Tetracyclin-Induktion. **(H)** PITX2-Expression in stabilem Zellklon B21 nach Tetracyclin-Induktion für 48 h. **PITX2** = Färbung von PITX2 in den 22Rv1 Zellen. **Dapi** = Färbung des Zellkerns. **Merge** = übereinandergelegtes Bild aus PITX2- und Dapi-Färbung. **40x** Vergrößerung. **Maßstab:** 25 µm.



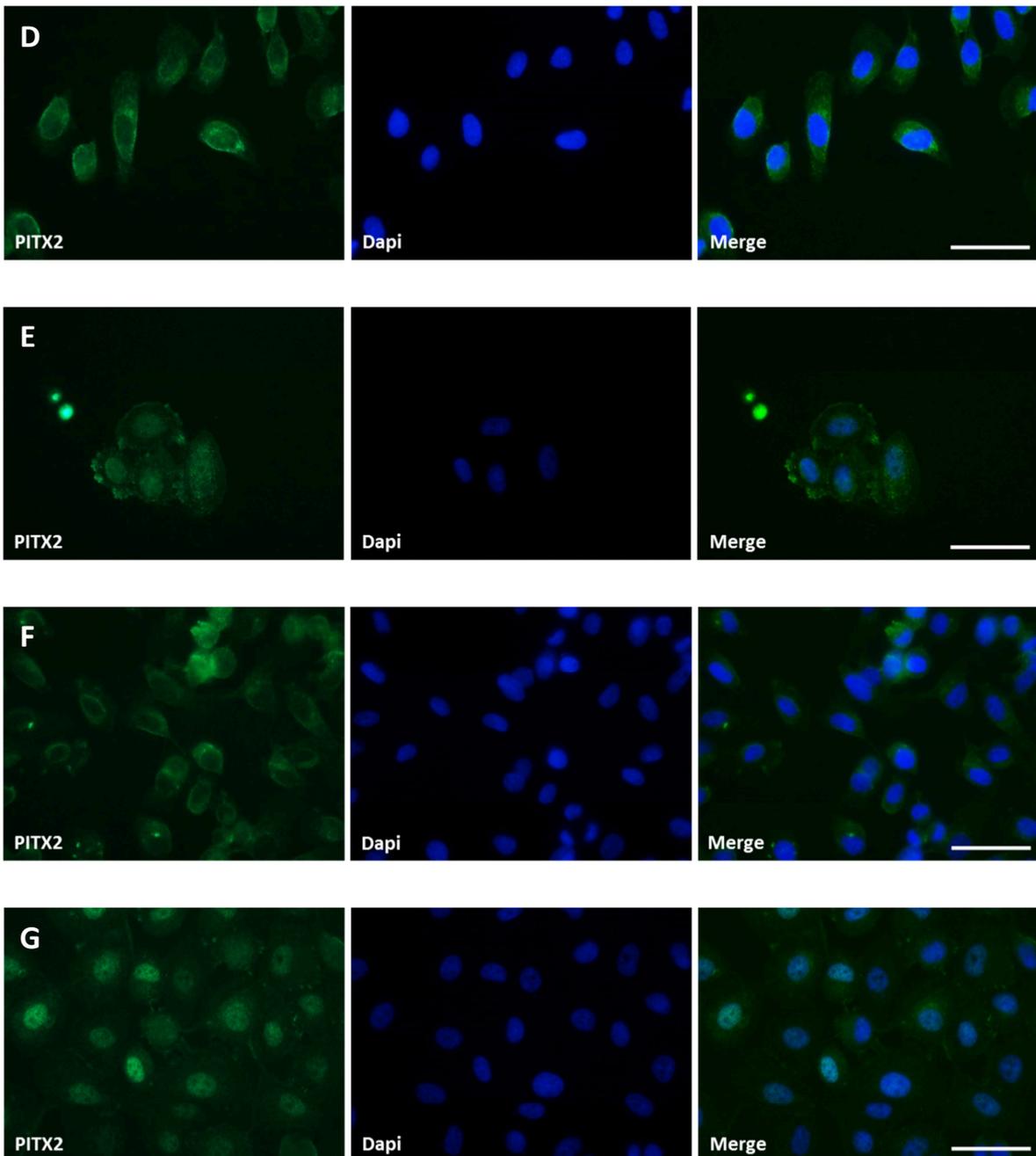


Abbildung 3.21: Immunocytochemischer Nachweis von PITX2 in der Zelllinie PC3. (A) Transiente PITX2-Expression nach 48 h. (B) PITX2-Expression in stabilem Zellklon A5 ohne Tetracyclin-Induktion. (C) PITX2-Expression in stabilem Zellklon A5 nach Tetracyclin-Induktion für 48 h. (D) PITX2-Expression in stabilem Zellklon A12 ohne Tetracyclin-Induktion. (E) PITX2-Expression in stabilem Zellklon A12 nach Tetracyclin-Induktion für 48 h. (F) PITX2-Expression in stabilem Zellklon A14 ohne Tetracyclin-Induktion. (G) PITX2-Expression in stabilem Zellklon A14 nach Tetracyclin-Induktion für 48 h. **PITX2** = Färbung von PITX2 in den 22Rv1 Zellen. **Dapi** = Färbung des Zellkerns. **Merge** = übereinandergelegtes Bild aus PITX2- und Dapi-Färbung. **40x** Vergrößerung. **Maßstab:** 25 µm.

3.5 Microarray-Analyse der Genexpression in PITX2 exprimierenden Zellklonen

Um den Einfluss von PITX2a auf die Genexpression zu überprüfen und mögliche direkte Zielgene zu identifizieren, wurde eine Microarray-Analyse mit RNA aus den stabil transfizierten PITX2a Klonen der androgenunabhängigen PC3 Zelllinie und der partiell androgenabhängigen 22Rv1 Zelllinie durchgeführt. Hierfür wurden jeweils zwei PITX2a Klone ausgewählt (PC3: Klon A5 und A12; 22Rv1: Klon B1 und B21), die das Gen 24 h nach der Induktion gut exprimieren (siehe Abbildung 3.11). Auf den Microarray wurde jeder PITX2a Klon mit vier biologischen Replikaten jeweils induziert und nichtinduziert aufgetragen. Zum Vergleich wurde auch die jeweilige Mutterzelllinie in vier biologischen Replikaten analysiert. Dadurch dass die Expressionsprofile der nichtinduzierten und der induzierten Proben der Zelllinie jeweils relativ nahe beieinander lagen, konnten die Proben beider Zellklone zu einem Pool zusammengefasst werden. Daher wurden in der Analyse nicht vier, sondern acht biologische Replikate, bestehend aus zwei Zellklonen, berücksichtigt. Auffallend war der Unterschied zwischen den Zelllinien 22Rv1 und PC3 bezüglich der differentiell exprimierten Gene in nichtinduzierten Proben gegenüber der Mutterzelllinie. In der 22Rv1 waren in diesem Vergleich nur wenige Gene differentiell exprimiert (Abbildung 3.22); hingegen waren in der PC3-Zelllinie mehr Gene gegenüber dem Mutterzellklon differentiell exprimiert als im Vergleich zwischen induzierten und nichtinduzierten Proben (Abbildung 3.23).

3.5.1 Auswertung der Microarray-Ergebnisse

Die Auswertung des Microarrays mit den stabilen PITX2a Klonen beider Zelllinien ergab eine deutliche Veränderung in der Genexpression durch PITX2. Durch die Induktion mit Tetracyclin wurden in der 22Rv1 Zelllinie 4578 Gene (Abbildung 3.22) und in der PC3 Zelllinie 2892 Gene (Abbildung 3.23) differentiell exprimiert. Davon wurden 992 Gene in beiden Zelllinien gleichermaßen differentiell exprimiert (Abbildung 3.24). Um die Anzahl der differentiell exprimierten Gene einzugrenzen, wurde ein *Cut-Off* bei einem *Fold Change* von 1,50 gelegt (d.h. die Genexpression war mindestens um das 1,5-fache gesteigert oder vermindert). Die weitere Analyse zur Identifizierung möglicher Zielgene von PITX2 wurde auf Gene beschränkt, die einen *Fold Change* $> 1,50$ aufwiesen. In der Zelllinie 22Rv1 verblieben nach dieser Eingrenzung noch 1461 Gene und in der Zelllinie PC3 noch 557 Gene. Die Zahl der Gene, die in beiden Zelllinien gleichermaßen verändert

exprimiert wurden, verringerte sich von 992 auf 148. In der folgenden Analyse wurden die differentiell exprimierten Gene zwischen nichtinduzierten Proben und Mutterzelllinie (nonind vs control), als auch die Schnittmengen innerhalb der Zelllinien nicht weiter berücksichtigt.

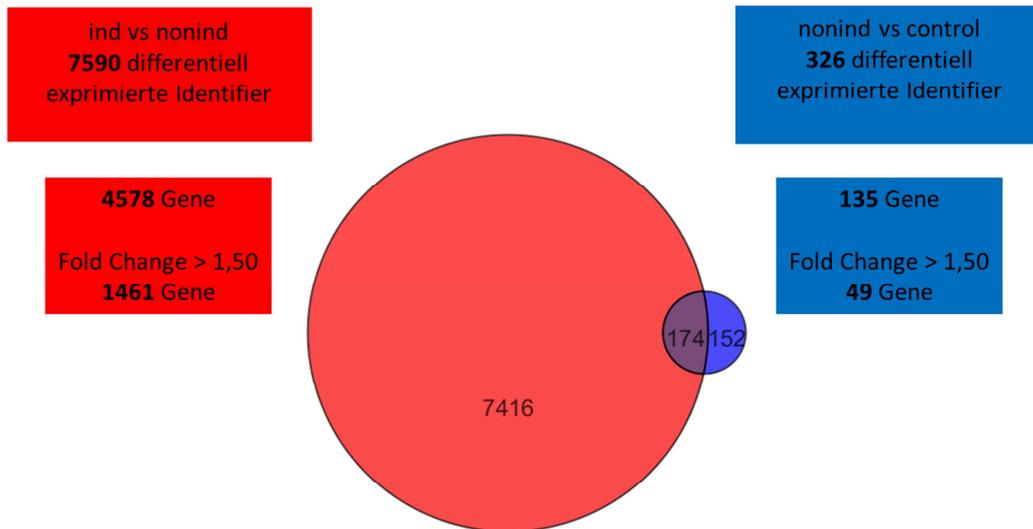


Abbildung 3.22: Auswertung der Microarray-Analyse der stabilen 22Rv1 PITX2a Zellklone B1 und B21. Die Expressionsprofile der beiden Zellklone konnten zur Analyse im induzierten und nichtinduzierten Zustand zu jeweils einem Gesamtprobensatz zusammengefasst werden. Im roten Kreis sind die 7590 differentiell exprimierten Identifier der induzierten gegenüber den nichtinduzierten Proben dargestellt. Im blauen Kreis die 326 differentiell exprimierten Identifier der nichtinduzierten gegenüber der Kontrolle dargestellt. 174 Identifier wurden in beiden Probensets gleichermaßen exprimiert. **Rot:** Die 7416 Identifier teilen sich auf 4578 Gene auf. **Blau:** Die 152 Identifier teilen sich in 135 Gene auf. Um die Anzahl der Gene einzugrenzen wurden in der weiteren Analyse nur noch die Gene betrachtet, die einen *Fold Change* > 1,50 besitzen. **Rot:** 1461 Gene. **Blau:** 49 Gene.

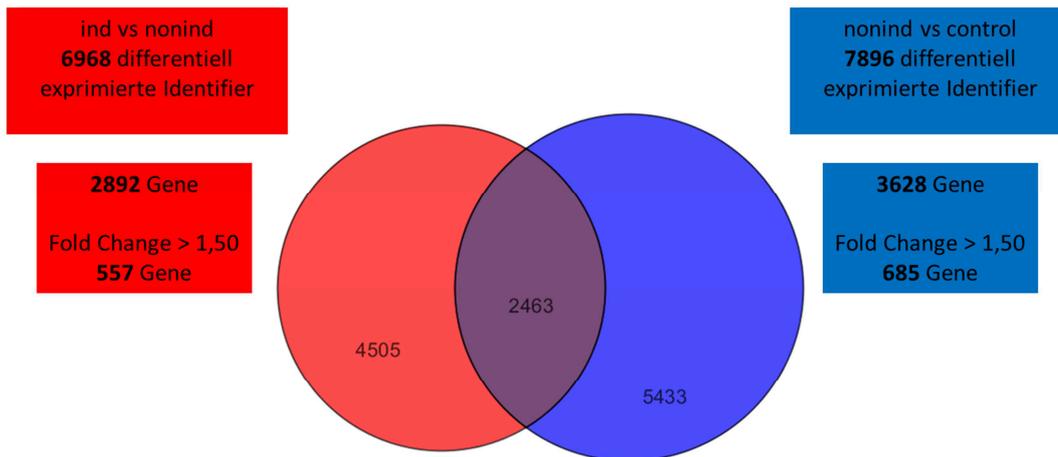


Abbildung 3.23: Auswertung der Microarray-Analyse der stabilen PC3 PITX2a Zellklone A5 und A14. Die Expressionsprofile der beiden Zellklone konnten zur Analyse im induzierten und nichtinduzierten Zustand zu jeweils einem Gesamtprobensatz zusammengefasst werden. Im roten Kreis sind die 6968 differenziell exprimierten Identifier der induzierten gegenüber den nichtinduzierten Proben dargestellt. Im blauen Kreis die 7896 differenziell exprimierten Identifier der nichtinduzierten gegenüber der Kontrolle dargestellt. 2463 Identifier wurden in beiden Probensets gleichermaßen exprimiert. **Rot:** Die 4505 Identifier teilen sich auf 2892 Gene auf. **Blau:** Die 5433 Identifier teilen sich in 3628 Gene auf. Um die Anzahl der Gene einzugrenzen wurden in der weiteren Analyse nur noch die Gene betrachtet, die einen *Fold Change* > 1,50 besitzen. **Rot:** 557 Gene. **Blau:** 685 Gene.

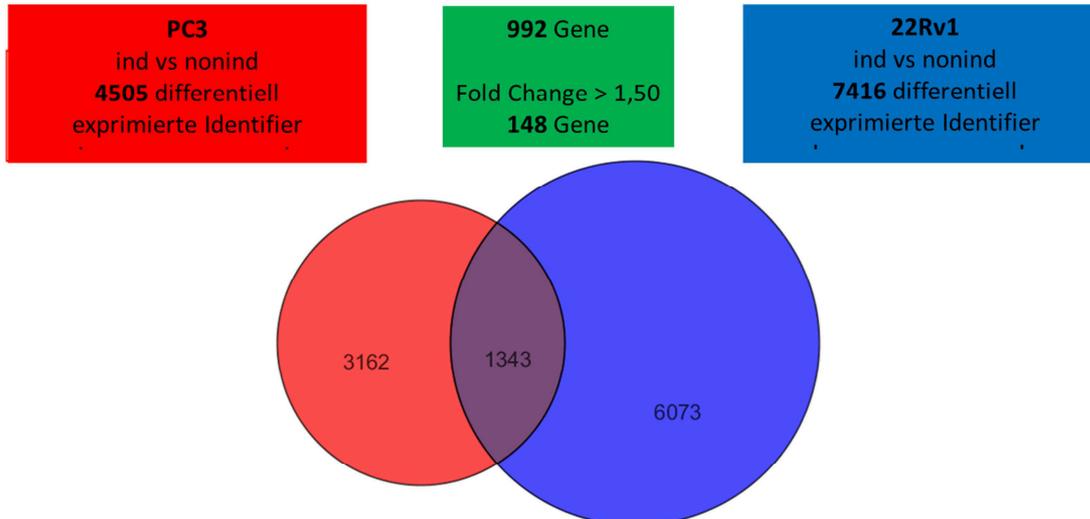


Abbildung 3.24: Auswertung der Microarray-Analyse des Vergleichs zwischen den stabilen 22Rv1 PITX2a Zellklonen und den stabilen PC3 PITX2a Zellklonen. Im roten Kreis sind die 4505 differenziell exprimierten Identifier der induzierten gegenüber den nichtinduzierten Proben in der PC3 dargestellt. Im blauen Kreis sind die 7416 differenziell exprimierten Identifier der induzierten gegenüber den nichtinduzierten Proben in der 22Rv1 dargestellt. 1343 Identifier wurden in beiden Zelllinien gleichermaßen exprimiert. **Rot:** Die 4505 Identifier teilen sich auf 2892 Gene auf. **Blau:** Die 7416 Identifier teilen sich in 4578 Gene auf. **Grün:** Die Schnittmenge beider Zelllinien umfasst 992 Gene. 148 Gene haben einen *Fold Change* > 1,50. Bei der weiteren Analyse dieses Datensatzes wird die komplette Schnittmenge von 992 Genen berücksichtigt.

Mit Hilfe des DAVID Annotation Tools wurden die differentiell exprimierten Gene hinsichtlich der zugeordneten biologischen Prozesse und molekularen Funktionen in den Datensätzen für die nichtinduzierten Klone gegenüber der Mutterzelllinie und für die nichtinduzierten Klone gegenüber den induzierten Klonen ausgewertet. Dabei wurden die Gene in Gruppen eingeteilt: Gene, die in der Zelllinien 22Rv1 entweder hoch- oder herunterreguliert sind und Gene, die in der Zelllinie PC3 entweder hoch- oder herunterreguliert sind.

Insgesamt umfassten die signifikant überrepräsentierten biologischen Prozesse in 22Rv1 im Datensatz der nichtinduzierten Klone gegen die Mutterzelllinie für die herunterregulierten Gene 4 GO-Terme und im Datensatz der hochregulierten Gene 21 GO-Terme. Nach der Benjamini-Hochberg Korrektur waren in beiden Datensätzen keine GO-Terme mehr signifikant reguliert (Tabelle 5.1 und 5.3). In denselben Datensätzen ergab, hinsichtlich der molekularen Funktion, die Liste der herunterregulierten Gene 4 signifikant regulierte GO-Terme und der hochregulierten Datensatz keinen GO-Term. Nach Benjamini-Hochberg Korrektur verblieben auch hier keine signifikanten GO-Terme (Tabelle 5.2).

In der PC3 umfassten die signifikant regulierten biologischen Prozesse im Datensatz der nichtinduzierten Klone gegen die Mutterzelllinie für die herunterregulierten Gene 109 GO-Terme und im Datensatz der hochregulierten Gene 63 GO-Terme. Durch die Benjamini-Hochberg Korrektur verminderten sich die signifikant regulierten GO-Terme in dem herunterregulierten Datensatz auf 4 und in dem hochregulierten Datensatz auf 8 (Tabelle 5.4 und 5.6). In denselben Datensätzen ergab, hinsichtlich der molekularen Funktion, der herunterregulierten Datensatz 13 signifikant überrepräsentierte GO-Terme und der hochregulierten Datensatz 15 GO-Terme. Durch die Benjamini-Hochberg Korrektur verblieb ein signifikanter GO-Term für die herunterregulierten Gene, hingegen keiner für die hochregulierten (Tabelle 5.5 und 5.7).

Die veränderten biologischen Prozesse in dem Datensatz nichtinduzierte Klone gegen Mutterzelllinie in den herunterregulierten Genen der Zelllinie 22Rv1 umfassten nur sehr wenige GO-Terme, welche aber u.a. mit einer Regulation der Zellproliferation zusammenhängen (Tabelle 5.1). Zu den hochregulierten Genen der Zelllinie 22Rv1 fanden

sich GO-Terme zum Knochenaufbau und der Regulation der Interleukin-1 α Produktion, sowie weniger deutlich signifikant zur Regulation der Zellproliferation (Tabelle 5.3).

In der Zelllinie PC3 umfassten die veränderten biologischen Prozesse bei den herunterregulierten Genen hauptsächlich GO-Terme zur Zelladhäsion, zum TGF β -Signalweg, der Morphogenese von Geweben und der Entwicklung des urogenitalen Systems. Auch GO-Terme der Regulation von Zellmigration und Lokomotion waren enthalten (Tabelle 5.4). Die molekularen Funktionen in demselben Datensatz betrafen Wachstumsfaktor-, SMAD- und transkriptionelle Regulationsaktivität sowie Ionen-Bindung (Tabelle 5.5). Die meisten GO-Terme ergab der Datensatz der hochregulierten Gene der nichtinduzierten Klone gegen die Mutterzelllinie der Zelllinie PC3. Demnach sind vor allem metabolische, jedoch auch biosynthetische Prozesse verändert. Auch GO-Terme zum Aufbau von Chromatin und Nukleosomen sowie der Regulation von Apoptose, Zelltod und Zelladhäsion / Zellmorphogenese tauchten auf (Tabelle 5.6).

Insgesamt umfassten die signifikant regulierten biologischen Prozesse in der 22Rv1 im Vergleich der nichtinduzierten Klone gegen die induzierten Klone für die herunterregulierten Gene 83 GO-Terme und im Datensatz der hochregulierten Gene 178 GO-Terme. Durch die Benjamini-Hochberg Korrektur begrenzten sich die signifikant regulierten GO-Terme in dem herunterregulierten Datensatz auf 8 und in dem hochregulierten Datensatz auf 18 (Tabelle 5.8 und 5.10). In demselben Vergleich ergab, hinsichtlich der molekularen Funktion, der herunterregulierte Datensatz 38 signifikante GO-Terme und der hochregulierte Datensatz 32 GO-Terme. Durch die Benjamini-Hochberg Korrektur begrenzten sich die signifikant regulierten GO-Terme in dem herunterregulierten Datensatz auf 5 und in dem hochregulierten Datensatz auf 4 (Tabelle 5.9 und 5.11).

In der PC3 umfassten die signifikant regulierten biologischen Prozesse im Datensatz der nichtinduzierten Klone gegen die induzierten Klone für die herunterregulierten Gene 57 GO-Terme und für die hochregulierten Gene 197 GO-Terme. Durch die Benjamini-Hochberg Korrektur verminderten sich die signifikant regulierten GO-Terme in dem herunterregulierten Datensatz auf einen und in dem hochregulierten Datensatz auf 13 (Tabelle 5.12 und 5.14). In denselben Datensätzen ergab, hinsichtlich der molekularen Funktion, der herunterregulierte Datensatz 12 GO-Terme und der hochregulierte

Datensatz 20 GO-Terme. Nach Benjamini-Hochberg Korrektur verblieben in beiden Datensätzen keine signifikant regulierten GO-Terme (Tabelle 5.13 und 5.15).

Die veränderten biologischen Prozesse in dem Vergleich induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, umfassten bei den herunterregulierten Genen der Zelllinie 22Rv1 hauptsächlich Proteinbiosynthese, Drüsenentwicklung, metabolische Prozesse, negative Regulation des Zelltods, Regulation der Zellproliferation, Zellzyklus-relevante Prozesse und Prozesse, die bei der Festlegung der Achsensymmetrie beteiligt sind (Tabelle 5.8).

Die molekularen Funktionen im selbem Datensatz umfassten GO-Terme, die mit der Aktivität von Transmembrantransportern und Methyltransferasen, Nukleosid- und Nukleotid-Bindung, Nuklease-Aktivität und speziell Ribonukleotidbindung und -aktivität zusammenhängen (Tabelle 5.9).

Die GO-Terme für die hochregulierten Gene im Vergleich induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone der Zelllinie 22Rv1 bezogen sich auf die biologischen Prozesse Zelladhäsion, Zellmorphogenese, Zellbewegung und Zellmigration. Außerdem angesprochen sind Prozesse der Regulation von Zellproliferation und Wachstum, der intrazellulären Signalkaskade, der Regulation von Transkription und biosynthetischer Prozesse, der Hormonantwort auf einen Stimulus, der neuronalen Entwicklung, der Regulation der Phosphorylierung, der Regulation der Knochenmineralisierung / Ossifizierung / Muskelzellendifferenzierung und der positiven Regulation von Apoptose und Zelltod (Tabelle 5.10).

Die molekularen Funktionen im selbem Datensatz umfassten GO-Terme für Phosphoinositid-Bindung, die Aktivität von transkriptionellen Aktivatoren, Phosphatase-Aktivität, Cytoskelettprotein-Bindung, Aktivität von Transkriptionsrepressoren und -kofaktoren, Aktin-, DNA- und Wachstumsfaktor-Bindung (Tabelle 5.11).

Zu den herunterregulierten Genen der Zelllinie PC3 im Vergleich nichtinduzierte Klone gegen induzierte Klone umfassten die biologischen Prozesse GO-Terme zur Entwicklung und Morphogenese des Skelettsystems, der positiven Regulation von Entwicklungsprozessen und speziell der Regulation der Ossifikation und der Knochenmineralisierung. Außerdem fanden sich Prozesse, die die Entwicklung von Drüsen und des Vorderhirns, die Differenzierung von Neuronen, Rezeptorprotein-Signalwege, die

Regulation von Zellmigration und Zellbewegung, die negative Regulation der Transkription, die zelluläre biosynthetische Prozesse und die Genexpression sowie die Musterbildung während der Entwicklung beinhalten (Tabelle 5.12).

Die molekularen Funktionen zu demselben Datensatz umfassten GO-Terme für die Sialyltransferase-Aktivität, die Aktivität von GTPase Aktivatoren und Regulatoren, für die Wachstumsfaktorbindung, die Aktivität von Transmembranrezeptor-Protein-Tyrosinkinasen und für die cAMP-abhängiger Proteinkinase-Inhibitoren sowie für die SNARE Bindung (Tabelle 5.13).

Die GO-Terme zu biologischen Prozessen für die hochregulierten Gene der Zelllinie PC3 im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen induzierte Klone beinhalten die Regulation der Zellproliferation und -migration, der epithelialen Zelldifferenzierung, der Ektoderm- und Epithelentwicklung, der Keratinocytdifferenzierung, der Wundantwort und der Antwort auf hormonelle und mechanische Stimuli. Außerdem fanden sich Prozesse, die für die Regulation von Ossifikation und Osteoblasten-Differenzierung, die positive Regulation der Signaltransduktion, die Regulation von zellulären biosynthetischen Prozessen und der Transkription, von Rezeptorprotein-Signalwegen, der Neuronen-Differenzierung, der Neuronen- und Drüsenentwicklung, des Zellzyklus-Arrests, die negative Regulation von Apoptose und Zelltod und für die Zellbewegung und Zellmotilität von Bedeutung sind. Weitere Prozesse waren Cytokin-vermittelte Signalwege, die anatomische Strukturanordnung, embryonale Organentwicklung, Regulation von Proteintransport und -lokalisation, BMP-Signalweg und Signalweg-begrenzte SMAD Protein-Phosphorylierung, Lymphknotenentwicklung, Tumornekrosefaktor-vermittelter Signalweg, die Regulation der Proliferation von Leukocyten und Lymphocyten sowie die Entwicklung von Hinterhirn und Großhirnrinde (Tabelle 5.14).

Die molekularen Funktionen im selbem Datensatz umfassten GO-Terme für die Cytokin-Aktivität, Hydrolase-Aktivität, Tumornekrosefaktor-Rezeptor Bindung, Enzyminhibitor-Aktivität, Aktivität von Transkriptionsfaktoren, Transmembranrezeptor-Protein-Tyrosinkinasen und Steroidhormon-Rezeptoren, Cytoskelettprotein-Bindung und die Interleukin 1 Rezeptor Bindung (Tabelle 5.15).

Aus einem externen Gewebedatensatz [8] wurden die Gene extrahiert, die in den darin untersuchten 151 Tumorgeweben positiv mit der Expression von PITX2 korrelieren. Dies waren 454 Gene. Davon waren 59 Gene in den PITX2-Zellklonen differentiell exprimiert, 26 Gene in der Zelllinie PC3 und 40 Gene in der Zelllinie 22Rv1. Sieben Gene waren in beiden Zelllinien gleichermaßen differentiell exprimiert (in Rot gekennzeichnet). Unter den 26 differentiell exprimierten Genen in PC3 waren jeweils 13 Gene hoch- und herunterreguliert. Davon hatten 5 der hochregulierten und eines der herunterregulierten Gene einen *Fold Change* Wert $> 1,50$. In der Zelllinie 22Rv1 waren 29 Gene hoch- und 11 Gene herunterreguliert; bei 11 hochregulierten und 5 herunterregulierten Genen war der *Fold Change* Wert $> 1,50$ (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Korrelation zwischen PITX2 und Genen aus dem Gewebedatensatz aus Taylor et al. [8] Gene sind mit *Fold Change* Werten angegeben. *Fold Change*: x-fache Expressionsveränderung bezogen auf die Ausgangsexpression in Abhängigkeit der PITX2-Reexpression in den Microarrays. Rot: Gene, die in beiden Microarrays gleichermaßen vorkommen. †: Gene, deren *Fold Change* Wert über 1,50 liegt.

Gen	Similarity	PC3 hochreguliert	PC3 runterreguliert	22Rv1 hochreguliert	22Rv1 runterreguliert
<i>PITX2</i>	1	-	-	-	1,57 †
<i>FAM43B</i>	0,906	-	1,23	-	-
<i>FAM131C</i>	0,899	-	-	1,47	-
<i>GPR153</i>	0,897	-	-	1,41	-
<i>SHOX2</i>	0,895	-	-	1,81 †	-
<i>HGFAC</i>	0,894	-	-	1,18	-
<i>ARTN</i>	0,893	-	-	1,57 †	-
<i>GPC2</i>	0,890	1,18	-	1,79 †	-
<i>GPT</i>	0,889	-	-	-	1,78 †
<i>RGS14</i>	0,888	-	1,11	-	-
<i>PDLIM2</i>	0,880	-	-	1,37	-
<i>RADIL</i>	0,880	-	-	1,32	-
<i>PRDM13</i>	0,878	-	-	-	1,34
<i>DUSP9</i>	0,878	-	1,23	-	1,34
<i>SEMA6C</i>	0,878	-	-	2,06 †	-
<i>TNFRSF18</i>	0,877	-	-	1,39	-
<i>C1orf35</i>	0,877	-	-	-	1,23
<i>SPTBN4</i>	0,875	-	-	1,25	-
<i>CSPG5</i>	0,875	-	-	1,27	-
<i>RAB11FIP5</i>	0,874	-	-	1,38	-
<i>HOXA1</i>	0,874	-	-	2,46 †	-

<i>MLXIPL</i>	0,872	-	-	1,49	-
<i>BBC3</i>	0,872	-	-	1,48	-
<i>WNT7A</i>	0,872	-	1,95 †	-	-
<i>HLX</i>	0,871	-	1,20	-	-
<i>BTNL9</i>	0,870	-	1,36	1,82 †	-
<i>CHST13</i>	0,870	1,39	-	-	-
<i>AMN</i>	0,870	-	1,27	-	-
<i>KCTD8</i>	0,869	3,32 †	-	-	-
<i>KCNH2</i>	0,867	-	-	1,26	-
<i>GSDMD</i>	0,867	-	-	1,20	-
<i>KCTD17</i>	0,866	-	-	1,17	-
<i>SYN2</i>	0,865	-	1,17	-	-
<i>EMX1</i>	0,864	1,54 †	-	-	-
<i>GTPBP3</i>	0,862	-	1,18	-	1,31
<i>FAM181B</i>	0,861	-	1,27	-	-
<i>TPPP</i>	0,860	-	-	1,64 †	-
<i>C16orf59</i>	0,860	-	-	-	1,36
<i>PACSIN1</i>	0,859	-	1,13	-	-
<i>CRB3</i>	0,859	1,43	-	-	-
<i>CADM3</i>	0,859	1,45	-	-	-
<i>DPF1</i>	0,859	-	-	1,12	-
<i>GUCY2D</i>	0,859	-	-	1,57 †	-
<i>MYCN</i>	0,858	1,35	-	-	-
<i>TRPM2</i>	0,857	-	-	-	1,62 †
<i>CTAG2</i>	0,856	-	-	-	1,27
<i>KLF17</i>	0,855	-	1,34	-	-
<i>SYNGR3</i>	0,855	1,36	-	1,50 †	-
<i>MYO7B</i>	0,855	-	1,47	-	-
<i>SLC2A6</i>	0,855	1,25	-	-	-
<i>FGFBP3</i>	0,855	-	-	-	1,69 †
<i>LHX1</i>	0,853	1,63 †	-	-	-
<i>EPHA1</i>	0,853	1,59 †	-	2,09 †	-
<i>CROCC</i>	0,852	-	-	1,21	-
<i>UNC13D</i>	0,851	1,25	-	-	-
<i>BCAS4</i>	0,851	-	-	1,38	-
<i>TRMT61A</i>	0,850	-	-	-	1,54 †
<i>KLC3</i>	0,850	-	-	2,71 †	-
<i>HPSE</i>	0,850	1,50 †	-	1,31	-

In demselben Gewebedatensatz [8] zeigten nur 13 Gene eine signifikant negative Korrelation mit PITX2. Von diesen wurden nur 5 Gene in der Zelllinie PC3 differentiell exprimiert. Davon wurden 3 Gene hoch- und 2 Gene herunterreguliert. In der Zelllinie 22Rv1 wurde keines der Gene, die negativ mit PITX2 korrelieren, exprimiert (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Antikorrelation zwischen PITX2 und Genen aus dem Gewebedatensatz aus Taylor et al. [8] Gene sind mit *Fold Change* Werten angegeben. *Fold Change*: x-fache Expressionsveränderung bezogen auf die Ausgangsexpression in Abhängigkeit der PITX2-Reexpression in den Microarrays.

Gen	Similarity	PC3 hochreguliert	PC3 runterreguliert	22Rv1 hochreguliert	22Rv1 runterreguliert
FBXO3	-0,822	-	-	-	-
APPBP2	-0,812	-	-	-	-
DPP8	-0,811	-	-	-	-
UBE2Q2	-0,811	-	-	-	-
EXOC5	-0,809	1,05	-	-	-
MUDENG	-0,809	1,09	-	-	-
CUL2	-0,808	-	-	-	-
AQR	-0,806	-	-	-	-
IREB2	-0,806	-	-	-	-
SOS2	-0,804	1,33	-	-	-
PPP3CB	-0,802	-	1,05	-	-
CLOCK	-0,800	-	-	-	-
UBL3	-0,800	-	1,12	-	-

Im Gesamtkontext dieser Arbeit ist der WNT-Signalweg von großer Bedeutung. Aufgrund dessen war eine Analyse der WNT-abhängigen Gene in den differentiell exprimierten Genen der Microarrays unerlässlich. Der GO-Term 0016055: „*WNT signaling*“ umfasst insgesamt 183 Gene, von denen 69 Gene in den Microarrays differentiell exprimiert wurden. Davon wurden 55 Gene durch die PITX2-Reexpression in der Zelllinie 22Rv1 und 22 Gene in der Zelllinie PC3 differentiell exprimiert. 7 Gene kamen dabei in beiden Zelllinien gleichermaßen vor (in Rot gekennzeichnet). Von den 55 Genen in der Zelllinie 22Rv1 waren 42 hochreguliert und 13 herunterreguliert. In den 42 Genen waren 14 Gene, in den 13 Genen 3 Gene mit einem *Fold Change* Wert > 1,50 enthalten. Von den 22 WNT-relevanten Genen waren in der Zelllinie PC3 13 herunterreguliert und 9 hochreguliert,

davon eines der herunterregulierten und 5 der hochregulierten Genen mit einem *Fold Change* > 1,50 (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Auswertung des GO Terms 0016055: *WNT signaling* in Abhängigkeit der differentiell exprimierten Gene der Microarrays. 69 Gene aus insgesamt 183 Genen, die in dem GO Term enthalten sind, wurden in den Microarrays differentiell exprimiert. Gene sind mit *Fold Change* Werten angegeben. *Fold Change*: x-fache Expressionsveränderung bezogen auf die Ausgangsexpression in Abhängigkeit der PITX2-Reexpression in den Microarrays. Rot: Gene, die in beiden Microarrays gleichermaßen vorkommen. †: Gene, deren *Fold Change* Wert über 1,50 liegt.

Gen	PC3 hochreguliert	PC3 runterreguliert	22Rv1 hochreguliert	22Rv1 runterreguliert
<i>AES</i>	-	-	1,34	-
<i>APC</i>	-	-	1,22	-
<i>APCDD1</i>	1,98 †	-	-	-
<i>ARL6</i>	-	-	1,49	-
<i>ASB6</i>	-	-	-	1,33
<i>AXIN2</i>	-	-	1,32	-
<i>BTRC</i>	-	-	1,38	-
<i>CCND1</i>	-	-	-	1,36
<i>CCNE1</i>	-	-	1,30	-
<i>CCNY</i>	-	1,20	-	-
<i>CD24</i>	-	-	4,58 †	-
<i>CD44</i>	-	-	-	2,33 †
<i>CDK14</i>	-	-	-	1,30
<i>CELSR2</i>	-	-	2,68 †	-
<i>CSNK1A1</i>	-	1,12	-	-
<i>CSNK1G1</i>	-	1,12	1,43	-
<i>CTNNB1</i>	-	-	1,18	-
<i>CTR9</i>	-	-	1,20	-
<i>CXXC4</i>	-	-	1,42	-
<i>CYLD</i>	-	-	1,58 †	-
<i>DIXDC1</i>	-	1,43	4,06 †	-
<i>DKK1</i>	1,21	-	-	-
<i>DVL1</i>	-	1,13	-	-
<i>DVL3</i>	-	-	1,22	-
<i>FBXW11</i>	-	-	-	1,36
<i>FRAT1</i>	-	-	2,53 †	-
<i>FRAT2</i>	-	1,17	-	-
<i>FZD1</i>	2,21 †	-	-	-
<i>FZD3</i>	-	-	1,39	-
<i>FZD7</i>	-	-	4,22 †	-
<i>FZD8</i>	-	-	-	1,28

GRK5	1,38	-	1,37	-
GSK3A	-	-	1,26	-
GSK3B	-	-	1,26	-
HBP1	1,10	-	1,59 †	-
KLHL12	-	-	1,17	-
KREMEN1	-	-	1,69 †	-
LRRFIP2	1,57 †	-	-	1,29
MESDC2	-	-	-	1,35
MITF	-	1,39	1,62 †	-
NKD2	-	-	1,31	-
NLK	-	-	1,20	-
NPHP3	-	-	1,31	-
NXN	2,12 †	-	-	-
PPM1A	-	-	1,35	-
PRKAA1	-	-	1,31	-
PTK7	-	-	1,19	-
RNF138	-	-	1,61 †	-
RNF146	1,16	-	1,13	-
RNF43	-	-	-	2,51 †
RTF1	-	-	1,20	-
RYK	-	1,16	-	-
SENP2	-	-	1,12	-
SOSTDC1	-	-	-	2,51 †
TACSTD2	-	-	1,61 †	-
TCF7	-	-	1,16	-
TLE1	-	1,21	-	-
TLE2	-	-	2,08 †	-
USP34	-	-	1,33	-
WNT10B	-	1,18	-	1,33
WNT11	-	-	1,35	-
WNT2	-	-	-	1,47
WNT3	-	-	1,51 †	-
WNT5B	-	1,43	-	-
WNT7A	-	1,95 †	-	-
WNT7B	1,91 †	-	-	-
WWOX	-	-	-	1,31
XIAP	-	-	1,67 †	-
ZNRF3	-	1,24	-	-

Auch die Gene des GO-Terme 0030521: „*Androgen receptor signaling*“ und des GO-Terme 0050681: „*Androgen receptor binding*“ wurden mit der Microarray Auswertung

verglichen. Zusammengefasst sind in beiden GO-Termini 61 Gene enthalten, von denen insgesamt 25 Gene in beiden Microarrays differentiell exprimiert sind. Zwei Gene waren in beiden Zelllinien gleichermaßen differentiell exprimiert (in Rot gekennzeichnet). Von den 25 Genen wurden 10 in der Zelllinie PC3 exprimiert, 4 wurden hoch- und 6 herunterreguliert. In der Zelllinie 22Rv1 wurden insgesamt 17 Gene differentiell exprimiert, davon wurden 10 hoch- und 7 herunterreguliert. Zwei Gene kamen in beiden Zelllinien gleichermaßen vor. Nur bei einem der differentiell exprimierten Gene der Zelllinie PC3 war ein *Fold Change* > 1,50 gemessen. Vier hochregulierte und zwei herunterregulierte Gene in der Zelllinie 22Rv1 hatten einen *Fold Change* Wert > 1,50 (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Auswertung der GO Terms 0030521: *Androgen receptor signaling* und 0050681: *Androgen receptor binding* in Abhängigkeit der differentiell exprimierten Gene der Microarrays. Zusammengefasst sind 24 Gene aus insgesamt 61 Genen, die in beiden GO Terms enthalten sind, in den Microarrays differentiell exprimiert. Die Gene sind mit *Fold Change* Werten angegeben. *Fold Change*: x-fache Expressionsveränderung bezogen auf die Ausgangsexpression in Abhängigkeit der PITX2-Reexpression in den Microarrays. Rot: Gene, die in beiden Microarrays gleichermaßen vorkommen. †: Gene, deren *Fold Change* Wert über 1,50 liegt. (●) Gene, die nur im GO Term 0030521: *Androgen receptor signaling* enthalten sind. (*)Gene, die nur im GO Term 0050681: *Androgen receptor binding* enthalten sind.

Gen	PC3 hochreguliert	PC3 runterreguliert	22Rv1 hochreguliert	22Rv1 runterreguliert
ARID1A ●	-	-	1,30	-
BRCA1	-	1,14	-	-
CALR *	-	-	-	1,39
CCNE1	-	-	1,30	-
CTNNB1	-	-	1,18	-
FHL2	1,27	-	-	-
GRIP1	-	-	3,24 †	-
KDM3A	-	1,21	1,49	-
MED13 ●	-	-	1,49	-
MED24 ●	-	1,58 †	-	-
MED30 ●	-	-	1,28	-
NCOA1	-	-	1,55 †	-
NCOA3	-	-	1,84 †	-
NCOA4	1,23	-	-	-
NKX3-1 ●	-	-	-	7,37 †
NRIP1	-	1,33	-	-

PIAS1	-	-	-	1,28
PIAS2	-	1,14	-	1,21
PPAP2A ●	-	-	-	2,12 †
PRMT2 *	-	-	1,51 †	-
PSMC3IP *	-	-	-	1,35
RAN	-	-	-	1,19
RNF14	1,13	-	-	-
TRIM68 *	-	1,21	-	-
WIPI1 *	1,10	-	-	-

3.5.2 Verifizierung der differentiellen Genregulation mittels qRT-PCR

Die Expression der Gene *CDKN1B* (p27), *CDKN2B* (p15), *CDKN1A* (p21), *SMAD3*, *BMP2*, *PDLIM1*, *GADD45A*, *SOX2*, *IRS2*, *KRT6A*, *AR* und *CTNNB1* wurden mittels qRT-PCR analysiert, um die Ergebnisse des Microarrays verifizieren zu können (Tabelle 3.5, Abbildung 3.25).

Die Gene *CDKN1B*, *CDKN2B* und *CDKN1A* kodieren für die Zellzyklusinhibitoren p27^{KIP1}, p15^{INK4B} und p21^{CIP1}. Diese regulieren den Zellzyklus während der G1-Phase und sind Zielgene des TGFβ/BMP-Signalwegs. Das p21^{CIP1}-Protein ist zudem in der Lage, Seneszenz zu induzieren. Ausschließlich *CDKN2B* wurde durch die PITX2 Induktion in beiden Zelllinien differentiell exprimiert. In der Zelllinie PC3 zeigte die PITX2 Induktion keinen Effekt auf die Expression von *CDKN1B* und *CDKN1A* (Abbildung 3.25 A und C). Bei beiden Genen lag eher eine basale Expression ohne Unterschiede zwischen den Zellklonen vor. *CDKN2B* zeigte die erwartete Hochregulierung durch die PITX2-Reexpression in den induzierten Zellklonen (Abbildung 3.25 B). Auch in der Zelllinie 22Rv1 wurde seine Expression in den induzierten Zellklonen leicht hochreguliert und für die Gene *CDKN1B* und *CDKN1A* war der Effekt in dieser Zelllinie stärker (Abbildung 3.25 A, B und C).

SMAD3 und *BMP2* sind wichtige Komponenten des TGFβ/BMP Signalwegs. *SMAD3* wird im Vergleich zur Mutterzelllinie und den nichtinduzierten Klonen in den induzierten Klonen der PC3 Zelllinie herunterreguliert. In der Zelllinie 22Rv1 war eine Hochregulierung in den induzierten Klonen erkennbar (Abbildung 3.26 D). *BMP2* wird in beiden Zelllinien in den induzierten Klonen durch die PITX2-Reexpression gleichermaßen hochreguliert (Abbildung 3.25 E).

PDLIM1 ist ein Protein-Interaktionspartner von PITX2. Durch die Reexpression von PITX2 wurde auch *PDLIM1* in den induzierten Zellklonen von 22Rv1 hochreguliert, jedoch nur im Zellklon B21 signifikant. Die durch den Microarray vorhergesagte Hochregulation in der Zelllinie PC3 war nicht zu erkennen (Abbildung 3.25 F).

Die Transkription von *GADD45A* wird u.a. durch DNA-Schäden induziert und ist im Prostatakarzinom epigenetisch reprimiert [159]. *GADD45A* war in den induzierten Zellklonen beider Zelllinien gegenüber den Kontrollen signifikant hochreguliert (Abbildung 3.25 G).

SOX2 spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung von neuronalen und embryonalen Stammzellen. In der Zelllinie PC3 wurde *SOX2* in den induzierten Zellklonen signifikant hochreguliert. In 22Rv1 war keine Expressionsveränderung durch die PITX2-Reexpression zu beobachten (Abbildung 3.25 H).

IRS2 ist ein cytoplasmatisches Signalmolekül, welches als molekularer Adapter zwischen IGFR und nachgeschalteten Genen fungiert. In der Zelllinie PC3 war *IRS2* laut qRT-PCR in den induzierten Klonen signifikant hochreguliert; in 22Rv1 war keine signifikante Veränderung zu erkennen (Abbildung 3.25 I).

KRT6A ist ein Typ II Cytokeratin, das besonders in Plattenepithelien zu finden ist. In der Zelllinie PC3 war *KRT6A* gegenüber den Kontrollen signifikant hochreguliert. Die Zelllinie 22Rv1 zeigt keine Expression von *KRT6A* (Abbildung 3.25 J).

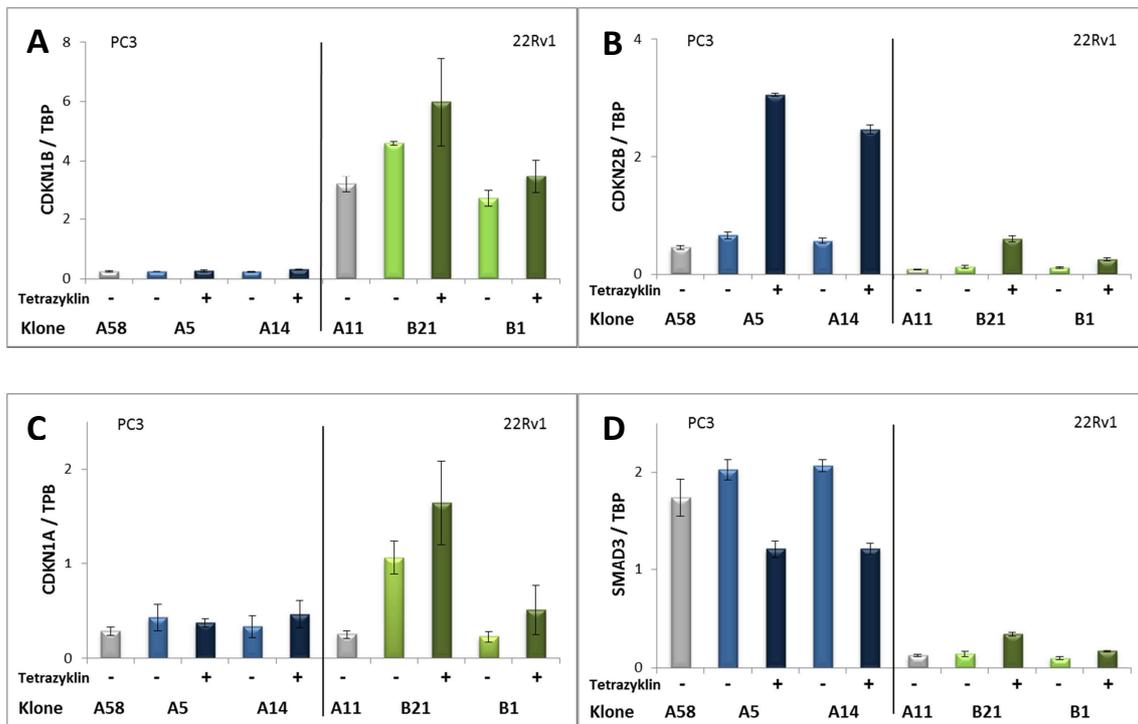
AR zeigte in der Zelllinie 22Rv1 keine Expressionsveränderung durch die PITX2-Reexpression in den induzierten Klonen im Vergleich zu den Kontrollen. In der PC3 war keine Expression des *AR* vorhanden (Abbildung 3.25 K).

CTNNB1 kodiert für β -Catenin, ein Cytoskelettprotein und einen wichtigen Regulator im WNT-Signalweg. Es war keine signifikante Expressionsveränderung in der Zelllinie PC3 zu erkennen. Durch die PITX2-Reexpression zeigte sich in der 22Rv1 eine signifikante Hochregulierung im induzierten Zellklon B21 (Abbildung 3.25 L).

Tabelle 3.5: Auswahl der Gene, die mittels qRT-PCR analysiert wurden. Die Werte der Hoch- und Runterregulation in den Zelllinien PC3 und 22Rv1 beziehen sich auf die berechneten *Fold Change*-Werte. Die Gene, bei denen keine *Fold Change*-Werte angegeben sind, wurden aufgrund ihrer Relevanz im Gesamtkontext ausgewählt. *Fold Change*: x-fache Expressionsveränderung bezogen auf die Ausgangsexpression in Abhängigkeit der PITX2-Reexpression in den Microarrays. Rot:

Gene, die in beiden Microarrays gleichermaßen vorkommen. †: Gene, deren *Fold Change* Wert über 1,50 liegt.

Gen	PC3 hochreguliert	PC3 runterreguliert	22Rv1 hochreguliert	22Rv1 runterreguliert
<i>CDKN1B</i> (p27)	-	-	-	-
<i>CDKN2B</i> (p15)	4,04 †	-	2,04 †	-
<i>CDKN1A</i> (p21)	-	-	-	-
<i>SMAD3</i>	-	1,54 †	1,59 †	-
<i>BMP2</i>	5,50 †	-	3,95 †	-
<i>PDLIM1</i>	1,10	-	3,05 †	-
<i>GADD45A</i>	2,09 †	-	4,18 †	-
<i>SOX2</i>	4,04 †	-	-	-
<i>IRS2</i>	6,33 †	-	-	2,50 †
<i>KRT6A</i>	17,76 †	-	-	-
<i>AR</i>	-	-	-	-
<i>CTNNB1</i>	-	-	1,18	-



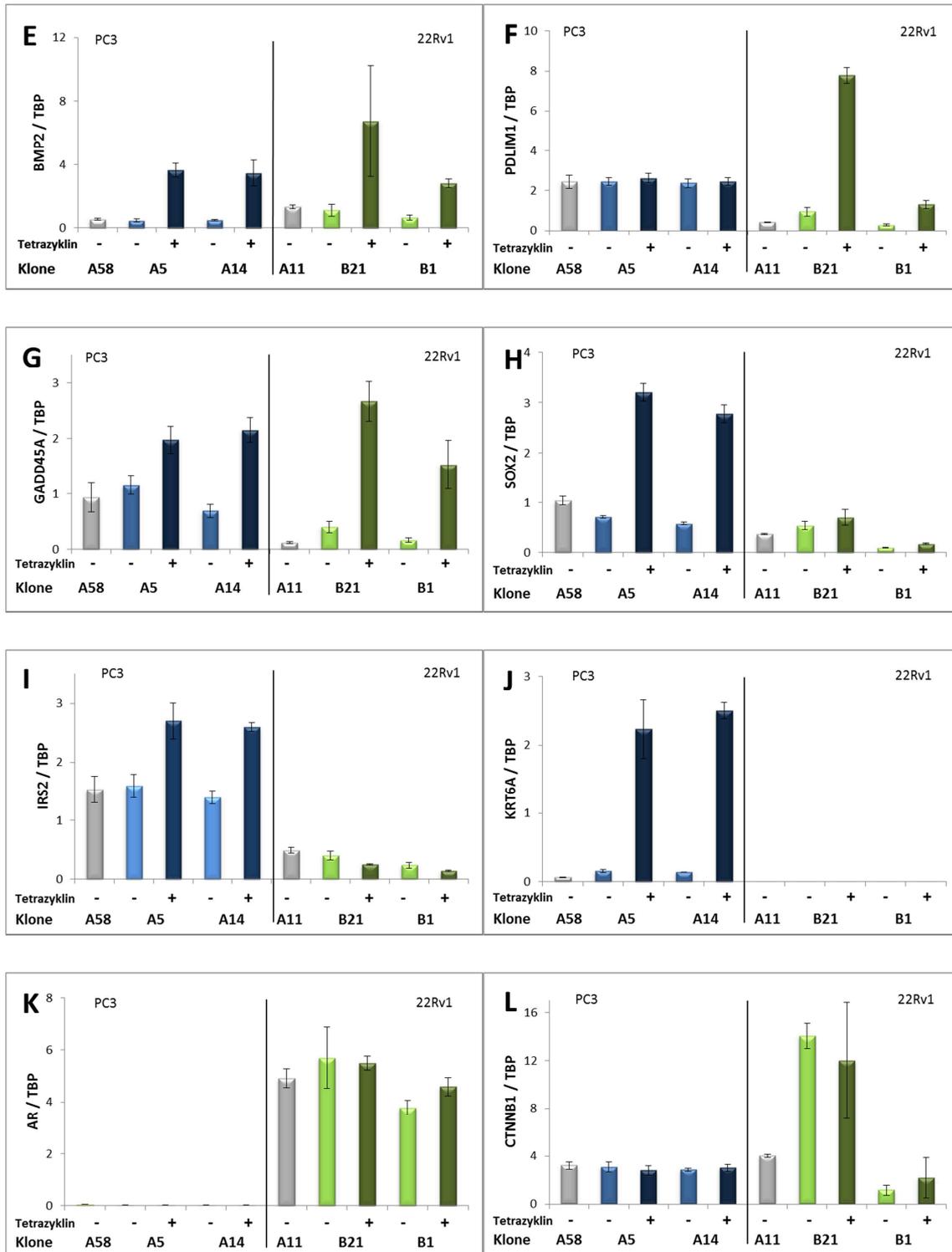
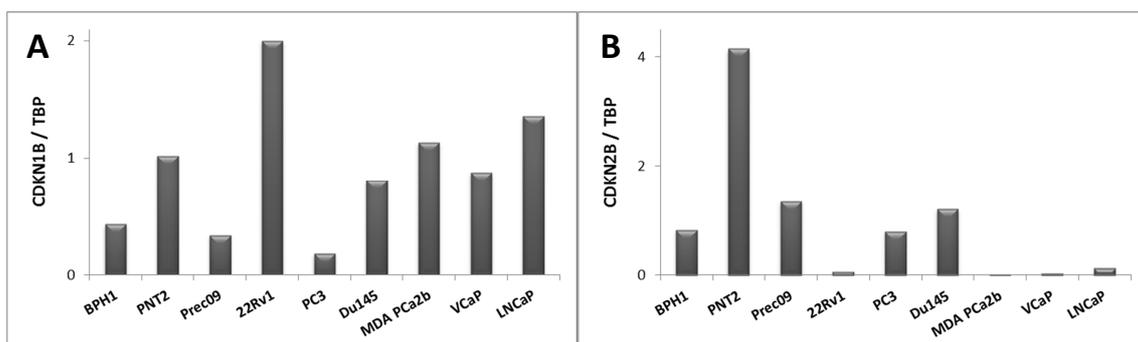
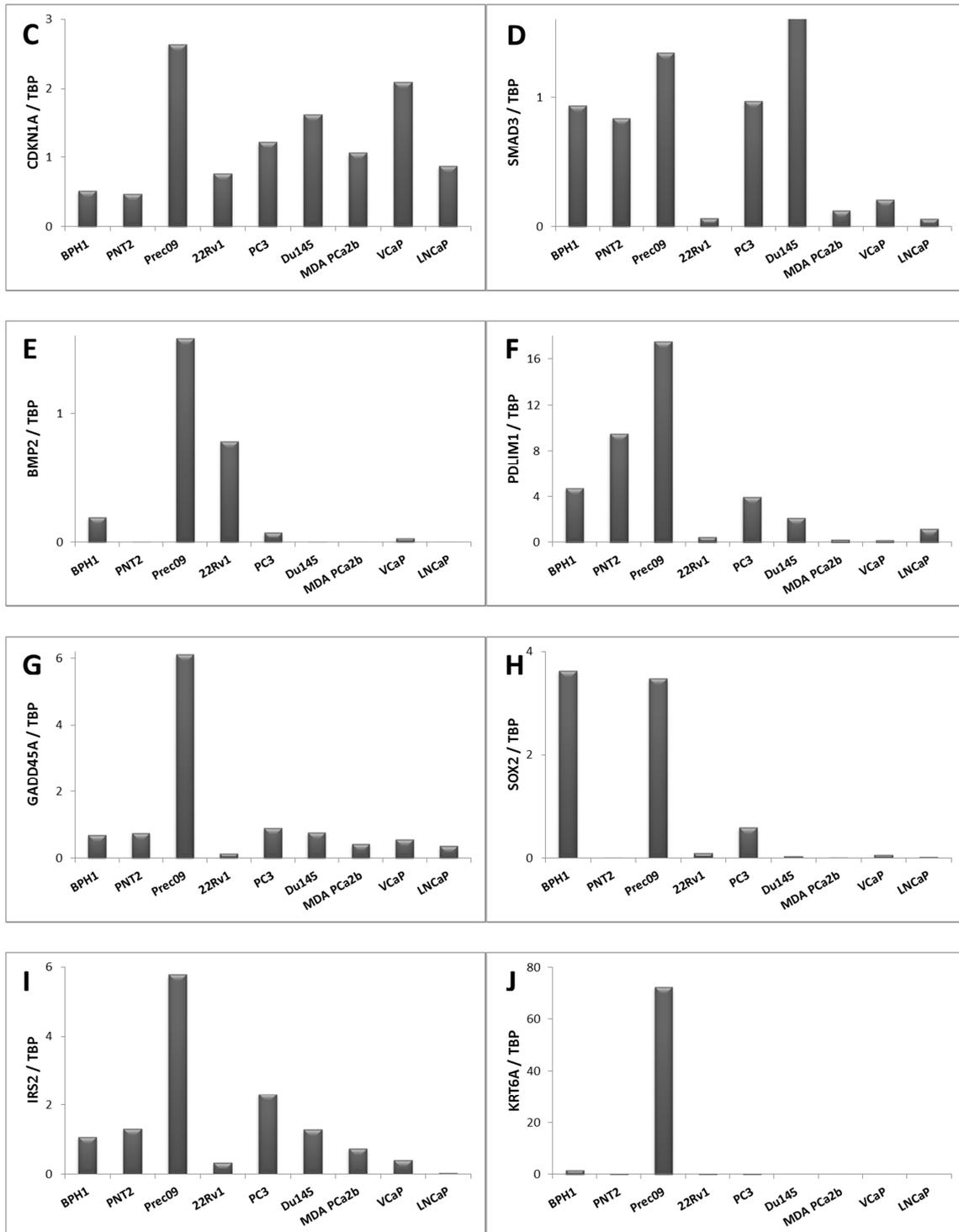


Abbildung 3.25: Verifizierung der Zielgene des Microarrays mittels qRT-PCR. Dafür wurden 12 verschiedene Gene zur Analyse ausgewählt: **(A)** *CDKN1B*, **(B)** *CDKN2B*, **(C)** *CDKN1A*, **(D)** *SMAD3*, **(E)** *BMP2*, **(F)** *PDLIM1*, **(G)** *GADD45A*, **(H)** *SOX2*, **(I)** *IRS2*, **(J)** *KRT6A*, **(K)** *AR* und **(L)** *CTNNB1*. Die Expression der Gene wurde in den Zellklonen der PC3 und der 22Rv1 analysiert. **Blau:** PC3, A58 entspricht der Mutterzelllinie mit stabil integriertem pcDNA 6/TR Vektor. Die PITX2a Zellklone A5 und A14 liegen nichtinduziert (-) und induziert vor (+). **Grün:** 22Rv1, A11 entspricht der Mutterzelllinie mit stabil integriertem pcDNA 6/TR Vektor. Die PITX2a Zellklone B21 und B1 liegen nichtinduziert (-) und induziert vor (+). Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind den Tabellen 9.3 – 9.5 zu entnehmen.

Die Analyse der gleichen Gene in der gesamten Serie von benignen und Karzinomzelllinien aus der Prostata bestätigte im Allgemeinen das Expressionsprofil der PC3 und 22Rv1 Mutterzelllinien aus den Microarrayproben. Ihre Expression in den Klonen aus den Zelllinien PC3 und 22Rv1 war qualitativ ähnlich zu der der Mutterzelllinien PC3 A58 und 22Rv1 A11. Die *CDKN1B*- und *CDKN1A*-Expression zeigte keine Unterschiede zwischen benignen und Karzinom-Zelllinien (Abbildung 3.26 A und C). Die Expression von *CDKN2B* fehlte in den androgenabhängigen Prostatakarzinom-Zelllinien im Gegensatz zu den androgenunabhängigen Prostatakarzinom-Zelllinien und den benignen Zelllinien (Abbildung 3.26 B). Die *SMAD3*-Expression war in den hormonsensitiven Karzinomzelllinien ebenfalls vermindert (Abbildung 3.26 D). Eine *BMP2*-Expression war nur in den Zelllinien Prec09 und 22Rv1 stark vorhanden (Abbildung 3.26 E). Die *PDLIM1* Expression war in den benignen Zelllinien höher als in den Karzinomzelllinien (Abbildung 3.26 F). *GADD45A* zeigte über alle Zelllinien hinweg, bis auf die Zelllinie Prec09, eine sehr geringe Expression (Abbildung 3.26 G). Die *SOX2*-Expression war nur in den benignen Zelllinien BPH1 und Prec09 stark (Abbildung 3.26 H). Die Expression von *IRS2* zeigte keine großen Unterschiede, bis auf Prec09, zwischen den verschiedenen Zelllinien (Abbildung 3.26 I). *KRT6A* war nur in Prec09 Zellen zu detektieren (Abbildung 3.26 J). Die *AR*-Expression war nur in den hormonsensitiven Karzinomzelllinien signifikant (Abbildung 3.26 K). Für *CTNNB1* zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien, nur die Expression in Prec09 war deutlich höher (Abbildung 3.26 L).





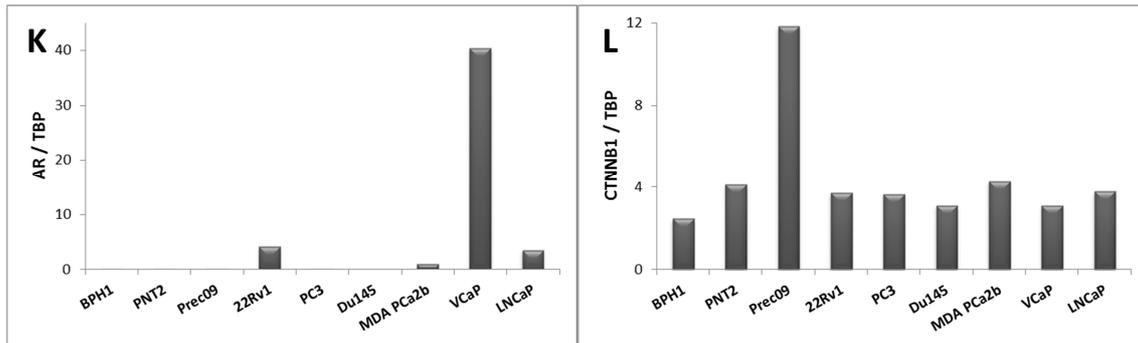


Abbildung 3.26: Analyse ausgewählter Gene aus der Microarray-Analyse mittels qRT-PCR in benignen und Tumor-Prostatazelllinien. (A) *CDKN1B*, (B) *CDKN2B*, (C) *CDKN1A*, (D) *SMAD3*, (E) *BMP2*, (F) *PDLIM1*, (G) *GADD45A*, (H) *SOX2*, (I) *IRS2*, (J) *KRT6A*, (K) *AR* und (L) *CTNNB1*. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Der Mittelwert wurde zugelassen, wenn weniger als 10% Abweichung vorlagen.

3.5.3 Western Blot-Analyse der PITX2 Zielgene

Die PITX2-Reexpression in den induzierten Zellklonen der Zelllinien PC3 und 22Rv1 konnte auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 3.12 C und D). Die durch die PITX2-Induzierung vermittelte erhöhte Expression von p27^{KIP1} und p21^{CIP1} auf RNA-Ebene konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Generell ist die Expression von p27^{KIP1} und p21^{CIP1} stärker in der Zelllinie 22Rv1 (Abbildung 3.28) als in PC3 (Abbildung 3.27).

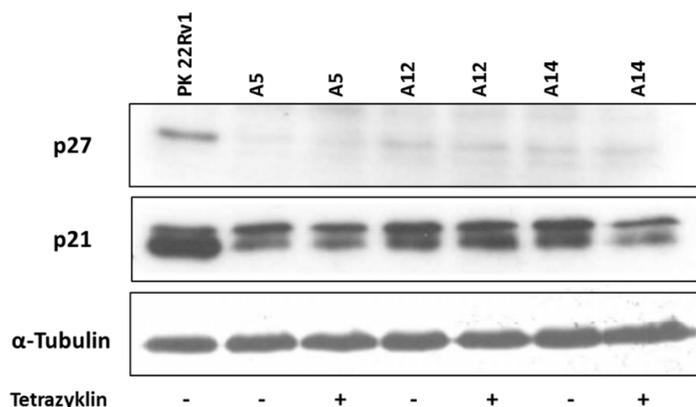


Abbildung 3.27: Expression von p21 und p27 in den PC3 Zellklonen A5, A12 und A14. Induktion der PITX2-Reexpression durch Zugabe von Tetracyclin (+) für 24 h. PK: Zelllinie 22Rv1. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

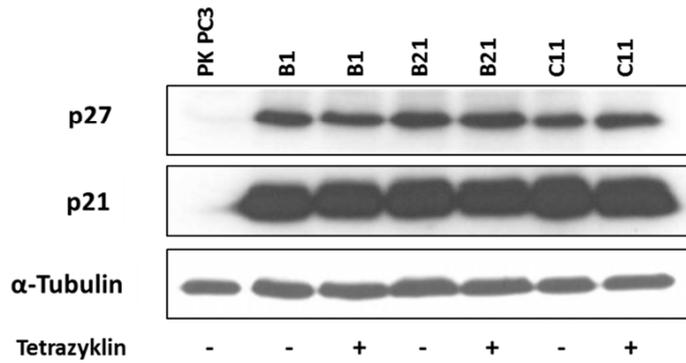


Abbildung 3.28: Expression von p21 und p27 in den 22Rv1 Zellklonen B1, B21 und C11. Induktion der PITX2-Reexpression durch Zugabe von Tetracyclin (+) für 24 h. **PK:** Zelllinie PC3. α -Tubulin diente als Ladekontrolle.

3.6 Einfluss von PITX2 auf den Androgen-Rezeptor

3.6.1 Luciferase Reporter-Assay

Der Einfluss von PITX2 auf die Androgenantwort wurde mittels Luciferase Reporter-Assays untersucht.

Insgesamt wurden vier androgenabhängige Reporterkonstrukte getestet, die alle ein Luciferase-Gen als Reporter der Genaktivität enthalten, mit jeweils unterschiedlichen Promotoren. Das Plasmid PB-Luc enthält einen Teil des (Ratten)-Probasin-Promotors. PSA61-Luc enthält ein 6,1 kb großes Fragment des PSA-Promotors. Im MMTV-Luc Reporterkonstrukt liegen vier verschiedene Glukokortikoid-responsible Elemente (GREs) vor, die auch auf andere Steroidhormonrezeptoren ansprechen. Während in diesen drei Konstrukten die androgen-responsiven Elemente (ARE) in komplexen „natürlichen“ Kontexten vorliegen, enthält ARE-Luc ausschließlich mehrere AREs zusammen mit einem minimalen Promotor. Alle vier Reporterkonstrukte wurden in den Zelllinien PC3 und 22Rv1 getestet. Da es sich bei PC3 um eine androgenunabhängige Zelllinie handelt, musste in diesem Fall der Androgen-Rezeptor ko-transfiziert werden, um eine Androgenantwort messen zu können. Die Zelllinie 22Rv1 ist dagegen androgensensitiv. Zur Stimulation des Androgen-Rezeptors wurden die Zellen mit 10 nM R1881 (synthetisches Androgen Methyltrienolon) behandelt.

In PC3 wurden alle vier Transfektionsansätze mit R1881 behandelt. Dabei wurde das Reporterkonstrukt alleine, mit dem Androgen-Rezeptor, mit PITX2a / PITX2c oder mit

beiden in Kombination transfiziert und nach 48 h die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Stimulation durch R1881 führt zu einer Androgenantwort, die durch ko-transfiziertes PITX2a (Abbildung 3.31) oder PITX2c (Abbildung 3.32) signifikant vermindert wurde. Nach Behandlung mit R1881 konnte in 22Rv1 ein starker Anstieg der Luciferase-Aktivität in jedem der einzelnen androgenabhängigen Reporterkonstrukte gemessen werden. Durch Ko-Transfektion der Reporterkonstrukte mit PITX2a (Abbildung 3.29) oder PITX2c (Abbildung 3.30) wurde diese Aktivität wiederum signifikant vermindert. Durch die PITX2-Transfektion allein wird die basale Aktivität der Promotoren erhöht.

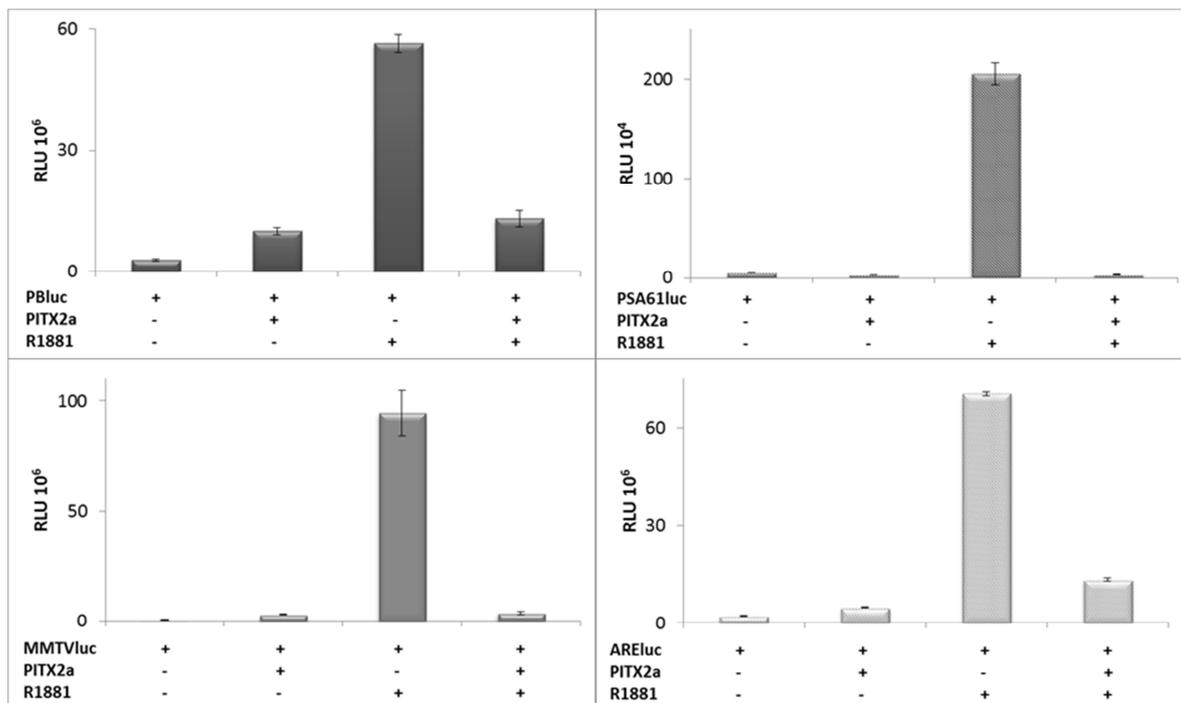


Abbildung 3.29: Luciferase Reporter-Assay mit vier verschiedenen androgenabhängigen Konstrukten und PITX2a in der androgensensitiven 22Rv1 Zelllinie im Vergleich. Alle Transfektionsansätze wurden entweder 48 h mit dem synthetischen Androgen R1881 behandelt oder liegen unbehandelt vor. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind den Tabellen 9.8 – 9.9 zu entnehmen.

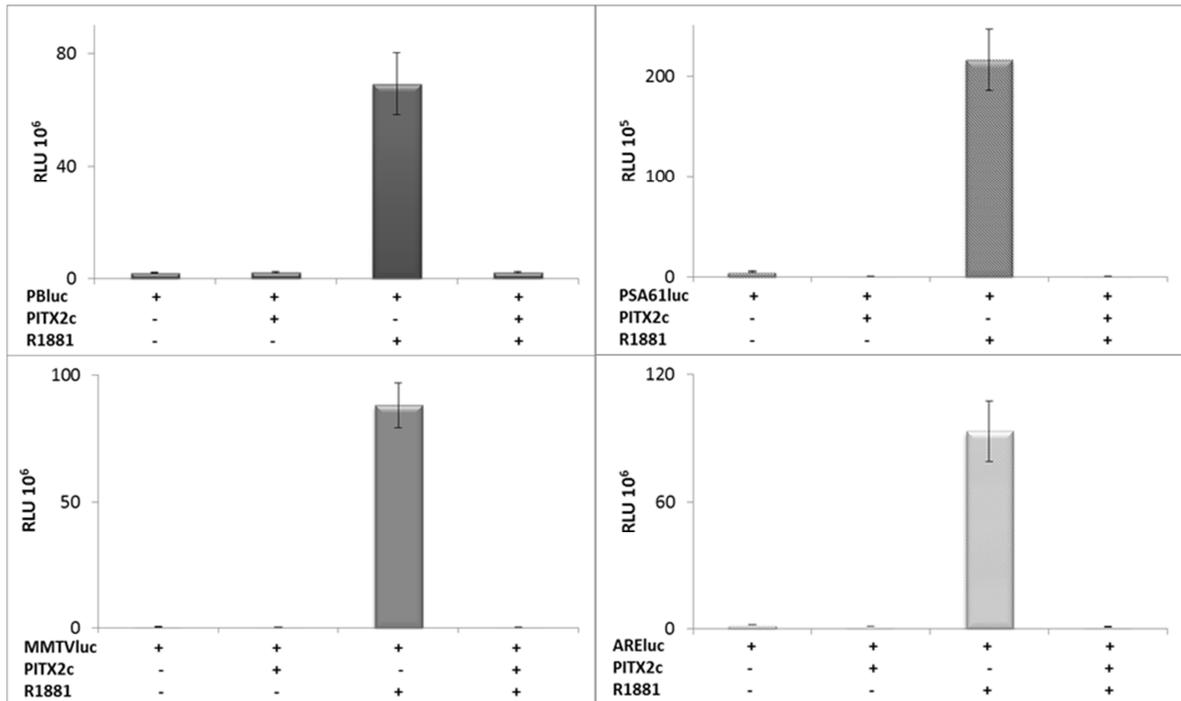


Abbildung 3.30: Luciferase Reporter-Assay mit vier verschiedenen androgenabhängigen Konstrukten und PITX2c in der androgensensitiven 22Rv1 Zelllinie im Vergleich. Alle Transfektionsansätze wurden entweder 48 h mit dem synthetischen Androgen R1881 behandelt oder liegen unbehandelt vor. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind den Tabellen 9.8 – 9.9 zu entnehmen.

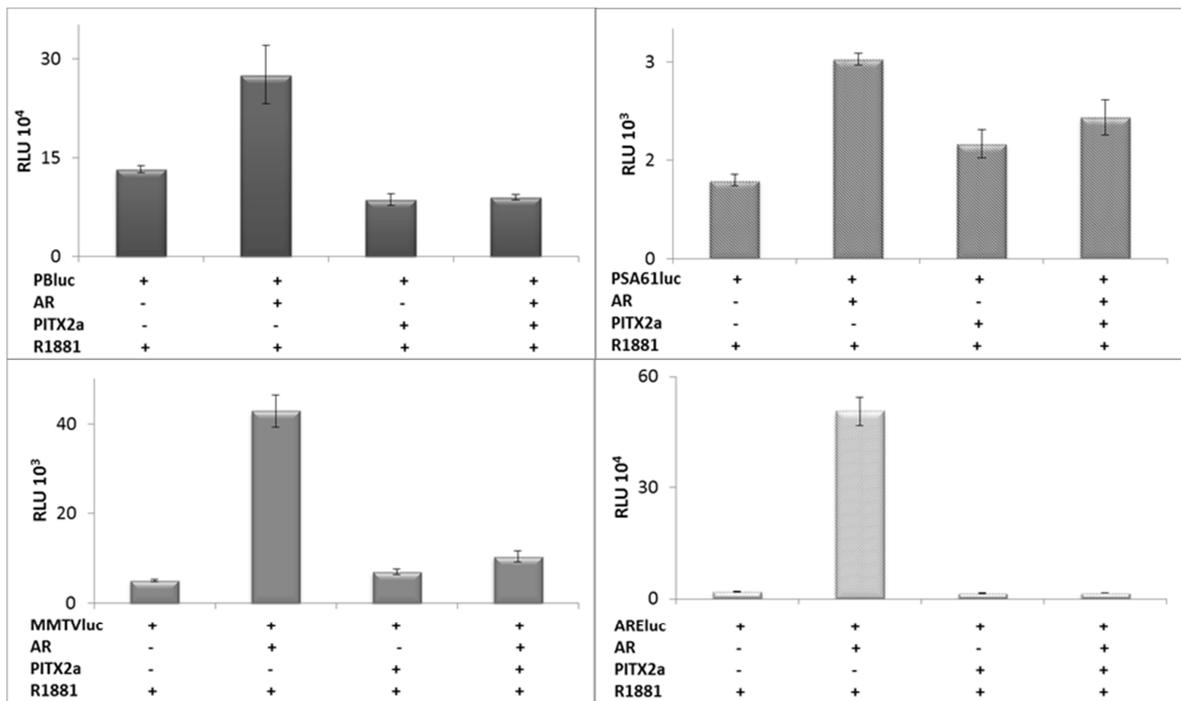


Abbildung 3.31: Luciferase Reporter-Assay mit vier verschiedenen androgenabhängigen Konstrukten und PITX2a in der androgenunabhängigen PC3 Zelllinie im Vergleich. Alle Transfektionsansätze wurden 48 h mit dem synthetischen Androgen R1881 behandelt. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind der Tabelle 9.7 zu entnehmen.

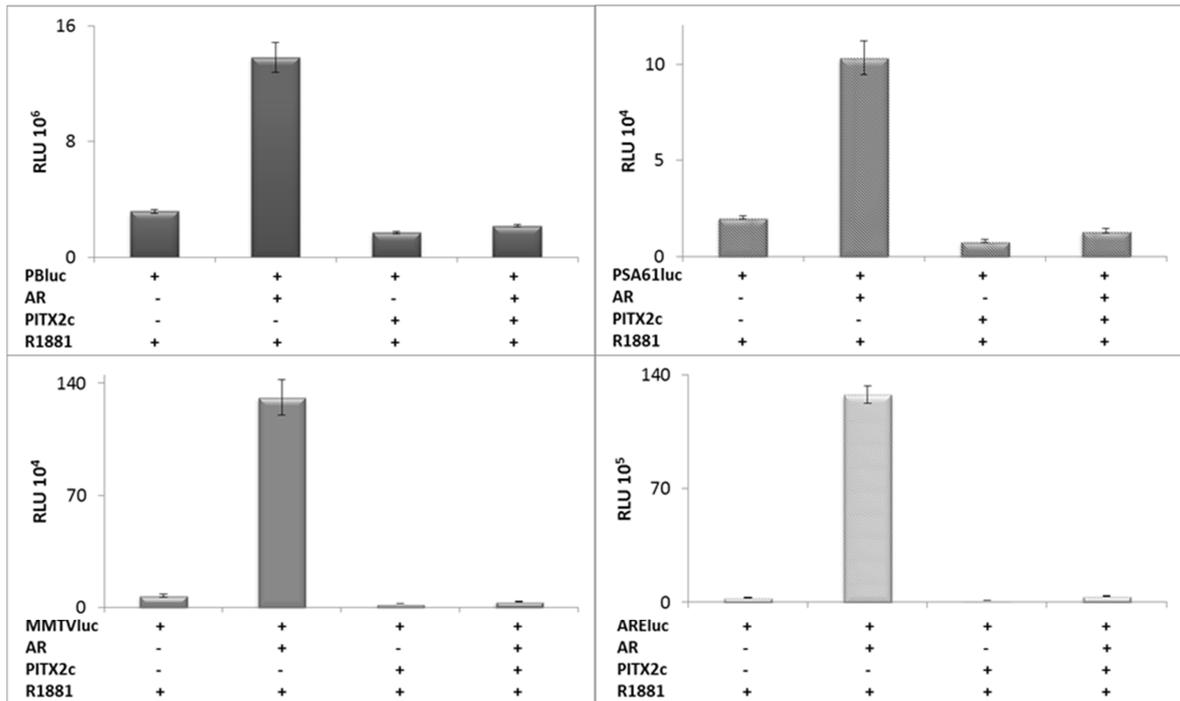


Abbildung 3.32: Luciferase Reporter-Assay mit vier verschiedenen androgenabhängigen Konstrukten und PITX2c in der androgenunabhängigen PC3 Zelllinie im Vergleich. Alle Transfektionsansätze wurden 48 h mit dem synthetischen Androgen R1881 behandelt. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind der Tabelle 9.7 zu entnehmen.

Die Aktivität des androgenabhängigen Konstrukts ARE-Luc wurde durch Stimulation mit R1881 sichergestellt. Sie wurde durch die Ko-Transfektion von konstitutiv aktivem β -Catenin und dem AR signifikant erhöht, im Vergleich zur Ko-Transfektion nur mit AR (Abbildung 3.33). Die zusätzliche Transfektion von PITX2 hemmte in beiden Ansätzen diese gesteigerte Aktivität.

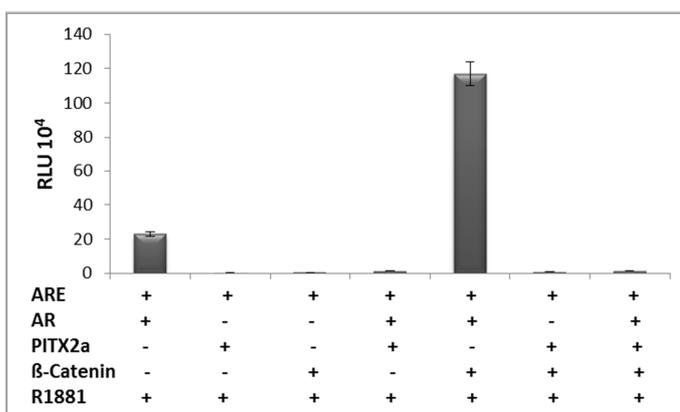


Abbildung 3.33: Luciferase Assay mit dem androgenabhängigen Reporterkonstrukt ARE und konstitutiv aktiven β -Catenin. Transfiziert wurden Expressionsplasmide für AR, PITX2 und β -Catenin, alleine und in Kombination, mit dem ARE Reporterkonstrukt. Alle Transfektionsansätze

wurden 48 h mit dem synthetischen Androgen R1881 behandelt. Dargestellt ist die Standardabweichung.

Zusätzlich wurden Kontrollen durchgeführt, um die Spezifität der Konstrukte zu gewährleisten. Für die androgenabhängigen Konstrukte diente pT109luc und für PITX2 LacZ als unspezifische Kontrollen. Die Auswertung des Reporter-Assays zeigte, dass in der androgenunabhängigen Zelllinie PC3 kein Einfluss des Androgen-Rezeptors (unter R1881) auf pT109luc vorlag. Jedoch hatte PITX2a eine aktivierende Wirkung auf pT109luc. Auch wurde das androgenabhängige Reporterkonstrukt nicht durch LacZ reprimiert (Abbildung 3.34).

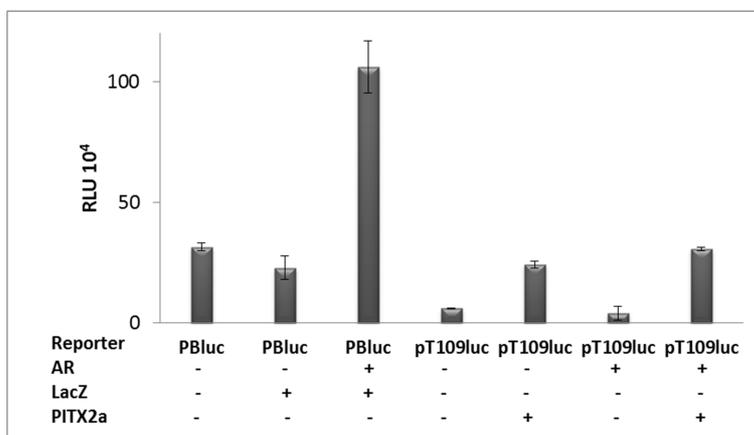


Abbildung 3.34: Luciferase Reporter-Assays mit dem androgenunabhängigen Kontrollplasmid pT109luc und LacZ anstelle von PITX2 exprimierendem Plasmid. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind der Tabelle 9.6 zu entnehmen.

3.6.2 Ko-Transfektion von PITX2 und AR

PITX2a und PITX2c wurden jeweils mit dem AR in die androgenunabhängige Zelllinie PC3 ko-transfiziert und danach mit R1881 behandelt, um festzustellen, ob die starke Repression der Androgenantwort auf veränderten Mengen des AR-Proteins beruht. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Es zeigte sich, dass durch die gleichzeitige Transfektion mit PITX2a die Proteinmenge des AR gegenüber der Kontrolle deutlich verringert wurde. Die Zugabe von R1881 wirkte diesem Effekt deutlich entgegen (Abbildung 3.35).

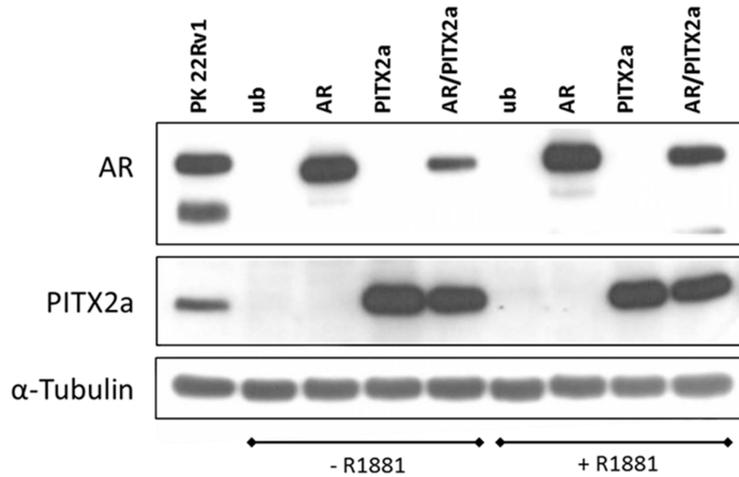
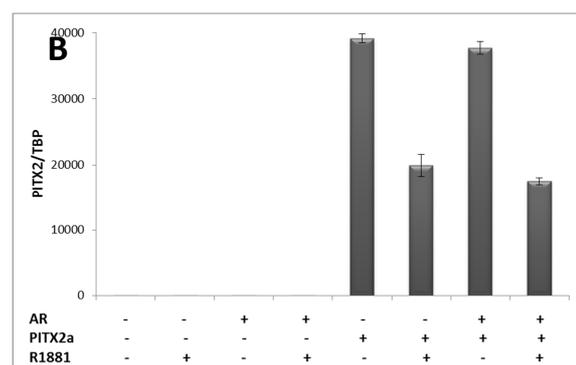
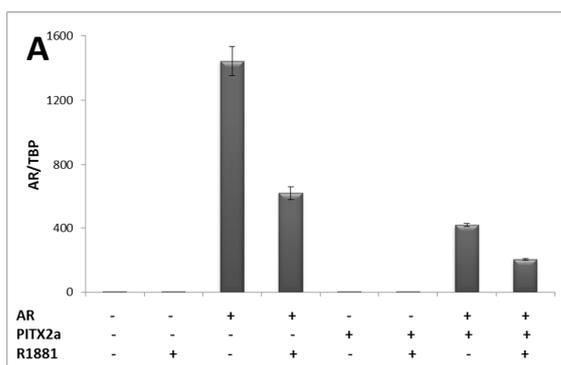


Abbildung 3.35: Western Blot der Kombinationstransfektion von PITX2a und dem Androgen-Rezeptor in der PC3 Zelllinie nach 24 h mit und ohne R1881 Behandlung. α -Tubulin diene als Ladekontrolle.

Auf mRNA-Ebene wurde die Expression des AR durch die Ko-Transfektion mit PITX2a ebenfalls inhibiert. Jedoch zeigt sich kein stabilisierender Effekt durch R1881. Auf mRNA-Ebene nahm die Menge an AR durch die R1881 Behandlung ab (Abbildung 3.36 A). Dieselbe Verminderung war auch bei der PITX2-Expression erkennbar (Abbildung 3.36 B). Die Expression von CTNNB1 nahm in den transfizierten Proben im Gegensatz zu den untransfizierten Proben leicht ab (Abbildung 3.36 C).



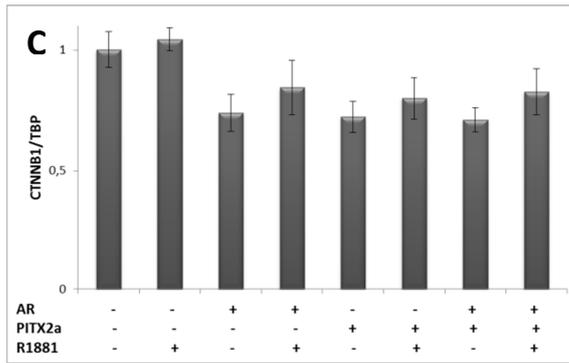


Abbildung 3.36: Expression des Androgen-Rezeptors (A), PITX2 (B) und CTNNB1 (C) auf mRNA-Ebene. AR und PITX2 werden jeweils einzeln und in Kombination für 24 h transfiziert. Jeder Ansatz liegt mit und ohne R1881 Behandlung vor. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind der Tabelle 9.11 zu entnehmen.

Um einen zeitlichen Überblick über den AR-Abbau durch PITX2a zu bekommen, wurde der AR alleine und in Kombination mit PITX2a für 6, 12 und 24 h transfiziert. Auf Proteinebene war bei allen drei Zeitpunkten eine AR Bande zu erkennen. Ohne Kombination mit PITX2 nimmt die Intensität der Bande immer weiter zu. Nach 24 h wurde der AR relativ stark exprimiert. Durch die Kombination mit PITX2 war die Expression nach 12 h sehr viel schwächer und erst nach 24 h erreichte die Expression des AR die Menge wie bei Transfektion ohne PITX2a nach 12 h (Abbildung 3.37). Auf mRNA-Ebene waren die Ergebnisse vergleichbar (Abbildung 3.38).

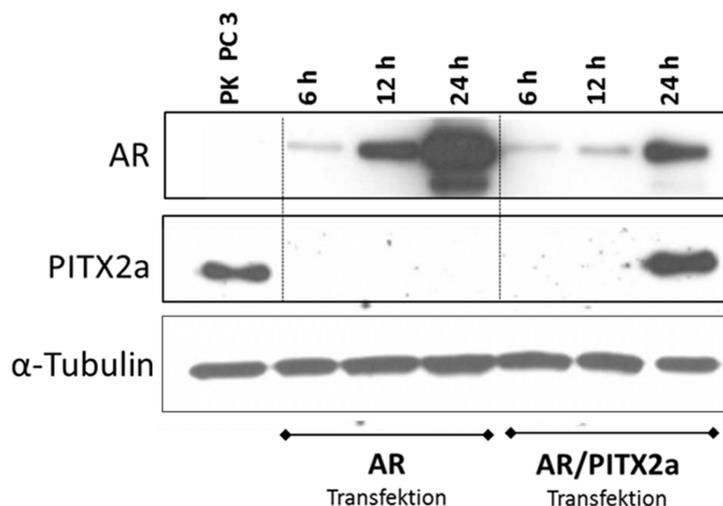


Abbildung 3.37: Western Blot der AR Zeitkurve mit und ohne Kombinationstransfektion mit PITX2a für 6, 12 und 24h. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. PC3 transient mit PITX2a transfiziert dient als Positivkontrolle für PITX2.

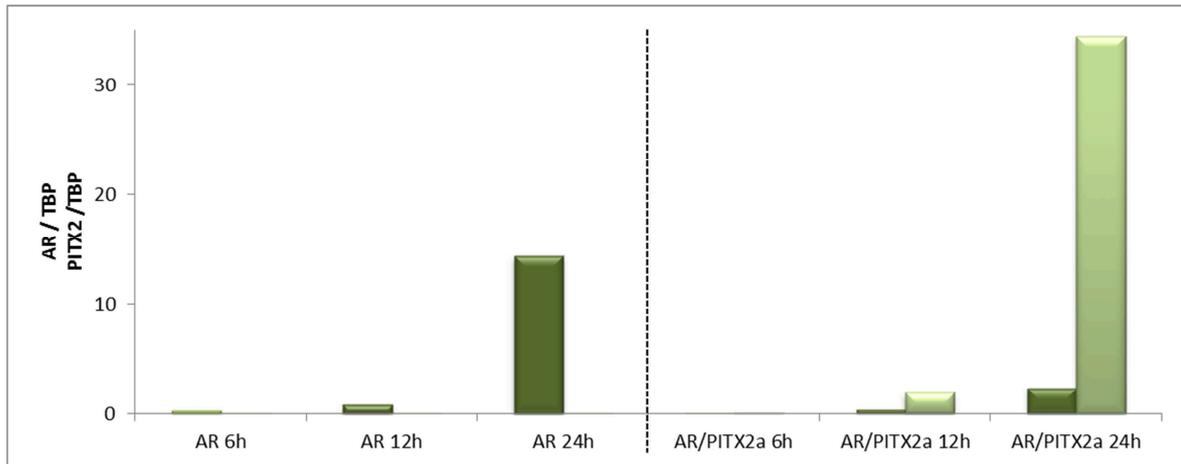


Abbildung 3.38: Expression des AR bei der Ko-Transfektion mit PITX2a. Zeitkurve mit und ohne Kombinationstransfektion mit PITX2a für 6, 12 und 24h auf mRNA Ebene. Linke Balken: Expression AR. Rechte Balken: Expression PITX2. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Der Mittelwert wurde zugelassen, wenn weniger als 10% Abweichung vorlagen.

3.6.3 Two-Hybrid Luciferase-Assay

Um zu überprüfen, ob die Repression des AR durch PITX2 mittels einer direkten Protein-Interaktion erfolgen könnte, wurde ein Two Hybrid Luciferase-Assay durchgeführt. Hierfür wurden der AR und PITX2a in Vektoren kloniert, die entweder die DNA-Bindungsdomäne (pBind Vektor) oder die Aktivierungsdomäne (pAct Vektor) enthielten und in die Zelllinie PC3 für 24 h transfiziert. Nur wenn eine direkte Interaktion zwischen AR und PITX2a vorliegt, kann eine gesteigerte Luciferase-Aktivität gemessen werden. Es konnte keine direkte Interaktion zwischen dem AR und PITX2a nachgewiesen werden (Abbildung 3.39). Die Positivkontrolle zeigte deutliche Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle, was dafür spricht, dass die Durchführung des Assays generell erfolgreich war.

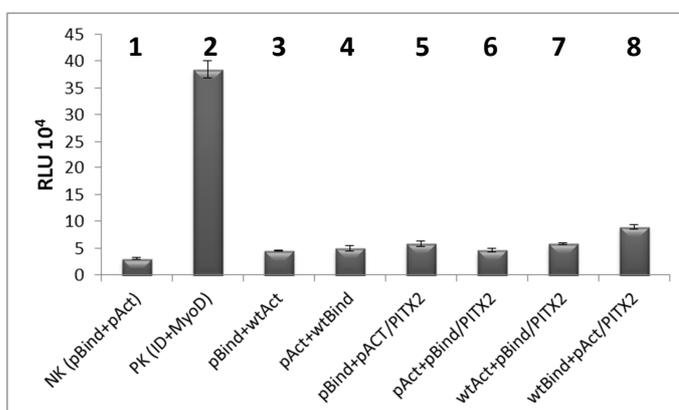
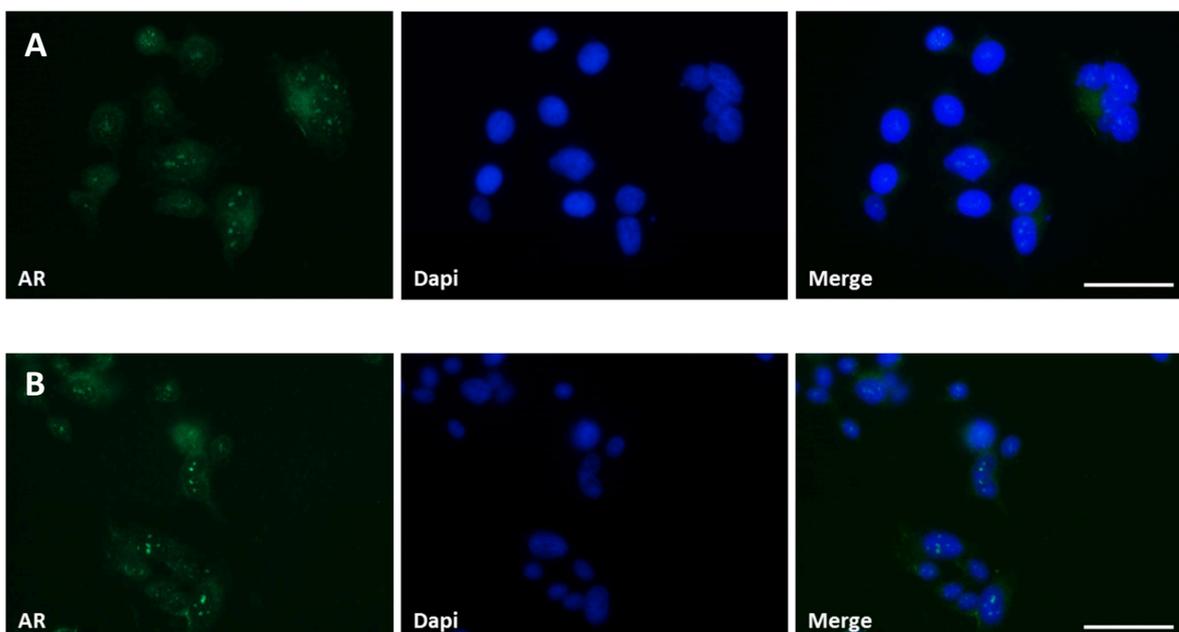


Abbildung 3.39: Two Hybrid Luciferase-Assay mit Konstrukten die den AR oder PITX2a enthalten. **NK:** Negativkontrolle (1). **PK:** Positivkontrolle (2). pBind: Leervektor mit DNA-Bindedomäne. pACT:

Leervektor mit Aktivierungsdomäne. **Balken 3-6:** Kontrollen für Hintergrundsignale. **Balken 7, 8:** Interaktion zwischen AR und PITX2a. Dargestellt ist die Standardabweichung.

3.6.4 Lokalisation des AR in Prostatakarzinom-Zelllinien

Die immunocytochemische Auswertung der AR-Lokalisation zeigte deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. In der unbehandelten Zelllinie PC3 war als schwaches Signal nur eine leichte cytoplasmatische Färbung und eine Anreicherung in den Nukleoli zu erkennen (Abbildung 3.40 A). Der Zellkern selber blieb ausgespart. Die unbehandelte Zelllinie 22Rv1, die zu dem normalen AR noch eine konstitutiv aktive Spleißvariante enthält, war sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus deutlich gefärbt (Abbildung 3.41A). Die Zugabe von R1881 ergab in der PC3 keine Veränderung (Abbildung 3.40 B), in der 22Rv1 jedoch eine verstärkte AR-Lokalisation im Nukleus (Abbildung 3.41 B und D). Durch eine transiente Überexpression des AR wurde in der PC3 eine starke Färbung der Zellen sichtbar (Abbildung 3.40 C), die ebenfalls durch die Zugabe durch R1881 in den Nukleus verlagert wurde (Abbildung 3.40 D). Die deutliche AR Färbung in der 22Rv1 wurde durch die transiente Überexpression noch zusätzlich verstärkt (Abbildung 3.41 C und D). Durch die Kombinationstransfektion von PITX2a und dem AR in der PC3 zeigte sich keine Lokalisationsveränderung des AR (Abbildung 3.40 D und E) und nach Zugabe von R1881 nahm die Menge des AR im Nukleus weiterhin zu (Abbildung 3.40 E).



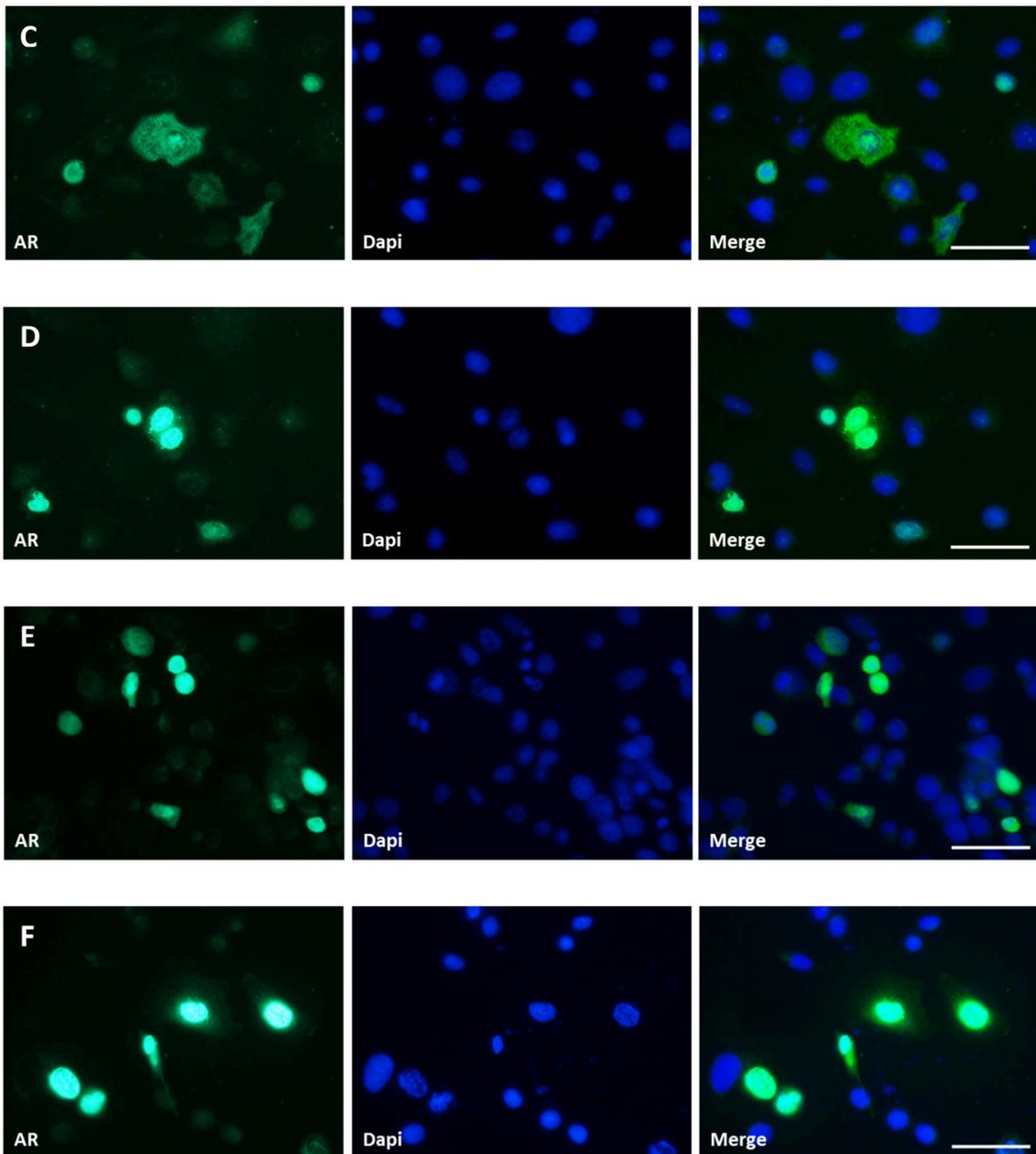


Abbildung 3.40: Immunocytochemische Fluoreszenzfärbung der AR-Lokalisation in der Zelllinie PC3. **(A)** Unbehandelte Zelllinie PC3 ohne R1881 Behandlung. **(B)** Unbehandelte Zelllinie PC3 mit R1881 Behandlung für 48 h. **(C)** Zelllinie PC3 nach Transfektion mit dem AR für 48 h, ohne R1881 Behandlung. **(D)** Zelllinie PC3 nach Transfektion mit dem AR für 48 h, mit R1881 Behandlung für 48 h. **(E)** Zelllinie PC3 nach Transfektion mit dem AR und PITX2a für 48 h, ohne R1881 Behandlung. **(F)** Zelllinie PC3 nach Transfektion mit dem AR und PITX2a für 48 h, mit R1881 Behandlung für 48 h. **AR:** Färbung des AR in den Zellen. **Dapi:** Färbung des Zellkerns. **Merge:** übereinandergelegtes Bild aus AR- und Dapi-Färbung. **40x** Vergrößerung. **Maßstab:** 25 µm.

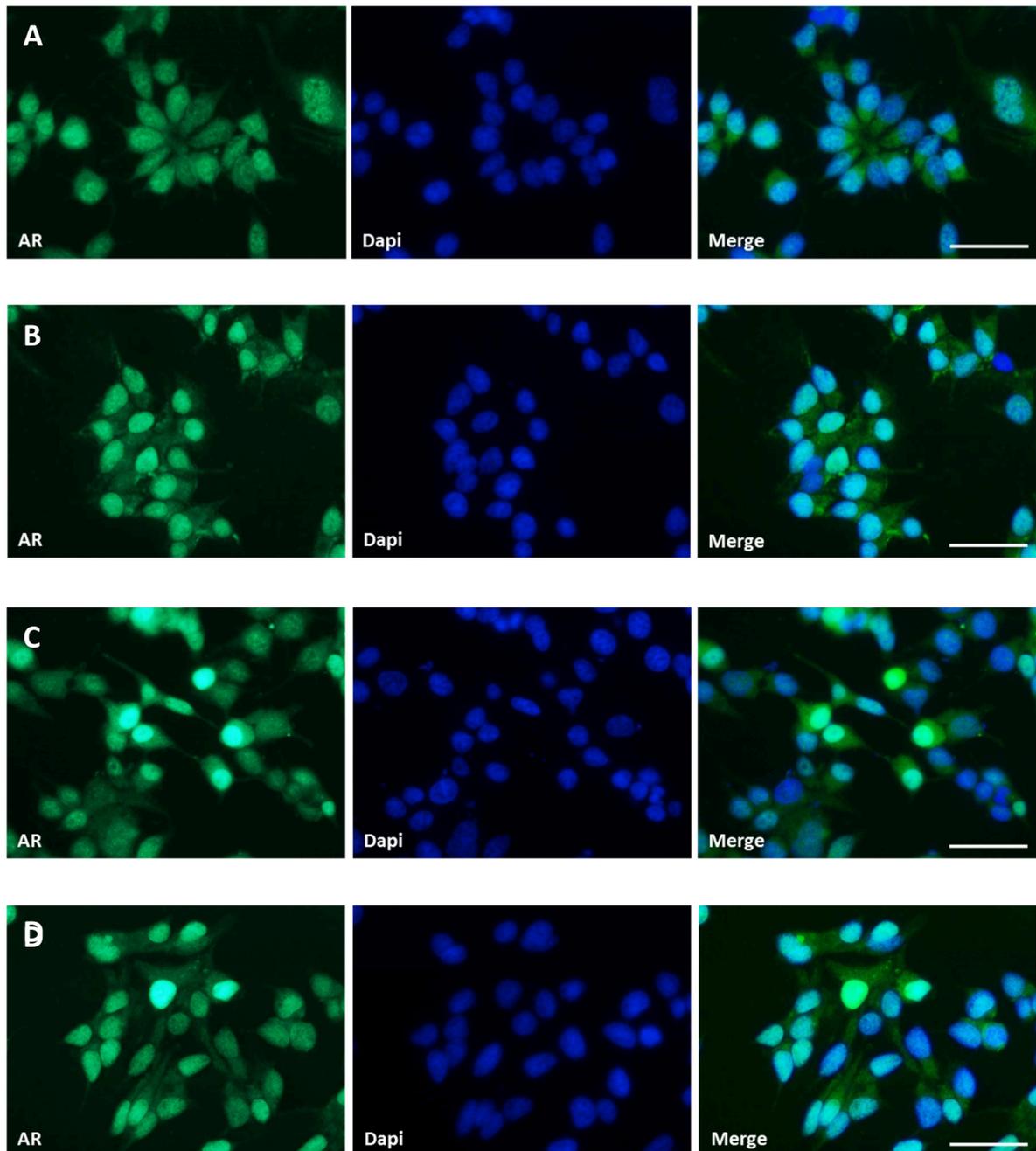


Abbildung 3.41: Immunocytochemische Fluoreszenzfärbung der AR-Lokalisation in der Zelllinie 22Rv1. **(A)** Unbehandelte Zelllinie 22Rv1 ohne R1881 Behandlung. **(B)** Unbehandelte Zelllinie 22Rv1 mit R1881 Behandlung für 48 h. **(C)** Zelllinie 22Rv1 nach Transfektion mit dem AR für 48 h, ohne R1881 Behandlung. **(D)** Zelllinie 22Rv1 nach Transfektion mit dem AR für 48 h, mit R1881 Behandlung für 48 h. **AR:** Färbung des AR in den Zellen. **Dapi:** Färbung des Zellkerns. **Merge:** übereinandergelegtes Bild aus AR- und Dap-Färbung. **40x** Vergrößerung. **Maßstab:** 25 µm.

3.7 Einfluss von PITX2 auf den WNT-Signalweg

In den Zelllinien PC3 und 22Rv1 wurden Luciferase Reporter-Assays mit WNT-abhängigen Konstrukten durchgeführt, um den Einfluss von PITX2 auf die Aktivierung des WNT-

Signalwegs zu untersuchen. Das TOPflash-Konstrukt enthält wildtypische TCF -indestellen, die durch β -Catenin aktiviert werden können. Die Bindestellen im FOPflash-Konstrukt sind mutiert und fungieren als Negativkontrolle.

In der Zelllinie PC3 konnte durch die Ko-transfektion des TOPflash-Konstrukts und dem mutierten, konstitutiv aktiven β -Catenin eine starke Aktivierung des WNT-Signalwegs erzielt werden (Abbildung 3.42 Balken 2). Mit dem wildtypischen β -Catenin fand keine Aktivierung statt (Abbildung 3.42 Balken 3). Die Ko-Transfektion des TOPflash-Konstrukts mit PITX2a und PITX2a/ β -Catenin führte ebenfalls zu einer leichten Aktivierung des WNT-Signalwegs (Abbildung 3.42 Balken 4,5). Ko-transfiziertes mutiertes und wildtypisches β -Catenin mit dem FOPflash-Konstrukt zeigte keine Aktivierung (Abbildung 3.42 Balken 7,8). Jedoch zeigte sich bei Ko-Transfektion des FOPflash-Konstrukts mit PITX2a und PITX2a/ β -Catenin eine unerwartete Aktivierung (Abbildung 3.42 Balken 9,10).

Auch in der Zelllinie 22Rv1 wurde der WNT-Signalweg durch mutiertes β -Catenin aktiviert (Abbildung 3.43 Balken 2). Die Ko-Transfektion des TOPflash-Konstrukts mit PITX2a und PITX2a/ β -Catenin führte ebenfalls zu einer leichten Aktivierung (Abbildung 3.43 Balken 3,4). Ko-transfiziertes mutiertes β -Catenin hatte keinen Einfluss auf das FOPflash-Konstrukt (Abbildung 3.43 Balken 6), dagegen die Ko-Transfektion mit PITX2a oder PITX2a/ β -Catenin (Abbildung 3.43 Balken 7,8).

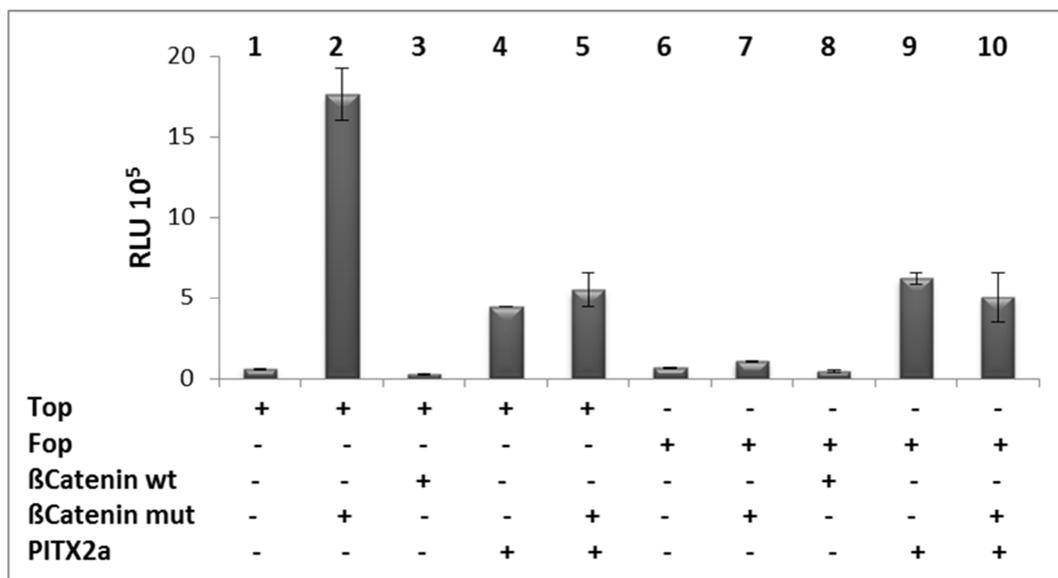


Abbildung 3.42: Luciferase Reporter-Assay mit WNT-abhängigen Konstrukten in der Zelllinie PC3. **Top:** Wildtyp TCF-Bindestellen. **Fop:** mutierte TCF-Bindestellen. **β -Catenin wt:** Wildtyp β -Catenin. **β -Catenin mut:** mutiertes β -Catenin, konstitutiv aktiv. (+) Transiente Transfektion mit dem

jeweiligen Plasmid. **1-10**: Balken der verschiedenen Transfektionsansätze. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind der Tabelle 9.12 zu entnehmen.

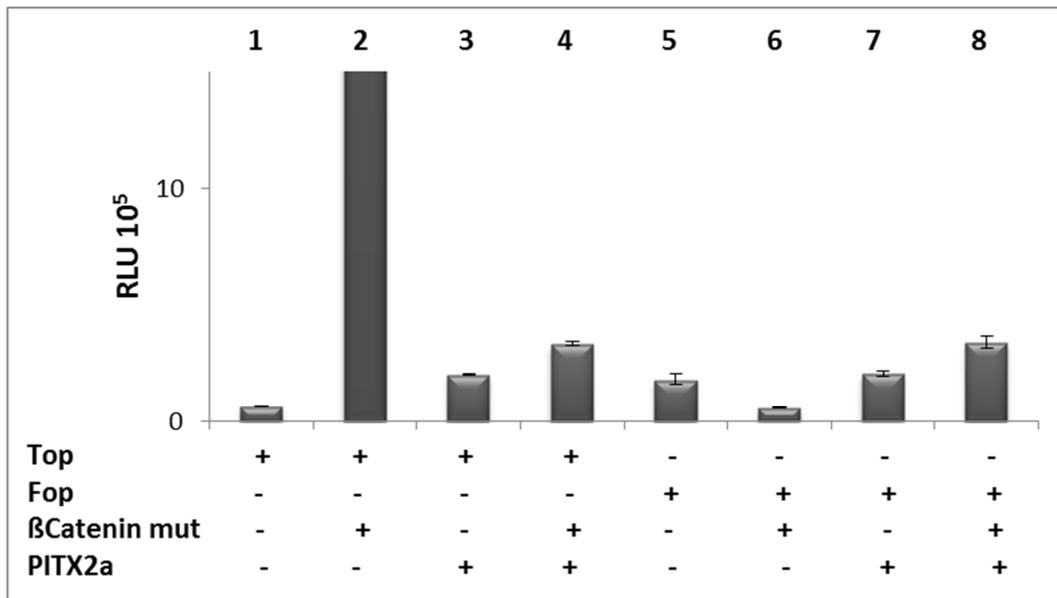


Abbildung 3.43: Luciferase Reporter-Assay mit WNT-abhängigen Konstrukten in der Zelllinie 22Rv1. **Top:** Wildtyp TCF-Bindestellen. **Fop:** mutierte TCF-Bindestellen. **β -Catenin mut:** mutiertes β -Catenin, konstitutiv aktiv. (+) Transiente Transfektion mit dem jeweiligen Plasmid. **1-8:** Balken der verschiedenen Transfektionsansätze. Dargestellt ist die Standardabweichung, die jeweiligen Signifikanzwerte sind der Tabelle 9.12 zu entnehmen.

3.8 Experimente zur Stabilisierung der PITX2c Isoform

Western Blot-Analysen der endogenen PITX2-Expression zeigten in den Zelllinien nur bei 22Rv1 eine schwache Bande in Höhe von 30 kDa (Abbildung 3.3 A); dies entspricht der theoretisch vorhergesagten Größe von PITX2a. Die transiente Transfektion mit PITX2a führte zu einer starken Bande ebenfalls in Höhe von 30 kDa. Nach transienter Transfektion von PITX2c zeigte sich im Western Blot eine sehr schwache Bande in Höhe von ca. 40 kDa, was um 5 kDa von der vorhergesagten Größe von 35 kDa abweicht (Abbildung 3.45).

Die N-terminale Sequenz von PITX2c, die sich deutlich von den Isoformen a und b unterscheidet, enthält mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die GSK3 Kinase und CK2 (Abbildung 3.44). Beide Kinasen sind an der Regulation des WNT-Signalwegs beteiligt. Um zu überprüfen, ob die Verschiebung im Western Blot durch eine Phosphorylierung der PITX2c Isoform durch GSK3 Kinase oder CK2 zustande kommt,

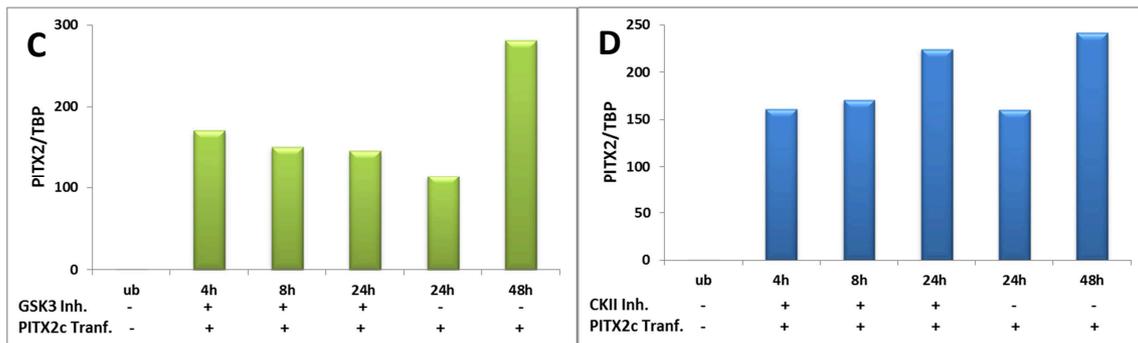


Abbildung 3.46: Western Blot der GSK3- (A) und CK2- (B) Inhibitor Behandlung für 24 h in der Zelllinie PC3. 24 h Transfektion mit PITX2 und anschließende Behandlung mit den Inhibitoren für 4, 8 und 24 h. PITX2a Expression: Bande 30 kDa. PITX2c Expression: Doppelbande bei 40 kDa. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. Expression auf mRNA-Ebene mit GSK3- (C) und CK2- (D) Inhibitoren in denselben Proben. Die Messung der Proben erfolgte in Duplikaten. Der Mittelwert wurde zugelassen, wenn weniger als 10% Abweichung vorlagen.

4 Diskussion

4.1 PITX2 Isoformen

Die drei Isoformen PITX2a, PITX2b und PITX2c besitzen unterschiedliche Sequenzmerkmale (Abbildung 1.2). Die Isoformen PITX2a und PITX2c konnten erfolgreich aus der Zelllinie 22Rv1 amplifiziert und kloniert werden, PITX2b jedoch nicht. Da die N- und C-terminale Sequenz für PITX2a und PITX2b identisch ist, wurden für PITX2b die gleichen Amplifizierungsprimer verwendet. Nach Sequenzierung war nur Isoform a enthalten, was sich dadurch erklären lässt, dass auch im PITX2b Amplifikat die PITX2a-Sequenz enthalten ist und die kleinere Isoform effizienter kloniert wird.

Nach transienter Expression von PITX2a trat im Western Blot eine sehr starke Bande bei den vorhergesagten 30 kDa auf. Nach transienter Transfektion von PITX2c im gleichen Vektor wurde eine deutlich schwächere Bande bei 40 kDa statt der erwarteten 35 kDa erhalten (Abbildung 3.46). Der Größenverschiebung, wie auch der schwachen Expression von überexprimiertem PITX2c, könnte eine posttranslationale Modifikation zu Grunde liegen. Die genaue Überprüfung der N-terminalen Sequenz von PITX2c - die gegenüber PITX2a vollkommen unterschiedlich ist - mit Hilfe des *PhosphoMotif Finders* und der KinasePhos 2.0 Software ergab fünf potentielle Phosphorylierungsstellen (Abbildung 3.45), wobei CK2 und GSK3 als die wahrscheinlichsten Kinasen identifiziert wurden (Abschnitt 2.1.10). Für die Glykogensynthase als Substrat ist eine *Priming*-Funktion beschrieben, wobei die CK2-Phosphorylierung die Phosphorylierung durch GSK3 ermöglicht und vorbereitet [160]. Auch für PTEN ist eine synergistische Phosphorylierung durch CK2 und GSK3 erwiesen [161].

Die Behandlung mit einem CK2-Inhibitor ergab einen Effekt auf die PITX2c Isoform, der GSK3-Inhibitor jedoch nicht; eine Kombinationsbehandlung mit beiden Inhibitoren steht noch aus. Durch den CK2-Inhibitor konnte eine kurzzeitige Stabilisierung des PITX2c Proteins für zwei bis vier Stunden erreicht werden. Dabei wurde nicht nur die Bande bei 40 kDa verstärkt sichtbar, sondern auch eine zusätzliche Bande bei 35 kDa nachgewiesen. Die Bande im Bereich von 35 kDa entspricht ungefähr der vorhergesagten Größe von PITX2c; diese ist jedoch auch nur bedingt verstärkt exprimiert (Abbildung 3.47). Diese Ergebnisse können so interpretiert werden, dass die Phosphorylierung für einen kurzen

Zeitraum unterdrückt wird, jedoch nicht vollständig. Durch diese Unterdrückung kommt es zur gewünschten Größenverschiebung zu 35 kDa. Da der CK2-Inhibitor anscheinend nicht ausreicht, um eine vollständige Dephosphorylierung hervorzurufen, bleibt auch die Bande bei 40 kDa erhalten.

Im WNT-Signalweg wirken GSK3 als negativer und CK2 als positiver Regulator. Eine Phosphorylierung durch GSK3 führt zu einer Degradation von β -Catenin, die CK2-Phosphorylierung hingegen schützt vor diesem Abbau [162, 163]. Der GSK3 ist auch in diesem Kontext eine *Priming*-Kinase vorgeschaltet, dabei handelt es sich jedoch um CK1 α [164]. Die Funktion von GSK3 im WNT-Signalweg stimmt mit der inaktivierenden Phosphorylierung der PITX2c Isoform überein, jedoch weicht die aktivierende Phosphorylierung auf β -Catenin durch CK2 von der gezeigten Wirkung des CK2-Inhibitors auf PITX2c ab.

Für PITX2a gibt es keinen experimentellen oder bioinformatischen Hinweis auf eine posttranslationale Modifikation. Die zusätzliche Regulationsebene bei PITX2c wirft die Frage auf, ob vielleicht PITX2c die relevantere Isoform beim Prostatakarzinom sein könnte. Tatsächlich war auch häufiger diese Form in normalen Geweben zu entdecken. Isoform-spezifische Antikörper, um diese Frage anzugehen, sind bisher nicht verfügbar.

In Zelllinien zeigte sich auf mRNA-Ebene nur in der 22Rv1 Zelllinie eine mäßige Expression der PITX2-Isoformen a und b. In BPH1, PC3 und DU145 hingegen war eine schwache Expression von PITX2c vorhanden (Abbildung 3.1). Auf Proteinebene war nur in der Zelllinie 22Rv1 eine sehr schwache Bande in Höhe von PITX2a detektierbar (Abbildung 3.3). Generell findet eine Transkription aller Isoformen in bestimmten Zelllinien statt, jedoch wird die Akkumulation des Proteins verhindert (PITX2c) oder findet nur in geringem Maße statt (PITX2a). Diese Aussagen passen zu den Beobachtungen bei transienter Überexpression von PITX2a und PITX2c. Die Expression von PITX2a kann durch die Überexpression verstärkt werden, PITX2c wird jedoch weiterhin inhibiert. Generell werden die einzelnen Isoformen selten getrennt betrachtet. Die meisten Publikationen unterscheiden nicht zwischen den Isoformen, sondern betrachten PITX2 in seiner Gesamtheit.

Vinarskaja et al. publizierten 2013, dass PITX2 in Tumorgeweben signifikant gegenüber Normalgewebe herunterreguliert sei [153]. Dafür wurde ein Assay verwendet, der nur die Isoformen a und b detektiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die gleichen Tumor- und Normalgewebe mit einem neuen Assay analysiert, der alle drei Isoformen erfasst. Auch mit diesem Assay war eine signifikante Verminderung der PITX2-Expression in den Tumorgeweben messbar (Abbildung 3.2). Auf Proteinebene konnte in Tumor- und Normalgewebe keine deutliche PITX2-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). In den Versuchen in Zelllinien entsprach – zumindest für PITX2a – die Proteinmenge der vorhandenen mRNA-Menge. Vermutlich liegt also in den normalen Prostatageweben PITX2a-Protein unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Antikörpers vor.

In der Literatur ist eine Herunterregulation von PITX2 auch für das Mammakarzinom beschrieben [152]. In anderen Tumorentitäten wie dem Kolonkarzinom, dem Ovarialkarzinom, dem Schilddrüsenkarzinom oder dem Nierenkarzinom kommt es jedoch, im Vergleich zum Normalgewebe, zu einer Überexpression von PITX2 [145, 146, 149]. Im Widerspruch zu unseren Ergebnissen berichten Vela et al. 2014, dass PITX2 in Prostatakarzinom Knochenmetastasen signifikant überexprimiert sei [154]. Die Diskrepanz zu den Daten von Vinarskaja et al. 2013 führen diese Autoren auf die Expression anderer Isoformen, also PITX2c, zurück. Auch wenn PITX2c in den Zelllinien etwas breiter exprimiert erscheint, lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit nicht mit dieser Hypothese vereinbaren.

In der Arbeit von Vinarskaja et al. 2013 war die verminderte Expression von PITX2 mit einer Hypermethylierung des Gens assoziiert [153]. Allerdings beschränkte sich diese Arbeit auf die Promotorregion von PITX2a und PITX2b. Eigene Analysen mittels Pyrosequenzierung an verschiedenen Positionen ergaben keinen Zusammenhang zwischen der Expression einzelner Isoformen und der Methylierung in Zelllinien (Abbildung 3.4 B). Allgemein ist entweder eine Methylierung im Promotorbereich für die Isoformen a und b oder eine Methylierung im Promotorbereich für die Isoform c in Kombination mit einer Methylierung im 3'-Bereich vorhanden. In den benignen Zelllinien war meist eine sehr schwache Methylierung zu erkennen - eine Ausnahme stellt die Zelllinie BPH1 dar. Dass in den benignen Zelllinien nur eine geringe Methylierung vorliegt, passt zu den Ergebnissen in den humanen Geweben. Dabei muss jedoch bedacht werden,

dass alle benignen Zelllinien aus Basalzellen der Prostata stammen; Expression und Regulation von PITX2 könnten in luminalen (sekretorischen) Prostataepithelzellen differieren.

Die Behandlung mit einem DNA-Methyltransferase-Inhibitor (Aza) erhöhte die Expression der zuvor am jeweiligen Promotor methylierten Isoformen in den Zelllinien 22Rv1 und PC3, aber nicht in LNCaP (Abbildung 3.5). In der 22Rv1 ist hauptsächlich der Promotor der Isoformen a und b methyliert, in der PC3 vorwiegend der Promotor der Isoform c. In beiden Zelllinien ist jedoch eine Expression der jeweiligen Isoformen messbar (Abbildung 3.4). Die Demethylierung verstärkt also nur eine zuvor schon vorhandene Expression. Die Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor SAHA alleine zeigte nur einen Effekt in der Zelllinie LNCaP, in Kombination mit Aza auch in LNCaP und PC3 (Abbildung 3.5). Bei LNCaP liegt im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien keine Expression einer PITX2-Isoform vor. Ein Histondeacetylase-Inhibitor alleine kann also, vermutlich durch eine chromatin-modulierende Funktion, eine Expression der Isoform PITX2c auslösen, wobei der Promotor nur mäßig methyliert vorlag. Die Kombinationsbehandlung führte dagegen in der PC3 zu einer Expressionssteigerung bei allen drei Isoformen (Abbildung 3.5). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine genauere Analyse der Chromatinmodifikationen am PITX2 Gen in Zelllinien und Prostatageweben durchgeführt werden sollte.

In adulten Geweben bleibt die Transkriptionsfaktor-Funktion von PITX2 erhalten. Dabei fungiert es hauptsächlich als Regulator in Signalwegen, die auch in der Embryonalentwicklung aktiv sind, wie dem WNT/ β -Catenin- oder dem Nodal-Signalweg [128, 134, 138]. PITX2 übt in gesundem Gewebe eine Funktion aus, die für die Zellproliferation und für den Zellzyklus von Bedeutung ist. Dabei kann es als Aktivator, jedoch auch als Repressor fungieren [134, 142]. In einigen Tumorentitäten, wie dem Prostatakarzinom, scheint PITX2 für die Progression des Tumors störend zu sein, in anderen wirkt es jedoch fördernd.

Für das Kolonkarzinom sind Mutationen von APC (inaktivierend) oder β -Catenin (aktivierend) grundlegend, die zu einer erhöhten β -Catenin/TCF4-abhängigen Transkription führen [165]. Eine Überexpression von PITX2 konnte nur für Lymphknoten-positive Kolonkarzinome gezeigt werden [148]. Es wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen der PITX2-Überexpression und der Expression der mutmaßlichen PITX2 Zielgene

MYC, *CCND1* (Cyclin D1) oder *CCND2* (Cyclin D2) im Kolonkarzinom gefunden [146]. PITX2 Bindestellen sind entlang der Promotorregion von *CCND1*, *CCND2* und *MYC* lokalisiert [134, 135, 138, 139]. *CCND1* und *MYC* sind auch klassische Zielgene des WNT/ β -Catenin-Signalwegs.

PITX2 wird in Schilddrüsenkarzinomzellen exprimiert, jedoch nicht in normalen Schilddrüsenzellen. Im Schilddrüsenkarzinom wurde PITX2 als Faktor beschrieben, der die Tumorgenese durch Hochregulierung von Cyclin D2 (auf transkriptioneller Ebene) begünstigt. Ein Knockdown von PITX2 führt zu einer Herunterregulierung von Cyclin D1 und Cyclin D2 und zu einer verstärkten Phosphorylierung des RB1 Proteins [139].

Für das Ovarialkarzinom wurde berichtet, dass PITX2 hochreguliert ist und die Zellmigration und -invasion fördert. Die erhöhte Expression von PITX2 geschieht unabhängig vom WNT-Signalweg. PITX2 führt zu einer Hochregulierung von *MYC* und *CCND1* [145].

Im Nierenkarzinom wird *ABCB1* durch PITX2 transkriptionell hochreguliert, welches direkt an den *ABCB1* Promotor bindet [149]. Die Expression von *ABCB1* wird unter anderem durch den WNT-Signalweg reguliert (auch im Kolonkarzinom) [166, 167], die Modulierung von *ABCB1* durch PITX2 ist jedoch β -Catenin unabhängig. Eine Herunterregulation von PITX2 vermindert die Zellproliferation in Nierenkarzinomzellen [149].

Alle diese Tumorentitäten haben einen aberranten WNT-Signalweg gemeinsam. Sie unterscheiden sich jedoch in der Funktion, welche PITX2 ausübt. Im Kolonkarzinom ist der WNT-Signalweg generell überaktiv, und PITX2 beeinflusst die Expression der gemeinsamen Zielgene wenig. Im Schilddrüsen- und Nierenkarzinom werden diese Zielgene durch PITX2 transkriptionell aktiviert, jedoch unabhängig vom WNT-Signalweg. Zusammenfassend übt PITX2 in all diesen Karzinomen eine onkogene Funktion aus, die eine Progression der Tumore fördert.

Die Tumorentitäten, in denen PITX2 herunterreguliert ist, Prostata- und Mammakarzinom, sind stark hormonabhängig. Sowohl im Prostata- als auch im Mammakarzinom liegt eine Hypermethylierung des Promotors vor, wodurch die Expression vermindert wird [151-153]. In keinem der Karzinome mit einer PITX2-Überexpression sind epigenetische Mechanismen beschrieben; soweit die Überexpression

von PITX2 keine Folge der Aktivierung des WNT-Signalwegs darstellt, ist ihre Ursache ungeklärt. Für das Prostatakarzinom wurde bisher keine aktivierende Funktion von PITX2 auf den WNT-Signalweg beschrieben, was mit den Daten dieser Arbeit übereinstimmt.

Die PITX1 Exone 2 und 3 sind auf Aminosäureebene in humanem Gewebe zu 74% homolog zu den PITX2 Exonen 5 und 6. Die Expression der beiden Gene überschneidet sich in der Embryonalentwicklung, wobei beide Gene ähnliche oder gleiche Funktionen ausüben. PITX1 könnte also auch in prostatistischen Zellen Funktionen von PITX2 übernehmen. In Tumor- gegenüber Normalgewebe ist auch PITX1 signifikant herunterreguliert, allerdings nicht so stringent wie PITX2 (Abbildung 3.6). In Zelllinien zeigte sich ein abweichendes Expressionsmuster von PITX2, wobei die PITX1-Expression deutlich stärker vorhanden war (Abbildung 3.6). In den Geweben war eine signifikant positive Korrelation zwischen PITX1 und PITX2 zu erkennen. Die PITX1-Expression ist in verschiedenen humanen Tumorentitäten, wie Magen-, Lungen-, Harnblasen- und Kolonkarzinom, vermindert, jedoch wurde keine Überexpression beschrieben [95-97], wie sie für PITX2 beispielsweise im Kolonkarzinom vorliegt [146]. Trotz der Sequenzhomologie in regulierenden Bereichen und der ähnlichen Expression in der Embryonalentwicklung müssen demnach für PITX2 zusätzliche Mechanismen vorliegen, die eine Hochregulierung in Tumoren bedingen.

4.2 Funktionelle Auswirkungen der PITX2-Reexpression

Erste Anzeichen für die Funktion von PITX2 zeigten sich in einem Klonogenitätsassay. In den Prostatakarzinom-Zelllinien PC3, 22Rv1 und LNCaP bildeten sich deutlich weniger Klone nach Transfektion mit PITX2a oder PITX2c im Vergleich zum Leervektor (Abbildung 3.7 – 3.9). Daher wurden mit dem Tetracyclin-induzierbaren T-REx System stabile PITX2a Klone in den Zelllinien PC3 und 22Rv1 etabliert. Jedoch war die Repression im Basalzustand sichtlich nicht komplett, denn auch in den nichtinduzierten Klonen war im Gegensatz zu der jeweiligen Mutterzelllinie eine basale PITX2a-Expression vorhanden. Dadurch waren die Wirkungen der PITX2a-Reexpression auf zwei verschiedenen Ebenen zu überprüfen, einmal nach Induktion mit stärkerer Expression und zusätzlich bei einem niedrigen, aber signifikanten Expressionsniveau.

Die Zelllinien unterscheiden sich wesentlich durch den Androgenstatus. PC3 exprimiert den AR auf sehr geringem Niveau. 22Rv1 und LNCaP enthalten AR-Varianten. In der 22Rv1

ist eine konstitutiv aktive Spleißvariante des AR exprimiert, LNCaP enthält eine Mutation in der Ligandenbindungsdomäne des AR welche die Spezifität der Ligandenbindung verbreitert [168].

In den induzierten Klonen war PITX2a vorwiegend und nach transienter Transfektion vollständig im Zellkern lokalisiert. In den Mutterzelllinien und in den nichtinduzierten Klonen war – wenn überhaupt - eher eine cytoplasmatische Lokalisation vorzufinden (Abbildung 3.21 und 3.22). Diese Erkenntnisse passen zu der Annahme, das PITX2 im aktiven Zustand in den Zellkern transloziert, um dort seine Funktion als Transkriptionsfaktor auszuüben. Erst der Anstieg über ein basales Expressionsniveau hinaus führt offenbar zu der Verlagerung in den Nukleus.

PITX2a Klone der Zelllinien PC3 und 22Rv1 wiesen deutliche morphologische Unterschiede zu den Mutterzelllinien auf (Abbildung 3.18 und 3.19). Zusätzliche Experimente ergaben, dass die Proliferation in den stabilen Klonen generell gehemmt war, was durch die PITX2-Induktion noch verstärkt wurde (Abbildung 3.13). Dabei wurde eine Verschiebung des Zellzyklus in Richtung der G1-Phase festgestellt (Abbildung 3.14 – 3.16). Außerdem zeigten die induzierten PITX2 Klone einen seneszenten Phänotyp (Abbildung 3.17 und 3.18). Anzeichen für Apoptose waren nicht vorhanden. Die Effekte auf Proliferation und Zellzyklus waren in beiden Prostatakarzinom-Zelllinien nachzuweisen. Sie sind daher androgenunabhängig und deuten auf eine generelle Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus im Prostatakarzinom. Für die Überexpression von PITX2a wurde in HeLa-Zellen ein ähnliches Ergebnis beschrieben. Dort führt die Akkumulation des Tumorsuppressors p53 und p21^{CIP1} zur Inhibition der Zellproliferation und einem Zellzyklusarrest in der Phase G0/G1 [144].

In der Zellzyklus-Progression von Prostatakarzinomzellen ist Androgen ein kritischer Regulator der G1-S Transition. Prostatakarzinomzellen, denen Androgen entzogen wurde, arretieren in der frühen G1-Phase, was mit einem Verlust der Cyclin D1- und Cyclin D3-Expression, einer abgeschwächten CDK4-Aktivität und hypophosphoryliertem (also aktiviertem) RB1 einhergeht [169, 170]. Außerdem wurde beschrieben, das Androgen die Expression von D-Cyclinen durch mTor-abhängige Erhöhung der Translation induziert [170]. Im Gegensatz zur Cyclin D-Expression bleiben die Cyclin E-Spiegel bei Androgenentzug unverändert; die Cyclin E-Expression ist somit für die Regulation durch

Androgene nicht entscheidend [169, 170]. Hingegen werden Cyclin A-Spiegel und die CDK2-Aktivität durch Androgenentzug vermindert, wobei die RB1-Aktivität erhöht wird. *CCNA1* (Cyclin A) ist ein bekanntes Zielgen der Repression durch RB1. Durch Androgenentzug wird ferner $p27^{Kip1}$ induziert, wodurch die CDK2-Aktivität zusätzlich vermindert wird [169]. Eine geringe $p27^{Kip1}$ Expression ist auch prognostisch für ein schnelleres Wiederauftreten eines Prostatakarzinoms [171]. Im Mausmodell fördert ein $p27^{Kip1}$ Verlust im Zusammenhang mit einer PTEN-Inaktivierung die Karzinomentstehung in der Prostata [172]. Bei Restimulation mit Androgenen wird $p27^{Kip1}$ degradiert [173]. Eine $p21^{Cip1}$ -Expression ist nach Androgenentzug in Prostatakarzinomzellen nicht mehr vorhanden, was zu der Annahme führt, dass die $p21^{Cip1}$ -Expression mit dem Tumorwachstum korreliert sei [169, 174]. *CDKN1A/p21^{Cip1}* wurde außerdem als direktes Zielgen des AR beschrieben [175].

Die PITX2-Reexpression resultiert wie ein Androgenentzug in einem G1-Arrest in den Zelllinien PC3 und 22Rv1 und einer erhöhten Expression von $p27^{Kip1}$ in der androgenabhängigen Zelllinie 22Rv1 (Abbildung 3.26). Der Zelllinien-übergreifende androgenunabhängige Effekt auf Proliferation und Zellzyklus wird anscheinend von Mechanismen begleitet, die eine Blockierung des Androgenstimulus hervorrufen.

In vielen Zelltypen wurde ausführlich eine erhöhte Aktivierung von WNT-Zielgenen wie *CCND1*, *CCND2* oder *MYC* durch eine PITX2-Überexpression beschrieben, die alle mit einer erhöhten Proliferation einhergehen und deren Produkte als Regulatoren des Zellzyklus fungieren [134]. Durch die PITX2-Reexpression in den Prostatakarzinomzellen wurde jedoch keines dieser Zielgene induziert, es wurden im Gegensatz dazu die Zellzyklusinhibitoren $p27^{Kip1}$, $p21^{Cip1}$ und $p15^{INK4B}$ verstärkt exprimiert. Cyclin D2 wurde im Prostatakarzinom auch als häufig epigenetisch inaktiviert beschrieben [176]. Im Prostatakarzinom liegt somit ein völlig gegensätzlicher Effekt auf den Zellzyklus durch die PITX2-Reexpression vor.

Dass der vorliegende Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase auch von einem seneszenten Phänotyp begleitet wird, kann durch die Induktion von $p21^{Cip1}$ und *GADD45A* bestätigt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass die Induktion der Zellzyklusinhibitoren durch eine Aktivierung eines TGF β -Signalwegs zustande kommt, da auch *BMP2* und *SMAD3* durch die PITX2-Reexpression reguliert werden.

4.3 Analyse und Auswertung des Microarray Experiments

Die Microarray-Analyse der Folgen der PITX2-Reexpression ergab eine Vielzahl von Genexpressionsveränderungen in den Zelllinien 22Rv1 und PC3; die meisten Veränderungen waren aber moderat im Ausmaß. Auch wenn ein Teil dieser Veränderungen indirekt geschehen dürfte, lässt sich von daher vermuten, dass es sich bei PITX2 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der nicht nur ausgewählte Zielgene stark aktiviert, sondern die Genexpression breit beeinflusst, womöglich in Interaktion mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren.

PITX2 wurde tatsächlich als Ko-Transkriptionsfaktor von LEF1 im WNT-Signalweg beschrieben, der die Aktivierung von Zielgenen dieses Signalwegs zusätzlich unterstützt [134]. Auch die unspezifische Erhöhung der Reportergen-Aktivitäten von FOPflash und pT109luc, welche beide den TK Minimal-Promotor verwenden durch PITX2, spricht ebenfalls für eine globalere modulierende Funktion (Abbildung 3.37, 3.43 und 3.44). Wahrscheinlich ist eine direkte spezifische Aktivierung von Genen durch PITX2 nicht die Regel. Bei einer Hauptfunktion als Ko-Transkriptionsfaktor hätte PITX2 die Möglichkeit, auf verschiedenste Prozesse zu wirken, wie es durch die sehr unterschiedlichen beeinflussten Prozesse bei der PITX2-Reexpression in den Microarray-Datensätzen deutlich wird (Abschnitt 9.5).

Im Detail wurde in diesen nach signifikant vorkommenden biologischen Prozessen und molekularen Funktionen gesucht, zu denen signifikant viele herunterregulierte oder hochregulierte Gene der beiden Zelllinien 22Rv1 und PC3 zugeordnet werden konnten. Es wurden die Datensätze nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie und nichtinduzierte Klone gegen induzierte Klone ausgewertet. Dabei war auffällig, dass durch die PITX2-Reexpression mehr biologische Prozesse durch die hochregulierten Gene als durch die herunterregulierten Gene angesprochen wurden. Bei den molekularen Funktionen ergab sich kein solcher Unterschied. Zwischen all diesen Datensätzen, gibt es, bezogen auf die biologischen Prozesse, viele Überschneidungen. Es lässt sich jedoch kein klares Muster erkennen, wonach die durch die Reexpression von PITX2 hochregulierten Gene andere Prozesse beeinflussen als die herunterregulierten Gene. Dieses Ergebnis passt ebenfalls zu der postulierten Funktion von PITX2 als Ko-Transkriptionsfaktor.

Einige der durch die PITX2-Reexpression im Vergleich induzierte gegen nichtinduzierte Klone veränderten Prozesse entsprechen den bekannten Funktionen von PITX2 in der Embryonalentwicklung, dies gilt vor allen Dingen für einige hochregulierte Gene. Zu diesen Prozessen gehören die Achsensymmetrie und die Entwicklung von Neuronen und Muskeln. Einen Effekt auf Prozesse der Drüsenentwicklung wurden ebenfalls beobachtet. Da es sich bei der Prostata um eine akzessorische Geschlechtsdrüse handelt, ist ein solcher Effekt besonders interessant. Ebenfalls von besonderer Relevanz im Kontext des Prostakarzinoms waren Prozesse der Knochenentwicklung vermehrt aufzufinden. Prozesse, die mit einer Hormonantwort assoziiert sind, wurden in den Datensätzen der hochregulierten Gene beider Zelllinien sichtbar. Durch die PITX2-Reexpression kommt es also in androgenabhängigen als auch androgenunabhängigen Zellen zur generellen Regulation einer Hormonantwort, die jedoch nicht spezifisch für Androgene ist. Da die funktionellen Assays eine Verlangsamung der Zellproliferation, einen seneszenten Phänotyp und Veränderungen im Zellzyklus ergaben, sollten in den Datensätzen auch diese Prozesse angesprochen werden; sie waren jedoch auch bei den herunterregulierten Gene in der Zelllinie 22Rv1 repräsentiert.

Einige hochregulierte Gene der Zelllinie PC3 lassen sich Prozessen zuordnen, die mit der Entwicklung des Ektoderms und von Epithelien, speziell der Differenzierung von Keratinocyten, sowie mit der Regulation der Leukocyten- und Lymphocyten-Proliferation im Zusammenhang stehen. Diese Gene sind überwiegend in bestimmten Signalwegen involviert, nämlich Cytokin-vermittelte Signalwege, besonders der BMP-Signalweg und durch Tumornekrosefaktoren vermittelte Signalwege. Tumornekrosefaktoren üben u.a. wichtige Funktionen in der Immunantwort aus, wodurch sich das Vorkommen von Prozessen der Leukocyten- und Lymphocyten-Proliferation erklärt. Auch die BMPs zählen zu den Cytokinen.

Die gegenüber der Mutterzelllinie erhöhte basale (d.h. ohne Induktion durch Tetracyclin) Expression von PITX2 übte ebenfalls signifikante Effekte auf die Genexpression aus, stärker in PC3 als in der 22Rv1 Zelllinie. In der Zelllinie 22Rv1 ist auch für die basale PITX2-Expression ein Zusammenhang mit der Zellproliferation zu finden, sowie mit der Regulation des Knochenbaus (hochregulierte Gene). In der Zelllinie PC3 betreffen die veränderten biologischen Prozesse die Zelladhäsion, die Morphogenese von Geweben,

den TGF β -Signalweg (herunterregulierte Gene), sowie generelle Prozesse der Biosynthese, Apoptose und Zelltod.

Die durch die basale PITX2-Reexpression veränderten Prozesse stimmen vielfach mit den durch die PITX2 Induktion angesprochenen Prozessen überein. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass durch die weitere Induktion der PITX2-Reexpression mit Tetracyclin Prozesse verstärkt werden, die durch die bereits leicht erhöhte Expression von PITX2 in den nichtinduzierten Klonen schon aktiviert wurden. Illustriert wird diese Annahme durch die Ergebnisse der FACS-Analysen, des Proliferationsassays und des Seneszenz-Assays, wobei die nichtinduzierten Klone jeweils grundsätzlich Unterschiede zur Mutterzelllinie zeigten, welche durch die Induktion verstärkt wurden. Das verwendete T-REx-System ist also nicht ganz optimal, insofern als es eine basale und biologisch relevante Expression von PITX2 zulässt.

Ein in diesem Zusammenhang unerwartetes Ergebnis der funktionellen Analysen und der Microarray-Datenauswertung waren Hinweise auf eine Interaktion mit dem TGF β -Signalweg; dieser Zusammenhang wird im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert.

BMPs sind sezernierte Glykoproteine aus der TGF β -Superfamilie, zu der auch TGF β , Activin und Nodal gehören. Die BMP-Signalkaskade verläuft über zwei unterschiedliche Typen von Rezeptor-Serin/Theronin-Proteinkinasen (Rezeptor Typ I und Typ II) sowie über Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie, welche das BMP-Signal in den Nukleus übermitteln [177]. BMP-Liganden binden an drei unterschiedliche BMP-Rezeptoren, nämlich Typ IA BMP-Rezeptor (ALK-3), Typ IB BMP Rezeptor (ALK-6) und Typ IA Activin-Rezeptor (ALK-2) [178]. TGF β bindet nur an den Typ I Rezeptor TGFBR1 (Alk-5) mit dem Typ II Rezeptor TGFBR2. Activin und Nodal teilen sich die Typ I Rezeptoren ACVR1B (Alk-4) und ACVR1C (Alk-7). Bei ACVRL1 (Alk-1) handelt es sich um einen Typ I Rezeptor für BMP9 und BMP10, welcher durch hohe TGF β -Konzentrationen blockiert werden kann [179].

Eine Bindung von BMP-, TGF β -, Activin- oder Nodal-Liganden an einen Typ II Rezeptor führt zu einer Phosphorylierung der Typ I Rezeptoren, wodurch wiederum Signalweg-spezifische Rezeptor-regulierte SMADs (R-SMADs) phosphoryliert werden. Durch BMP-Liganden werden SMAD1, SMAD5 oder SMAD8, durch TGF β , Activin oder Nodal werden SMAD2 oder SMAD3 phosphoryliert. Phosphorylierte R-SMADs formen Heterodimere mit

SMAD4 und translozieren in den Nukleus, wo sie die Transkription von BMP/TGF β -Zielgenen regulieren [178]. Dabei werden teilweise durch SMAD2 und SMAD3 andere Zielgene reguliert als durch SMAD1 und SMAD5. BMP-Signale können auch SMAD-unabhängig durch TAK1, MKK3 und p38 MAPK vermittelt werden [180].

Bei der Inaktivierung von SMAD-Proteinen werden diese durch CDK8 und Cyclin T-CDK9 phosphoryliert, wodurch Faktoren wie GSK3 rekrutiert werden [181, 182]. GSK3 führt zu einer Bindung der E3 Ubiquitin-Proteinligase SMURF1 (*SMAD-specific E3 ubiquitin protein ligase 1*) oder von NEDD4L (*neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4-like*), wodurch die SMAD Proteine polyubiquitiniert und im Anschluss im Proteasom abgebaut werden [181, 182]. SMAD-induzierte Expression von SMAD7 rekrutiert SMURF auch zu TGF β - und BMP-Rezeptoren, wodurch diese ebenfalls polyubiquitiniert und durch Endocytose abgebaut werden [183, 184]. Der Ubiquitinierung der Rezeptoren wirken die Deubiquitinasen USP4, USP11 und USP15 entgegen [185-187]. USP15 kann auch R-SMADs deubiquitiniieren [188]. SMAD Proteine rekrutieren die Ko-Aktivatoren p300 und CBP um durch Acetylierung die Transkription zu stimulieren [189]. Umgekehrt ist die Inhibition der SMAD-vermittelten Genexpression abhängig von Bindungspartnern, die wiederum HDACs rekrutieren. Dazu gehören TGIF1 und TGIF2, welche den Ko-Repressor CTBP rekrutieren, wodurch HDAC1 gebunden wird und dadurch TGF β /Nodal Signale limitiert werden [189]. TGF β induziert über die Promotorbindung des SMAD4-SMAD2/3-FOXO Komplexes die Expression von *CDKN2B/p15^{INK4B}*. Dadurch wird ein antiproliferativer Effekt vermittelt [190, 191].

Wechselseitige Regulation zwischen dem BMP/TGF β - und dem WNT-Signalweg wurde sowohl in der frühen Embryonalentwicklung als auch in adulten Geweben beschrieben [192-194]. Onkogenes β -Catenin fördert die Bildung von BMP4 in humanen Kolonkarzinomzellen [195]. CTGF (*connective tissue growth factor*) ist in mesenchymalen Stammzellen mit WNT und BMP ko-reguliert. Durch seine Induktion wird die durch BMP gesteuerte Osteoblasten-Differenzierung gehemmt [196]. Ein anderes WNT-Zielgen, der TGF β /Nodal Ko-Rezeptor Cripto, spielt eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung von TGF β /Nodal Signalen während der Entwicklung und in der Tumorgenese [197]. Der TGF β /BMP- und der WNT-Signalweg konvergieren am *XTWN-* (*Xenopus homeobox gene twin*) Promotor, wobei ein Komplex aus SMAD4, β -Catenin und LEF1 an regulatorische

Xtwn Elemente bindet. Diese Interaktion wird durch LEF1 vermittelt und konnte auch in Säugetierzellen bestätigt werden [198]. Obwohl auch BMP Signale durch SMAD4 vermittelt werden, übt dies keinen Effekt auf den XTWN-Promotor aus [199].

Der *Crosstalk* zwischen den Signalwegen ist somit Zielgen-spezifisch und abhängig von Ko-Faktoren. In humanen embryonalen Karzinomzellen wurden MSX1, MSX2 und ID2 synergistisch durch WNT3A und BMP4 induziert [200]. Für MSX2 und PITX2 konnte ein antagonistischer Effekt während der Zahnentwicklung gezeigt werden [201]. SMADs und β -Catenin/TCF4 fungieren als gemeinsame Ko-Faktoren; dabei wird die Interaktion zwischen den Proteinen durch den Ko-Aktivator p300 stabilisiert [202]. In humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) konnte ein *Crosstalk* zwischen SMAD3 und β -Catenin gezeigt werden. Dabei führt eine TGF β -Stimulation zu einer Ko-Translokation von SMAD3 und β -Catenin in den Nukleus, wodurch die Proliferation der hMSCs angeregt und ihre Differenzierung inhibiert wird [203]. Auch Axin interagiert mit SMAD Proteinen im Cytoplasma in nicht vollständig geklärter Weise. Einerseits wurde berichtet, dass Axin TGF β -*Signaling* durch eine SMAD3 Rekrutierung zum Typ I TGF β -Rezeptor fördert [204]. Dem steht die Beobachtung entgegen, dass endogenes Axin die Funktion von TGF β , durch eine GSK3 β -abhängige und WNT-unabhängige basale Degradation von SMAD3, negativ reguliert [205].

SMAD7 fungiert durch die Herunterregulierung von TGF β /BMP-Rezeptoren als inhibitorisches SMAD, wodurch auch R-SMADs gehemmt werden [183, 184]. SMAD7 kann direkt an β -Catenin binden und fördert dessen Degradation durch SMURF2-vermittelte Ubiquitinierung, wodurch auch die Aktivität des WNT-Signalwegs gehemmt wird [206]. Andererseits wurde beschrieben, dass SMAD7 an Axin bindet, dadurch den β -Catenin Destruktionskomplex behindert, eine SMURF2 Rekrutierung verhindert und somit β -Catenin stabilisiert werden kann [207]. Darüber hinaus führt die SMAD7-Axin Interaktion zu einer SMAD7 Ubiquitinierung und dessen Degradation [208]. In humanen Prostatakarzinomzellen begünstigt TGF β die Translokation von β -Catenin in den Nukleus, in Abhängigkeit von SMAD7. Diese Interaktion führte zu einer β -Catenin induzierten Apoptose [209].

In vielen Microarray-Vergleichen zeigten sich Effekte auf Gene des BMP/TGF β -Signalwegs (Tabelle 9.15, 9.17, 9.22, 9.24, 9.26). Zudem waren unter den biologischen Prozessen

solche mit Zusammenhang zur Ossifikation auffällig, bei der BMP2 ein wichtiger Faktor ist; es wird von Osteoblasten sezerniert. Besonders in der Zelllinie PC3 wurden solche Prozesse reguliert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene überein. In der Zelllinie PC3 zeigte sich eine starke SMAD3 Herunterregulierung, in der Zelllinie 22Rv1 jedoch eine signifikante Überexpression in den induzierten Klonen. BMP2 wurde in beiden Zelllinien durch die PITX2-Reexpression hochreguliert. Diese Ergebnisse stimmen zwischen Microarray- und qRT-PCR-Daten überein (Tabelle 3.5.2.1).

Im Prostatakarzinom sind für den TGF β /BMP-Signalweg und speziell für SMAD3 und BMP2 vielfältige Funktionen beschrieben. SMAD3 liegt im Prostatakarzinom überexprimiert vor und diese Überexpression ist für das Tumorwachstum von Bedeutung. Dabei ist die Expression in androgenunabhängigen Zelllinien wie DU145 höher als in androgenabhängigen Zellen wie LNCaP und 22Rv1 [210]. Die beschriebene Expression von SMAD3 in Zelllinien stimmt mit den mRNA-Ergebnissen dieser Arbeit überein. (Abbildung 3.26 D). In LNCaP Zellen führte eine DHT-induzierte Aktivierung des AR zu einer Hemmung der TGF β -induzierten Phosphorylierung von SMAD3. Zusätzlich wurde durch DHT die *SMAD3*-Promotoraktivität in androgenabhängigen Prostatakarzinom-Zelllinien herabgesetzt [211]. Im Gegensatz dazu förderte eine SMAD3 Inhibition durch PTTG1 (*pituitary tumor-transforming gene 1*) die Proliferation von Prostatakarzinom-Zellen [212]. In nichtmetastasierten Prostatakarzinomgeweben ist die Expression von BMP2, -4 und -7 niedrig, bei erhöhter Expression von BMP6. In Metastasen in Weichteil-Geweben war generell eine niedrige Expression der BMPs zu erkennen; in Knochenmetastasen war hingegen eine hohe BMP2, -4, -6 und -7 Expression vorhanden [213]. Zusätzlich wurde berichtet, dass BMP2 in Prostatakarzinom-Zelllinien zu einer erhöhten Migration führt, die mit einer Aktivierung von Integrinen assoziiert ist [214].

Eine Interaktion zwischen PITX2 und SMAD3 wurde bei der Regulation des Promotors des Gens für Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) beschrieben, dessen Biosynthese durch Activin induziert wird [215]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass speziell PITX2c (und auch PITX1) die *FSH* Promotoraktivität durch die Komplexbildung mit SMAD3 stimuliert [216]. Eine Interaktion zwischen BMP2 und PITX2 ist bisher nicht bekannt.

Das auffälligste Ergebnis bezüglich des TGF β /BMP-Signalwegs stellt die gegensätzliche Regulierung von SMAD3 dar. Die in LNCaP Zellen beschriebene Herunterregulierung von

SMAD3 durch eine AR-Aktivierung stimmt mit unseren Ergebnissen nur insoweit überein, dass nach PITX2-Reexpression nur in der androgenunabhängigen Zelllinie eine Herunterregulation von SMAD3 stattfindet. Diese SMAD3 Herunterregulation in der androgenunabhängigen Zelllinie hängt offensichtlich nicht mit einer Androgenwirkung, sondern mit allgemeinen Funktionen des TGF β /BMP Signalwegs zusammen. Bekannt ist, dass BMP- und TGF β - Signalwege durch ihre spezifischen R-SMADs um SMAD4 konkurrieren und durch eine Komplexbildung mit diesem regulatorischen SMAD Signalweg-spezifische Zielgene induzieren. Durch die PITX2-Reexpression wird BMP2 induziert und somit der BMP-Signalweg aktiviert; in Folge dessen könnte SMAD3 als spezifisches Zielgen des TGF β -Signalwegs reprimiert werden.

In der Zelllinie 22Rv1 wirkt die PITX2-Induktion offenbar der SMAD3 Herunterregulation durch die AR-Aktivierung entgegen und führt stattdessen zu einer starken Expression von SMAD3. Auch der in der Literatur belegte *Crosstalk* zwischen SMAD3 und β -Catenin stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. In der Zelllinie 22Rv1 wird parallel zu SMAD3 auch β -Catenin hochreguliert, in der androgenunabhängigen Zelllinie PC3 jedoch nicht. Diese Erkenntnisse lassen sich insoweit zusammenfassen, dass PITX2, SMAD3 und β -Catenin eine wechselseitige aktivierende Funktion zeigen können, die vom AR abhängig zu sein scheint.

Die PITX2-Reexpression beeinflusste *CDKN1B*, *CDKN2B* und *CDKN1A*, die für die Zellzyklusinhibitoren p27^{KIP1}, p15^{INK4B} und p21^{CIP1} kodieren. *CDKN2B* wurde nach PITX2-Reexpression in beiden Zelllinien differentiell exprimiert, dabei war der Effekt in den Klonen der Zelllinie PC3 deutlich stärker (Abb. 3.25 A, B und C, Tabelle 3.5.2.1). Für *CDKN1B* und *CDKN1A* zeigte sich ein Effekt der PITX2-Reexpression nur in der Zelllinie 22Rv1. In der Zelllinie PC3 lag nur eine - unterschiedlich starke - basale Expression vor. Diese Gene waren in den Microarray-Datensätzen nicht differentiell exprimiert. Da aber offensichtlich ein Einfluss auf den Zellzyklus und die Zellproliferation vorliegt, die mit einem seneszenten Phänotyp einhergehen, wurden verschiedene Zellzyklusinhibitoren untersucht.

Alle drei Zellzyklusinhibitoren werden durch den TGF β -Signalweg aktiviert, der sich allerdings, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, in Prostatakarzinom-Zelllinien je nach AR-Status unterschiedlich verhält. Die Expression von p27^{KIP1} und p21^{CIP1} ist ebenfalls als

abhängig vom Androgenstatus beschrieben [169, 173, 174, 217]. Dies könnte erklären, warum die Expressionsveränderungen dieser Zellzyklusinhibitoren nur in der androgenabhängigen Zelllinie 22Rv1 auftreten. Die Aktivierung von p15^{INK4B} ist nicht AR-abhängig und wurde gleichermaßen in beiden Zelllinien nachgewiesen. P27^{KIP1} und p21^{CIP1} gehören, anders als p15^{INK4B} zu derselben Proteinfamilie und inhibieren CDK2, welche durch E-Cycline reguliert wird. p15^{INK4B} hingegen reguliert CDK4/6 und kompetiert dabei mit D-Cyclinen. Beide CDKs kontrollieren den Übergang von der G1- in die S-Phase. Durch die Hochregulation der vorliegenden Zellzyklusinhibitoren wird demnach ein Austritt aus der G1-Phase verhindert. Die Ergebnisse der Zellzyklus-Analysen passen hierzu, da die PITX2-Reexpression eine deutliche Verschiebung in Richtung G1-Phase bewirkte. Da Cyclin D2 im Prostatakarzinom epigenetisch inaktiviert vorliegt, scheint dieser Zellzyklus-Regulationspunkt generell gestört zu sein.

Die PITX2-Reexpression induzierte auch den bekannten PITX2 Interaktionspartner PDLIM1 (Clim1/CLP36) in den Klonen der Zelllinie 22Rv1. In der Zelllinie PC3 war dieser gleichbleibend exprimiert (Abbildung 3.25 F). Dieses Ergebnis stimmt mit den Veränderungen in den Microarray-Datensätzen überein (Tabelle 3.5.2.1). Eine Interaktion zwischen PITX2 und PDLIM1 wurde für den WNT-Signalweg gezeigt. PITX2 bildet dabei einen Komplex mit NLI/Ldb/CLIM Ko-Aktivatoren der LIM Homeodomäne-Faktoren [134]. Für das Mammakarzinom wurde ein Zusammenhang zwischen PDLIM1 und der ER α Aktivität während der Karzinom-Entwicklung beschrieben [218]. PDLIM1 enthält PDZ- und LIM-Interaktionsdomänen, wobei die direkte Interaktion mit PITX2 wahrscheinlich über die LIM-Domäne stattfindet [219]. PDLIM1 fördert die Migration, Invasion und Metastasierung in Mammakarzinomzellen durch eine Interaktion mit α -Actinin [220]. In Adenokarzinomen des Pankreas wurde CLP36 als Tumor-Autoantigen identifiziert, welches eine humorale Immunantwort vermittelt [221].

Auch auf Gene, die wie PITX2 epigenetisch reguliert werden, zeigte sich ein aktivierender Effekt der PITX2-Reexpression in den Klonen beider Zelllinien (Abbildung 3.25 G). Auffällig ist GADD45A, welches wie PITX2 im Prostatakarzinom durch DNA-Hypermethylierung inaktiviert wird [159]. Durch die Reexpression von PITX2 werden offenbar Faktoren reguliert, die auch einen Einfluss auf die Expression von GADD45A im Prostatakarzinom ausüben. Das qRT-PCR Ergebnis stimmt mit den Veränderungen in den Microarray-

Datensätzen überein (Tabelle 3.5.2.1). Es wurde beschrieben, dass GADD45A mit p21^{CIP1} auf Proteinebene interagiert [222]. Beide werden als Antwort auf genotoxischen Stress durch p53 aktiviert und induzieren Seneszenz [223-225]. Sowohl GADD45A als auch p21^{CIP1} könnten zu dem seneszenten Phänotyp nach der PITX2-Reexpression beitragen.

SOX2 übt als Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle wichtiger Eigenschaften von Stammzellen, wie Selbsterneuerung und Pluripotenz, aus [226, 227]. In verschiedenen Studien wurde die Rolle von SOX2 während der Tumorgenese und die Korrelation von SOX2 mit der klinischen Progression in verschiedenen Tumorentitäten, wie Mammakarzinom, Rektumkarzinom und Prostatakarzinom, beschrieben [228-230]. Im Prostatakarzinom fördert SOX2 die Tumorgenese und erhöht die anti-apoptotischen Eigenschaften [229]. In Lungenkarzinomzellen reguliert SOX2 WNT2 und WNT1 auf transkriptioneller und translationaler Ebene [231]. In Mamma- und Prostatakarzinomzellen bindet SOX2 an die *CTNNB1* (β -Catenin) Promotorregion, wodurch ein direkter Effekt auf β -Catenin ausgeübt werden kann. Zusätzlich verändert die Interaktion von SOX2 mit β -Catenin die Expression von DKK3, DVL1 und DVL3 (Dishevelled) Proteinen, die Expression von DKK3 wird vermindert, die von DVL1 und DVL3 erhöht [232]. SOX2 fördert die Tumorgenese im Mamma- und Prostatakarzinom durch Begünstigung der EMT, wobei nur Faktoren des WNT-Signalwegs und nicht des TGF β - und Snail-Signalwegs eine Rolle spielen [232]. Durch die PITX2-Reexpression wurde SOX2 in den Zellklonen beider Zelllinien signifikant induziert, jedoch unterschiedlich stark (Abbildung 3.25 H). Dieses Ergebnis stimmte zwischen qRT-PCR und den Microarray-Datensätzen überein (Tabelle 3.5.2.1). Der in der Literatur berichtete Effekt auf β -Catenin lässt sich anhand der mRNA-Expressionsdaten jedoch nicht nachweisen. Da SOX2 als die Tumorgenese fördernd beschrieben wurde, war eine Hochregulation durch die PITX2-Reexpression nicht zu erwarten, da sie nicht zur Inhibition der Proliferation und des Zellzyklus passt.

Bei IRS2 handelt es sich um ein Signaladaptor-Molekül, welches u.a. eine Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB) und im C-terminalen Abschnitt mehrere Phosphorylierungsstellen an Tyrosinen und Serinen beinhaltet [233]. IRS2 (und auch IRS1) vermitteln mitogene und anti-apoptotische Signale durch Bindung an aktivierten Insulin-*like* Wachstumsfaktor I Rezeptor (IGF-IR) oder Insulin-Rezeptor (IR) [234, 235]. In einigen Geweben wirken IRS2

(und IRS1) wie transformierende Onkogene [236] [237] [238]. IRS1 beeinflusst stärker die Proliferation von Tumorzellen, IRS2 hingegen mehr die Zellmotilität und Metastasierung [235] [239, 240]. Im Kolorektalkarzinom aktiviert überexprimiertes IRS2 den PI3-Kinase-Signalweg, wodurch die Zelladhäsion erhöht wird [237]. IRS2 wird durch die PITX2-Reexpression in den PC3 Klonen signifikant hochreguliert, in den 22Rv1 Klonen signifikant herunterreguliert (Abbildung 3.25 I), gemäß qRT-PCR wie Microarray-Daten (Tabelle 3.5.2.1). Die IRS2-Hochregulation in der Zelllinie PC3 weicht - wie die von SOX2 - von der nach den generellen Auswirkung der PITX2-Reexpression erwarteten Richtung ab. Die Herunterregulation in der Zelllinie 22Rv1 stimmt mit der Hypothese überein, dass PITX2 der Tumorprogression entgegenwirkt. Allerdings kann anhand der Literatur nicht geklärt werden, worauf sich die Unterschiede der Zelllinien begründen und ob sie auf den unterschiedlichen AR-Status zurückzuführen sind

Um direkte Zielgene von PITX2 zu identifizieren, wurde ein Gewebedatensatz [8] in die Analyse miteinbezogen. Eine Korrelation von PITX2 mit Genen des Gewebedatensatzes könnte ein Hinweis auf eine direkte Regulation durch PITX2 und somit auch ein Hinweis auf direkte Zielgene darstellen. Eine positive Korrelation mit PITX2 zeigte sich bei 59 Genen, die auch in den Datensätzen der nichtinduzierten Klone gegen die induzierten Klone in beiden Zelllinien differentiell exprimiert wurden (Tabelle 3.1).

Beispiele für Gene, die positiv mit der PITX2-Expression korrelieren und direkte Zielgene darstellen könnten, sind *GPR153*, *GPC2*, *SEMA6C*, *HOXA1* und *WNT7A*. Diese Gene sind in der Embryonalentwicklung mit denselben Expressionsmustern wie die von PITX2 assoziiert. *GPR153* (*G Protein-Coupled Receptor 153*) wird im zentralen Nervensystem und in peripheren Organen, wie Herz, Lunge, Leber und Niere exprimiert [241]. *GPR153* ist in der Zelllinie durch die PITX2-Reexpression hochreguliert (Tabelle 3.1). *GPC2* (Glypican 2) wurde als spezifisch für die Entwicklung des Nervensystems beschrieben. Es wird spezifisch während der neuronalen Differenzierung exprimiert [242]. *GPC2* ist in beiden Zelllinien durch die PITX2-Reexpression hochreguliert (Tabelle 3.1). *SEMA6C* wird im Vorderhirn der Maus exprimiert, hauptsächlich während der Entwicklung, jedoch auch in adulten Mäusen [243]. *SEMA6C* ist in der Zelllinie 22Rv1 durch die PITX2-Reexpression hochreguliert (Tabelle 3.1). Die Induktion von Genen, die mit der Expression von PITX2

während der Embryonalentwicklung assoziiert sind, deutet darauf hin, dass PITX2 durchaus in der Lage ist bestimmte Zielgene direkt zu aktivieren.

Es zeigten sich zusätzlich Gene, die stark mit der PITX2-Expression korrelieren und wie PITX2 epigenetisch reguliert werden. FAM43B (*Family With Sequence Similarity 43, Member B*) ist in Leberzellkarzinom-Zelllinien - wie PITX2 - durch DNA-Methylierung reguliert. FAM43B ist daher in Leberzellkarzinomen signifikant herunterreguliert und seine Überexpression hemmt die Zellproliferation und verlangsamt den Zellzyklus [244]. Für SHOX2 (*Short stature homeobox 2*) wurde eine epigenetische Regulation im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom beschrieben, die mit PITX2 korreliert [245]. Entgegen den Studien im Prostatakarzinom war dort eine niedrige Methylierung von SHOX2 und PITX2 ein Marker für eine frühere Progression [153, 245]. Die epigenetische Regulation von PITX2 ist gewebeabhängig, jedoch wird FAM43B scheinbar ähnlich wie PITX2 reprimiert. Die Überexpression beider Gene zeigt einen ähnlichen Effekt auf die Zellproliferation und den Zellzyklus, jedoch wird FAM43B durch die PITX2-Reexpression in der Zelllinie PC3 herunterreguliert und SHOX2 in der Zelllinie 22Rv1 hochreguliert (Tabelle 3.1).

4.4 Auswirkungen auf den WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der normalen Entwicklung, der Stammzellerneuerung und pathophysiologisch in der Tumorgenese in vielen Geweben. Die Bedeutung des WNT-Signalwegs wurde zunächst im Zusammenhang mit erblichem Kolorektalkarzinom deutlich [246, 247]. Dort führt der Verlust von APC zu einer Stabilisierung von β -Catenin und damit zu einer erhöhten Expression von Zielgenen. β -Catenin Mutationen wurden in etwa 5% der Prostatakarzinome gefunden [248, 249]. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine erhöhte cytoplasmatische und nukleäre β -Catenin-Expression in 20 bis 30% der Prostatakarzinome, wobei eine höhere Expression in den weiter fortgeschrittenen Tumoren vorlag [77, 250]. Ein Zusammenhang zwischen dem weit verbreiteten PTEN-Verlust in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen und einer erhöhten β -Catenin-Expression wurde ebenfalls beschrieben [251]. Der PTEN-Verlust führt zu einer Aktivierung des AKT-Signalwegs. AKT phosphoryliert und inaktiviert GSK3 β , was zu einer Stabilisierung von β -Catenin führt.

Die wichtigsten Funktionen übt β -Catenin im Nukleus als transkriptioneller Ko-Aktivator für Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie aus und in der Plasmamembran als

Brückenmolekül, welches E-Cadherin mit dem Cytoskelett verbindet. Die Ko-Aktivator Aktivität wird durch die Menge an freiem β -Catenin bestimmt [252].

Die β -Catenin-Stabilisierung durch Hemmung von GSK3 β konnte in der Zelllinie LNCaP, welcher PTEN fehlt, direkt nachgewiesen werden [253, 254]. Jedoch konnte in LNCaP keine nukleäre Akkumulation von β -Catenin gezeigt werden. Auch konnte keine gesteigerte β -Catenin/TCF4-Aktivität gezeigt werden, was zu der Annahme führt, dass zusätzliche, von GSK3 β unabhängige Mechanismen die Aktivität des β -Catenin/TCF4-Komplexes regulieren [80, 250].

β -Catenin (*CTNNB1*) wurde durch die PITX2-Reexpression nur in den Klonen der Zelllinie 22Rv1 induziert. In der PC3 ist eine gleichbleibende Expression zu erkennen (Abbildung 3.25 L). Dieses Ergebnis stimmt mit den Veränderungen in den Microarray-Datensätzen überein (Tabelle 3.5.2.1). β -Catenin kann Komplexe mit sowohl PITX2/LEF1 als auch mit SMAD3/TCF4 bilden; dabei wird die Interaktion zwischen den Proteinen durch den Ko-Aktivator p300 stabilisiert [134, 202, 255].

Durch die Aktivierung des WNT-Signalwegs kommt es zu einer β -Catenin-abhängigen Induktion der PITX2-Expression. Die Aktivierung des Signalwegs führt auf Proteinebene zu einem Austausch von HDAC1 gegen β -Catenin. LEF1 fungiert nicht nur als Aktivator von Zielgenen des WNT-Signalwegs, es ist auch in der Lage die Aktivität dieser Zielgene zu reprimieren, wenn der Signalweg inaktiv vorliegt [256]. Ko-Expressionen mit β -Catenin, LEF1 und HDAC1 resultierten in einer β -Catenin/HDAC1-Komplexbildung, wodurch die HDAC1-Aktivität abgeschwächt wurde [256].

Eine Repression durch LEF1 ist abhängig von der HDAC1-Aktivität, wodurch der *LEF1*-Promotor hypoacetyliert wird [256]. Ohne Aktivierung des WNT-Signalwegs wird *PITX2* durch HDAC1-Bindung in der Promotorregion reprimiert [134].

Auch eine Interaktion von β -Catenin mit dem AR im Prostatakarzinom wurde beschrieben. Dabei übt β -Catenin eine ko-aktivierende Funktion aus, indem es an die AR LBD bindet [77-79, 257]. Dies wirkt sich auf die Interaktionen von TCF4 mit β -Catenin aus. Durch die Interaktion von AR und β -Catenin wird nukleäres β -Catenin abgefangen und die TCF4/ β -Catenin Interaktion somit reprimiert [78-82]. Diese Interaktion mit dem AR kann auf mRNA-Ebene in den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden; nur in der

androgenabhängigen Zelllinie 22Rv1 wird ein Anstieg der β -Catenin Expression deutlich (Abbildung 3.25 L). In der Literatur ist bekannt, dass der AR die nukleäre β -Catenin Translokation in Abhängigkeit von Androgen fördert, jedoch unabhängig von GSK3 β und APC [257]. Dabei kommt es zu einer Ko-Lokalisation von β -Catenin und dem AR im Nukleus [78, 257].

Für das Ovarialkarzinom wurde beschrieben, dass WNT-Liganden, WNT-Rezeptoren und Dishevelled Proteine durch PITX2 reguliert werden. PITX2 interagiert mit den Promotoren von fünf verschiedenen WNT-Genen, *WNT2*, *WNT5a*, *WNT6*, *WNT9a* und *WNT2b* [258]. Eine Aktivierung konnte für den *WNT2* und den *WNT5a* Promotor gezeigt werden. Zusätzlich induziert PITX2 die Expression aller WNT Gene (außer *WNT2b*). Auch eine Hochregulierung von aktivem β -Catenin durch eine PITX2-Überexpression wurde gezeigt, woraus eine erhöhte Zellproliferation resultierte [258]. Interessanterweise wurde in derselben Arbeit auch eine negative Regulation des WNT-Signalwegs durch PITX2 an einer anderen Stelle gezeigt. Durch eine PITX2-Überexpression wurde die Expression der FZD-Rezeptoren FZD2, FZD3, FZD4 und FZD9, sowie der Ko-Rezeptoren LRP5 und LRP6 vermindert, wodurch eine weitere Aktivierung des WNT-Signalwegs eingeschränkt wurde [258]. FZD-Rezeptoren binden die kanonischen WNT-Liganden [259, 260]. Eine negative Regulation wurde auch für andere Faktoren des WNT-Signalwegs beschrieben. GSK3 und CKI sind beide sowohl in die Aktivierung, als auch in die Inhibierung des Signalwegs, durch die Phosphorylierung von LRP6 und β -Catenin, involviert [261]. Auch AXIN2 fungiert als negativer Regulator im WNT-Signalweg, da es die Degradation von β -Catenin begünstigt [262].

Die Transfektionsexperimente mit den TOPflash / FOPflash Reporterkonstrukten belegten, dass konstitutiv aktives β -Catenin erwartungsgemäß den WNT-Signalweg aktiviert; diese Aktivierung wurde durch die Ko-Transfektion mit PITX2a gehemmt (Abbildung 3.42 und 3.43). Die Interpretation dieser Experimente wird dadurch erschwert, dass PITX2a an sich sowohl beim TOPflash- als auch beim FOPflash-Konstrukt zu einer leichten Aktivierung führt, also unabhängig von einer Interaktion mit TCF4. PITX2a aktiviert wahrscheinlich den verwendeten TK Minimal-Promotor (Abbildung 3.42 und 3.43). Diesen Effekt zeigten auch Kontrollexperimente mit einem unabhängigen

Reporterkonstrukt (pT109luc), welches nur diesen TK Minimal-Promotor enthält (Abbildung 3.34).

In den Microarray-Analysen wurden durch PITX2 deutlich mehr Gene des WNT-Signalwegs hochreguliert als vermindert exprimiert. Die Daten der Microarray-Analyse zeigten jedoch auch eine Induktion von negativen Regulatoren des WNT-Signalwegs, wie GSK3 und AXIN2, durch die PITX2-Reexpression. Auch verschiedene FZD-Rezeptoren, wie FZD1, FZD3 und FZD7, werden induziert. FZD8 wird durch die PITX2-Reexpression eher vermindert exprimiert. Verschiedene WNT-Liganden sind in den Datensätzen der Analyse ebenfalls enthalten. Dabei werden WNT11, WNT3 und WNT7b induziert, hingegen werden WNT10B, WNT2, WNT5B und WNT7A vermindert exprimiert. Diese Ergebnisse korrelieren mit der bekannten Literatur. PITX2 selbst fungiert als negativer Regulator im WNT-Signalweg [258]. Die Reexpression von PITX2 führt in den Ergebnissen dieser Arbeit zusätzlich auch zur Induktion von anderen bekannten negativen Regulatoren [261]. PITX2 reguliert somit viele Komponenten des WNT-Signalwegs direkt oder indirekt; die schlussendliche Auswirkung hängt daher stark vom Ausgangszustand der jeweiligen Zelle ab.

Aufgrund der bekannten Literatur war davon auszugehen, dass eine PITX2-Reexpression einen positiven Effekt auf den WNT-Signalweg ausübt und dessen Zielgene verstärkt aktiviert. Da eine PITX2-Überexpression jedoch den WNT-Signalweg - zumindest auf der Ebene der TCF4-Aktivität - inhibiert, ist davon auszugehen, dass im Kontext des Prostatakarzinoms die negative Regulation des WNT-Signalwegs überwiegt. In den Microarray-Daten war entsprechend keine Induktion von WNT-Zielgenen nachweisbar. Es wurden hingegen negative Regulatoren des WNT-Signalwegs induziert (GSK3, AXIN2), aber auch einige aktivierende Komponenten wie FZD-Rezeptoren und WNT-Liganden reprimiert. Basu stellte 2013 eine neue Hypothese auf, die zusätzlich zu der aktivierenden Wirkung von PITX2 einen negativen *Feedbackloop* beinhaltet [258]. Diese neue Erkenntnis passt zu den Beobachtungen dieser Arbeit und führt zu der Annahme, dass PITX2 im Prostatakarzinom zur Inhibition einer Aktivierung des WNT-Signalwegs führt. Dieser Effekt ist im beschriebenen Kontext mit dem AR durchaus sinnvoll, da bekannt ist, dass der AR- und der WNT-Signalweg um β -Catenin konkurrieren. Eine starke Aktivierung des WNT-Signalwegs würde viel β -Catenin bereitstellen, welches bevorzugt mit dem AR interagiert.

PITX2 könnte somit als Regulator der β -Catenin Produktion fungieren und dadurch die Signalwege im Gleichgewicht halten.

4.5 Auswirkungen auf den AR-Signalweg

Mit vier unterschiedlichen androgenabhängigen Reporterkonstrukten wurde einheitlich beobachtet, dass PITX2a und PITX2c eine inaktivierende Wirkung auf diese Konstrukte ausüben, die auch nach Stimulation mit Androgen erhalten bleibt (Abbildung 3.29 – 3.32). Wie erwartet [78, 81, 249], aktivierte konstitutiv aktives β -Catenin ein androgenabhängiges Reporterkonstrukt mit androgen-responsiven Elementen (ARE) nach Stimulation mit synthetischem Androgen zusätzlich. Durch eine Ko-Transfektion mit PITX2 wurde auch diese starke Aktivierung wieder gehemmt. Aktives β -Catenin kann den inaktivierenden Effekt von PITX2 auf die AR-abhängige Promotoraktivität nicht verhindern (Abbildung 3.33).

In der Zelllinie PC3 war bei Ko-Transfektion von PITX2 die Expression des AR deutlich vermindert. Die Zugabe von synthetischem Androgen stabilisierte den AR auch in diesem Falle (Abbildung 3.35). Die verminderte Menge an AR könnte zwar zu der Repression der AR-abhängigen Promotoraktivität beitragen, kann den Effekt aber nicht erklären. In PC3 unterdrückte nämlich auch PITX2c die Promotoraktivität ohne signifikanten Einfluss auf die Menge des AR. Ebenso übten PITX2a und PITX2c einen reprimierenden Effekt auf die AR-Aktivität in 22Rv1 aus, ohne dass es zu einer Verringerung der Rezeptormenge kam. Der Unterschied in der Wirkung von PITX2a auf die AR-Menge zwischen PC3 und 22RV1 könnte daran liegen, dass 22Rv1 endogen zusätzlich eine Spleißvariante exprimiert, die die Aktivität und Stabilität des normalen AR erhöht [263, 264].

Die immunocytochemische Auswertung zeigte nach Ko-Transfektion mit PITX2 keinen Effekt auf die Lokalisation des AR. Aktivierter AR nach Androgenzugabe war vermehrt im Nukleus vorzufinden. Das gleichzeitige Vorhandensein von PITX2 im Nukleus führte zu keiner Verschiebung aus dem Nukleus heraus in das Cytoplasma, auch nicht in der PC3 Zelllinie (Abbildung 3.40 und 3.41). Die Repression der androgenabhängigen Promotoren durch PITX2 kommt also offenbar nicht durch einen Austransport des AR zustande, sondern erfolgt im Nukleus. Wahrscheinlich spricht PITX2 in der PC3 Zelllinie zusätzliche Faktoren an, damit der AR aus dem Nukleus transloziert, ubiquitiniert und abgebaut werden kann.

Da PITX2a und PITX2c beide einen reprimierenden Effekt auf androgenabhängige Promoterkonstrukte ausüben, ist dafür wahrscheinlich die gemeinsame Homeodomäne oder die OAR verantwortlich. Die genauen Funktionen der OAR sind nicht vollständig geklärt, eine Funktion bei der Transaktivierung oder bei Proteininteraktionen ist denkbar. Beide Domänen können eine DNA-bindende Funktion von PITX2 vermitteln, wodurch der AR Promotor gebunden und inaktiviert werden könnte. Schayek et al. 2012 berichten von einer solchen Wirkung [265]. In den Reporter-gen-Experimenten wurde der AR allerdings von einem fremden, starken viralen Promotor exprimiert, so dass diese Erklärung hier nicht tragen kann. Zudem war in den PITX2-transfizierten Zellklonen kein Unterschied in der Expression des AR messbar.

Im Prinzip könnte die reprimierende Wirkung von PITX2 durch eine direkte Interaktion mit dem AR vermittelt werden. Das negative Ergebnis des Two-Hybrid-Assays spricht allerdings eher für eine indirekte Wirkung (Abbildung 3.39); ein Immunpräzipitations-experiment zu dieser Frage steht noch aus. Der reprimierende Effekt von PITX2 auf den AR könnte demnach durch gemeinsame Interaktionspartner vermittelt werden, die entweder durch PITX2 aktiviert werden und in der Folge den AR inaktivieren oder durch PITX2 inaktiviert werden, wodurch der AR an Aktivität verliert. Die reprimierende Wirkung von PITX2a ist auf das Protein des wildtypischen AR in Abwesenheit von Androgen am stärksten. Bei der Aktivierung des AR durch Androgen wird diese Inhibition abgeschwächt, wahrscheinlich durch die Rekrutierung von Ko-Faktoren, wodurch die Inhibition des AR erschwert wird.

In der Literatur wurden mehrere Gene beschrieben, die sowohl mit dem AR als auch mit PITX2 und β -Catenin interagieren. Interessanterweise beeinflussen alle diese Faktoren die Acetylierung des AR, die für seine Aktivität und Stabilität wesentlich ist [40, 41, 266-268]. CBP (*CREB binding protein*)/p300 und Tip60(KAT5)/TRAP sind wie NLI/LDb/CLIM Ko-Aktivatoren von PITX2 [134]. CBP/p300 und Tip60/TRAP sind in die Acetylierung von β -Catenin und AR involviert. Eine direkte AR-Acetylierung konnte durch p300 und p300/CREB (*cAMP-response element-binding protein*) und *Tat-interactive* Protein (Tip60) nachgewiesen werden [40-42]. Die Modulierung der AR-Acetylierung ist außerdem entscheidend für die Kontrolle der AR-Aktivität während des Zellzyklus. Die Acetylierung des AR führt zu einem erhöhten Zellüberleben, erhöhter Proliferation und einer erhöhten

AR-regulierten Genexpression über eine erhöhte Expression von Zellzyklus-Kontrollfaktoren wie Cyclin D und Cyclin E [39]. Die Acetyltransferase- und Ko-Aktivator-Aktivität von p300 kann durch Phosphorylierung gehemmt werden [269, 270]. Tip60 reguliert die Transkription von AR-Zielgenen androgenunabhängig. Durch eine Tip60 Herunterregulierung wird die Translokation des AR in das Cytoplasma induziert. Eine Überexpression von Tip60 resultiert in einer erhöhten Acetylierung des AR und seiner Relokalisation in den Nukleus, auch ohne Androgen in kastrationsresistenten LNCaP Zellen, wohingegen eine Tip60 Herunterregulierung das Zellwachstum reprimiert. *Silencing* von Tip60 reprimiert das Wachstum von AR-exprimierenden Prostatakarzinom-Zellen durch einen Zellzyklus-Arrest in der G1 Phase [271].

Die Aktivität des AR kann auch durch die Acetylierung anderer Proteine, welche die AR-Aktivität modulieren, geändert werden. P300 acetyliert β -Catenin und reguliert damit dessen Interaktion mit TCF4. Acetyliertes β -Catenin bindet affiner an TCF4, dadurch wurde jedoch ein negativer Effekt auf die Bindung von β -Catenin an den AR ausgeübt [272]. Durch eine Interaktion von SMAD3/SMAD4 mit der AR DBD und LBD wird die AR-Acetylierung verhindert und die AR-Aktivität inhibiert [267]. Auch die Rekrutierung von HDAC1 durch den Ko-Repressor Sin3a führt zu einer Deacetylierung des AR und einer Verminderung seiner Aktivität [41, 43]. HDAC1, Tip60 und der AR bilden einen Komplex, in dem die Acetylierung und Deacetylierung des AR reguliert wird [41]. Der HDAC-Inhibitor TSA (Trichostatin A) erhöht in Gegenwart von DHT AR-Spiegel, Transkription und Chromatin-Remodellierung [268]. Auch für SMAD3 konnte eine Interaktion mit dem Ko-Aktivator p300 gezeigt werden, welche durch den Ko-Repressor c-Ski gestört wird. Dieser rekrutiert HDAC1 mittels Sin3a, wodurch die Acetyltransferase-Aktivität des p300/SMAD3-Komplexes inhibiert wird [273, 274].

Eine Interaktion mit HDAC1 und SMAD3 wurde auch für PITX2 beschrieben [134, 215]. HDAC1 bindet an den *PITX2*-Promotor, wodurch dessen Aktivität inhibiert wird. Durch eine Aktivierung des WNT-Signalwegs kommt es zu einem Austausch von HDAC1 gegen β -Catenin [134]. Die Interaktionen von PITX2 im WNT-Signalweg wurden in Abschnitt 4.3.1 schon genauer beschrieben, ebenso die Funktion eines PITX2/SMAD3 Protein-Komplexes als Aktivator der transkriptionellen Aktivität des *FSH* Promotors [215].

4.6 Fazit

Die Argumente in den vorherigen Abschnitten lassen sich wie folgt zusammenfassen. Die vom AR unabhängigen durch die PITX2-Reexpression ausgelösten Veränderungen der Zelleigenschaften, wie die verlangsamte Proliferation und der seneszenz Phänotyp, sowie der G1-Arrest, sind wahrscheinlich mit einer Aktivierung von TGF β -Signalwegen assoziiert. Dabei werden insbesondere Zellzyklusinhibitoren induziert, welche die Seneszenz und den Zellzyklus-Arrest vermitteln.

Unterschieden werden muss hierbei in androgenabhängigen und androgenunabhängigen Zelllinien besonders die Funktion von SMAD3. SMAD3 steht stellvertretend für den TGF β -Signalweg, welcher in androgenunabhängiger Weise inaktiviert wird und damit den allgemeinen Zustand dieses Signalwegs repräsentiert. Dabei konkurriert häufig der TGF β - mit dem BMP-Signalweg um die Aktivierung von spezifischen Zielgenen. Im androgenabhängigen Kontext ergibt sich trotz Aktivierung des BMP-Signalwegs eine Aktivierung von SMAD3, welche im Zusammenhang mit der Regulation des AR stehen muss.

Die Arbeitshypothese besagte, dass durch die vorhandene Herunterregulierung von PITX2 im Prostatakarzinom eine Verschiebung der β -Catenin Wirkung vom WNT-Signalweg hin zum AR stattfindet. Durch eine PITX2-Reexpression sollte der WNT-Signalweg stabilisiert und dessen Zielgene vermehrt induziert und dadurch ein negativer Effekt auf den AR ausgeübt werden. Diese Hypothese trifft nur bedingt zu. Die PITX2-Reexpression hat tatsächlich einen, sogar unerwartet starken, reprimierenden Effekt auf die Aktivität des AR und z.T. auf den AR auf Proteinebene. Jedoch bleibt der positive Effekt auf den WNT-Signalweg aus. Auch hier liegt eine Inhibition durch die PITX2-Reexpression vor, die durch einen negativen *Feedback-Loop* erklärt werden könnte. Dabei würde PITX2 den WNT-Signalweg erst aktivieren, um β -Catenin freizugeben und gleichzeitig auf Rezeptorebene wieder inhibieren. In anderen Tumoren wurde die durch PITX2 bedingte Aktivierung des WNT-Signalwegs als förderlich für die Progression und Proliferation der jeweiligen Karzinome beschrieben. Die Wirkung von PITX2 ist offenbar stark kontextabhängig und hängt möglicherweise vom Ausgangsstatus des WNT-Signalwegs und seiner vielen Komponenten ab. PITX2 übernimmt im Prostatakarzinom die übergreifende Funktion

eines Regulators für verschiedene Signalwege. Dabei überwiegt wahrscheinlich die Inaktivierung des AR-Signalwegs gegenüber der Regulation des WNT-Signalwegs.

Speziell könnte die indirekte Regulation des AR durch PITX2 durch ein - noch hypothetisches - Netzwerk erklärt werden. Hauptsächlich verantwortlich für den reprimierenden Effekt auf den AR wäre demnach ein Zusammenspiel von HDAC1 und SMAD3. Für beide Faktoren konnte eine negative Wirkung auf die Aktivität des AR gezeigt werden. Die aktivierende Funktion der Acetyltransferasen p300 und Tip60 wirkt dieser Hemmung eventuell entgegen, jedoch wurde eine Aktivierung durch p300 und Tip60 auch für β -Catenin beschrieben. Die beschriebene ko-aktivierende Funktion von β -Catenin auf den AR würde jedoch durch die PITX2-Reexpression und die dadurch resultierende Veränderung des WNT-Signalwegs stark vermindert. Insgesamt legt diese Arbeit eine Funktion von PITX2 als wichtiger Modulator des komplexen Regulationsnetzwerks zwischen dem WNT-, dem TGF β - und dem AR-Signalweg nahe.

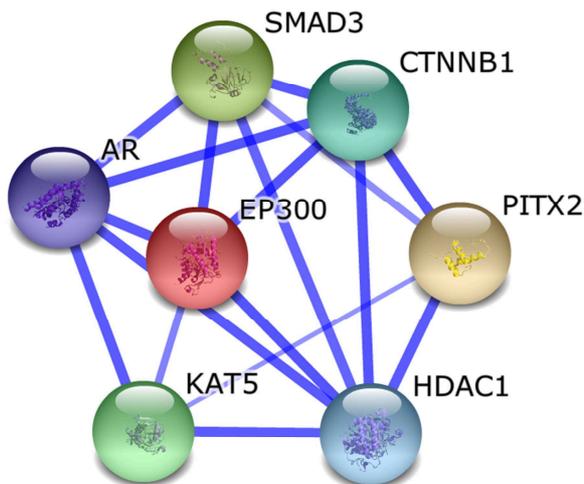


Abbildung 4.1: Netzwerk der interagierende Gene, die an der Regulierung des AR beteiligt sind. Das Netzwerk wurde mit Hilfe der String 9.1 Datenbank (<http://string-db.org/>) erstellt. In der Datenbank ist die Interaktion zwischen PITX2 und p300 nicht vorhanden, in der Literatur wurde diese jedoch beschrieben.

5 Literaturverzeichnis

1. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, **Cancer statistics, 2012**. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
2. Mellinger, G.T., D. Gleason, and J. Bailar, 3rd, **The histology and prognosis of prostatic cancer**. J Urol, 1967. **97**(2): p. 331-7.
3. Schroder, F.H., P. Hermanek, L. Denis, W.R. Fair, M.K. Gospodarowicz, and M. Pavone-Macaluso, **The TNM classification of prostate cancer**. Prostate Suppl, 1992. **4**: p. 129-38.
4. Edwards, J., N.S. Krishna, K.M. Grigor, and J.M. Bartlett, **Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer**. Br J Cancer, 2003. **89**(3): p. 552-6.
5. Gerhardt, J., M. Montani, P. Wild, M. Beer, F. Huber, T. Hermanns, M. Muntener, and G. Kristiansen, **FOXA1 promotes tumor progression in prostate cancer and represents a novel hallmark of castration-resistant prostate cancer**. Am J Pathol, 2012. **180**(2): p. 848-61.
6. Loneragan, P.E. and D.J. Tindall, **Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression**. J Carcinog, 2011. **10**: p. 20.
7. Zhu, M.L. and N. Kyprianou, **Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells**. Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(4): p. 841-9.
8. Taylor, B.S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B.S. Carver, V.K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J.E. Major, M. Wilson, N.D. Socci, A.E. Lash, A. Heguy, J.A. Eastham, H.I. Scher, V.E. Reuter, P.T. Scardino, C. Sander, C.L. Sawyers, and W.L. Gerald, **Integrative genomic profiling of human prostate cancer**. Cancer Cell, 2010. **18**(1): p. 11-22.
9. Barbieri, C.E. and S.A. Tomlins, **The prostate cancer genome: perspectives and potential**. Urol Oncol, 2014. **32**(1): p. 53 e15-22.
10. Tomlins, S.A., D.R. Rhodes, S. Perner, S.M. Dhanasekaran, R. Mehra, X.W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J.E. Montie, R.B. Shah, K.J. Pienta, M.A. Rubin, and A.M. Chinnaiyan, **Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer**. Science, 2005. **310**(5748): p. 644-8.
11. Tomlins, S.A., B. Laxman, S.M. Dhanasekaran, B.E. Helgeson, X. Cao, D.S. Morris, A. Menon, X. Jing, Q. Cao, B. Han, J. Yu, L. Wang, J.E. Montie, M.A. Rubin, K.J. Pienta, D. Roulston, R.B. Shah, S. Varambally, R. Mehra, and A.M. Chinnaiyan, **Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer**. Nature, 2007. **448**(7153): p. 595-9.
12. Hermans, K.G., R. van Marion, H. van Dekken, G. Jenster, W.M. van Weerden, and J. Trapman, **TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer**. Cancer Res, 2006. **66**(22): p. 10658-63.
13. Yu, J., R.S. Mani, Q. Cao, C.J. Brenner, X. Cao, X. Wang, L. Wu, J. Li, M. Hu, Y. Gong, H. Cheng, B. Laxman, A. Vellaichamy, S. Shankar, Y. Li, S.M. Dhanasekaran, R. Morey, T. Barrette, R.J. Lonigro, S.A. Tomlins, S. Varambally, Z.S. Qin, and A.M. Chinnaiyan, **An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression**. Cancer Cell, 2010. **17**(5): p. 443-54.
14. Barwick, B.G., M. Abramovitz, M. Kodani, C.S. Moreno, R. Nam, W. Tang, M. Bouzyk, A. Seth, and B. Leyland-Jones, **Prostate cancer genes associated with TMPRSS2-ERG gene fusion and prognostic of biochemical recurrence in multiple cohorts**. Br J Cancer, 2010. **102**(3): p. 570-6.
15. Attard, G., J. Clark, L. Ambrosine, G. Fisher, G. Kovacs, P. Flohr, D. Berney, C.S. Foster, A. Fletcher, W.L. Gerald, H. Moller, V. Reuter, J.S. De Bono, P. Scardino, J. Cuzick, C.S.

- Cooper, and G. Transatlantic Prostate, **Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer**. *Oncogene*, 2008. **27**(3): p. 253-63.
16. Saramaki, O.R., A.E. Harjula, P.M. Martikainen, R.L. Vessella, T.L. Tammela, and T. Visakorpi, **TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis**. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(11): p. 3395-400.
 17. Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R.M. Evans, **The nuclear receptor superfamily: the second decade**. *Cell*, 1995. **83**(6): p. 835-9.
 18. McKenna, N.J., R.B. Lanz, and B.W. O'Malley, **Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology**. *Endocr Rev*, 1999. **20**(3): p. 321-44.
 19. Tsai, M.J. and B.W. O'Malley, **Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members**. *Annu Rev Biochem*, 1994. **63**: p. 451-86.
 20. Chang, C.S., J. Kokontis, and S.T. Liao, **Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors**. *Science*, 1988. **240**(4850): p. 324-6.
 21. Lubahn, D.B., D.R. Joseph, P.M. Sullivan, H.F. Willard, F.S. French, and E.M. Wilson, **Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome**. *Science*, 1988. **240**(4850): p. 327-30.
 22. Zhou, Z.X., M. Sar, J.A. Simental, M.V. Lane, and E.M. Wilson, **A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences**. *J Biol Chem*, 1994. **269**(18): p. 13115-23.
 23. He, B., J.T. Minges, L.W. Lee, and E.M. Wilson, **The FXXLF motif mediates androgen receptor-specific interactions with coregulators**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(12): p. 10226-35.
 24. Simental, J.A., M. Sar, M.V. Lane, F.S. French, and E.M. Wilson, **Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor**. *J Biol Chem*, 1991. **266**(1): p. 510-8.
 25. Jenster, G., H.A. van der Korput, J. Trapman, and A.O. Brinkmann, **Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor**. *J Biol Chem*, 1995. **270**(13): p. 7341-6.
 26. Umesono, K. and R.M. Evans, **Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors**. *Cell*, 1989. **57**(7): p. 1139-46.
 27. Heery, D.M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M.G. Parker, **A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors**. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 733-6.
 28. Buchanan, G., N.M. Greenberg, H.I. Scher, J.M. Harris, V.R. Marshall, and W.D. Tilley, **Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer**. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(5): p. 1273-81.
 29. Georget, V., J.M. Lobaccaro, B. Terouanne, P. Mangeat, J.C. Nicolas, and C. Sultan, **Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor**. *Mol Cell Endocrinol*, 1997. **129**(1): p. 17-26.
 30. Tyagi, R.K., Y. Lavrovsky, S.C. Ahn, C.S. Song, B. Chatterjee, and A.K. Roy, **Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells**. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(8): p. 1162-74.
 31. Picard, D. and K.R. Yamamoto, **Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor**. *EMBO J*, 1987. **6**(11): p. 3333-40.
 32. Saporita, A.J., Q. Zhang, N. Navai, Z. Dincer, J. Hahn, X. Cai, and Z. Wang, **Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor**. *J Biol Chem*, 2003. **278**(43): p. 41998-2005.
 33. DeFranco, D.B., C. Ramakrishnan, and Y. Tang, **Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors**. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998. **65**(1-6): p. 51-8.
 34. Pratt, W.B. and D.O. Toft, **Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones**. *Endocr Rev*, 1997. **18**(3): p. 306-60.

35. Veldscholte, J., C.A. Berrevoets, N.D. Zegers, T.H. van der Kwast, J.A. Grootegoed, and E. Mulder, **Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors**. *Biochemistry*, 1992. **31**(32): p. 7422-30.
36. Georget, V., B. Terouanne, J.C. Nicolas, and C. Sultan, **Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor**. *Biochemistry*, 2002. **41**(39): p. 11824-31.
37. Saporita, A.J., J. Ai, and Z. Wang, **The Hsp90 inhibitor, 17-AAG, prevents the ligand-independent nuclear localization of androgen receptor in refractory prostate cancer cells**. *Prostate*, 2007. **67**(5): p. 509-20.
38. Shafi, A.A., A.E. Yen, and N.L. Weigel, **Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer**. *Pharmacol Ther*, 2013. **140**(3): p. 223-38.
39. Fu, M., M. Rao, C. Wang, T. Sakamaki, J. Wang, D. Di Vizio, X. Zhang, C. Albanese, S. Balk, C. Chang, S. Fan, E. Rosen, J.J. Palvimo, O.A. Janne, S. Muratoglu, M.L. Avantaggiati, and R.G. Pestell, **Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth**. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(23): p. 8563-75.
40. Fu, M., C. Wang, A.T. Reutens, J. Wang, R.H. Angeletti, L. Siconolfi-Baez, V. Ogryzko, M.L. Avantaggiati, and R.G. Pestell, **p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation**. *J Biol Chem*, 2000. **275**(27): p. 20853-60.
41. Gaughan, L., I.R. Logan, S. Cook, D.E. Neal, and C.N. Robson, **Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 25904-13.
42. Wang, Z., Z. Wang, J. Guo, Y. Li, J.H. Bavarva, C. Qian, M.C. Brahimi-Horn, D. Tan, and W. Liu, **Inactivation of androgen-induced regulator ARD1 inhibits androgen receptor acetylation and prostate tumorigenesis**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(8): p. 3053-8.
43. Sharma, M. and Z. Sun, **5'TG3' interacting factor interacts with Sin3A and represses AR-mediated transcription**. *Mol Endocrinol*, 2001. **15**(11): p. 1918-28.
44. Ai, J., Y. Wang, J.A. Dar, J. Liu, L. Liu, J.B. Nelson, and Z. Wang, **HDAC6 regulates androgen receptor hypersensitivity and nuclear localization via modulating Hsp90 acetylation in castration-resistant prostate cancer**. *Mol Endocrinol*, 2009. **23**(12): p. 1963-72.
45. Gibbs, A., J. Schwartzman, V. Deng, and J. Alumkal, **Sulforaphane destabilizes the androgen receptor in prostate cancer cells by inactivating histone deacetylase 6**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(39): p. 16663-8.
46. Metzger, E., M. Wissmann, N. Yin, J.M. Muller, R. Schneider, A.H. Peters, T. Gunther, R. Buettner, and R. Schule, **LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription**. *Nature*, 2005. **437**(7057): p. 436-9.
47. Yuan, X., C. Cai, S. Chen, S. Chen, Z. Yu, and S.P. Balk, **Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis**. *Oncogene*, 2013.
48. Gaughan, L., J. Stockley, N. Wang, S.R. McCracken, A. Treumann, K. Armstrong, F. Shaheen, K. Watt, I.J. McEwan, C. Wang, R.G. Pestell, and C.N. Robson, **Regulation of the androgen receptor by SET9-mediated methylation**. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(4): p. 1266-79.
49. Ko, S., J. Ahn, C.S. Song, S. Kim, K. Knapczyk-Stwora, and B. Chatterjee, **Lysine methylation and functional modulation of androgen receptor by Set9 methyltransferase**. *Mol Endocrinol*, 2011. **25**(3): p. 433-44.
50. Ponguta, L.A., C.W. Gregory, F.S. French, and E.M. Wilson, **Site-specific androgen receptor serine phosphorylation linked to epidermal growth factor-dependent growth of castration-recurrent prostate cancer**. *J Biol Chem*, 2008. **283**(30): p. 20989-1001.

51. Lin, H.K., S. Yeh, H.Y. Kang, and C. Chang, **Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor**. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7200-5.
52. Gioeli, D., S.B. Ficarro, J.J. Kwiek, D. Aaronson, M. Hancock, A.D. Catling, F.M. White, R.E. Christian, R.E. Settlage, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and M.J. Weber, **Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites**. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 29304-14.
53. Yang, C.S., H.W. Xin, J.B. Kelley, A. Spencer, D.L. Brautigan, and B.M. Paschal, **Ligand binding to the androgen receptor induces conformational changes that regulate phosphatase interactions**. Mol Cell Biol, 2007. **27**(9): p. 3390-404.
54. Gioeli, D., B.E. Black, V. Gordon, A. Spencer, C.T. Kesler, S.T. Eblen, B.M. Paschal, and M.J. Weber, **Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization**. Mol Endocrinol, 2006. **20**(3): p. 503-15.
55. Wen, Y., M.C. Hu, K. Makino, B. Spohn, G. Bartholomeusz, D.H. Yan, and M.C. Hung, **HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway**. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6841-5.
56. Nan, B., T. Snabboon, E. Unni, X.J. Yuan, Y.E. Whang, and M. Marcelli, **The PTEN tumor suppressor is a negative modulator of androgen receptor transcriptional activity**. J Mol Endocrinol, 2003. **31**(1): p. 169-83.
57. Lin, H.K., Y.C. Hu, D.K. Lee, and C. Chang, **Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells**. Mol Endocrinol, 2004. **18**(10): p. 2409-23.
58. Lin, H.K., Y.C. Hu, L. Yang, S. Altuwaijri, Y.T. Chen, H.Y. Kang, and C. Chang, **Suppression versus induction of androgen receptor functions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer LNCaP cells with different passage numbers**. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 50902-7.
59. Salas, T.R., J. Kim, F. Vakar-Lopez, A.L. Sabichi, P. Troncoso, G. Jenster, A. Kikuchi, S.Y. Chen, L. Shemshedini, M. Suraokar, C.J. Logothetis, J. DiGiovanni, S.M. Lippman, and D.G. Menter, **Glycogen synthase kinase-3 beta is involved in the phosphorylation and suppression of androgen receptor activity**. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19191-200.
60. Wang, L., H.K. Lin, Y.C. Hu, S. Xie, L. Yang, and C. Chang, **Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells**. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32444-52.
61. Xin, L., M.A. Teitell, D.A. Lawson, A. Kwon, I.K. Mellingerhoff, and O.N. Witte, **Progression of prostate cancer by synergy of AKT with genotropic and nongenotropic actions of the androgen receptor**. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7789-94.
62. Shu, S.K., Q. Liu, D. Coppola, and J.Q. Cheng, **Phosphorylation and activation of androgen receptor by Aurora-A**. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 33045-53.
63. Li, Z., M. Szabolcs, J.D. Terwilliger, and A. Efstratiadis, **Prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma in mice expressing a probasin-Neu oncogenic transgene**. Carcinogenesis, 2006. **27**(5): p. 1054-67.
64. Ande, S.R., J. Chen, and S. Maddika, **The ubiquitin pathway: an emerging drug target in cancer therapy**. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 199-205.
65. Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser, **Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins**. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 159-80.
66. Lin, H.K., L. Wang, Y.C. Hu, S. Altuwaijri, and C. Chang, **Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase**. EMBO J, 2002. **21**(15): p. 4037-48.
67. Xu, K., H. Shimelis, D.E. Linn, R. Jiang, X. Yang, F. Sun, Z. Guo, H. Chen, W. Li, H. Chen, X. Kong, J. Melamed, S. Fang, Z. Xiao, T.D. Veenstra, and Y. Qiu, **Regulation of androgen**

- receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination.** *Cancer Cell*, 2009. **15**(4): p. 270-82.
68. Zoubeidi, A., A. Zardan, E. Beraldi, L. Fazli, R. Sowery, P. Rennie, C. Nelson, and M. Gleave, **Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity.** *Cancer Res*, 2007. **67**(21): p. 10455-65.
69. Burgdorf, S., P. Leister, and K.H. Scheidtmann, **TSG101 interacts with apoptosis-antagonizing transcription factor and enhances androgen receptor-mediated transcription by promoting its monoubiquitination.** *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 17524-34.
70. Gaughan, L., I.R. Logan, D.E. Neal, and C.N. Robson, **Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation.** *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(1): p. 13-26.
71. Draker, R., E. Sarcinella, and P. Cheung, **USP10 deubiquitylates the histone variant H2A.Z and both are required for androgen receptor-mediated gene activation.** *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(9): p. 3529-42.
72. Faus, H., H.A. Meyer, M. Huber, I. Bahr, and B. Haendler, **The ubiquitin-specific protease USP10 modulates androgen receptor function.** *Mol Cell Endocrinol*, 2005. **245**(1-2): p. 138-46.
73. Dirac, A.M. and R. Bernards, **The deubiquitinating enzyme USP26 is a regulator of androgen receptor signaling.** *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(6): p. 844-54.
74. Zhao, Y., G. Lang, S. Ito, J. Bonnet, E. Metzger, S. Sawatsubashi, E. Suzuki, X. Le Guezennec, H.G. Stunnenberg, A. Krasnov, S.G. Georgieva, R. Schule, K. Takeyama, S. Kato, L. Tora, and D. Devys, **A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing.** *Mol Cell*, 2008. **29**(1): p. 92-101.
75. Nusse, R., **Wnt signaling and stem cell control.** *Cell Res*, 2008. **18**(5): p. 523-7.
76. Logan, C.Y. and R. Nusse, **The Wnt signaling pathway in development and disease.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: p. 781-810.
77. Chesire, D.R., C.M. Ewing, W.R. Gage, and W.B. Isaacs, **In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis.** *Oncogene*, 2002. **21**(17): p. 2679-94.
78. Pawlowski, J.E., J.R. Ertel, M.P. Allen, M. Xu, C. Butler, E.M. Wilson, and M.E. Wierman, **Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells.** *J Biol Chem*, 2002. **277**(23): p. 20702-10.
79. Song, L.N., R. Herrell, S. Byers, S. Shah, E.M. Wilson, and E.P. Gelmann, **Beta-catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription.** *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(5): p. 1674-87.
80. Chesire, D.R. and W.B. Isaacs, **Ligand-dependent inhibition of beta-catenin/TCF signaling by androgen receptor.** *Oncogene*, 2002. **21**(55): p. 8453-69.
81. Masiello, D., S.Y. Chen, Y. Xu, M.C. Verhoeven, E. Choi, A.N. Hollenberg, and S.P. Balk, **Recruitment of beta-catenin by wild-type or mutant androgen receptors correlates with ligand-stimulated growth of prostate cancer cells.** *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(10): p. 2388-401.
82. Shah, S., A. Hecht, R. Pestell, and S.W. Byers, **Trans-repression of beta-catenin activity by nuclear receptors.** *J Biol Chem*, 2003. **278**(48): p. 48137-45.
83. Hanes, S.D. and R. Brent, **DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9.** *Cell*, 1989. **57**(7): p. 1275-83.
84. Gehring, W.J., Y.Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A.F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting, and K. Wuthrich, **Homeodomain-DNA recognition.** *Cell*, 1994. **78**(2): p. 211-23.

85. Furukawa, T., C.A. Kozak, and C.L. Cepko, **rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina.** Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3088-93.
86. Kitamura, K., H. Miura, M. Yanazawa, T. Miyashita, and K. Kato, **Expression patterns of Brx1 (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nkx2.2, Dlx1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation.** Mech Dev, 1997. **67**(1): p. 83-96.
87. Semina, E.V., R. Reiter, N.J. Leysens, W.L. Alward, K.W. Small, N.A. Datson, J. Siegel-Bartelt, D. Bierke-Nelson, P. Bitoun, B.U. Zabel, J.C. Carey, and J.C. Murray, **Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome.** Nat Genet, 1996. **14**(4): p. 392-9.
88. Gage, P.J. and S.A. Camper, **Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation.** Hum Mol Genet, 1997. **6**(3): p. 457-64.
89. Lamonerie, T., J.J. Tremblay, C. Lanctot, M. Therrien, Y. Gauthier, and J. Drouin, **Ptx1, a bicoid-related homeobox transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene.** Genes Dev, 1996. **10**(10): p. 1284-95.
90. DeLaurier, A., R. Schweitzer, and M. Logan, **Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb.** Dev Biol, 2006. **299**(1): p. 22-34.
91. Shang, J., X. Li, H.Z. Ring, D.A. Clayton, and U. Francke, **Backfoot, a novel homeobox gene, maps to human chromosome 5 (BFT) and mouse chromosome 13 (Bft).** Genomics, 1997. **40**(1): p. 108-13.
92. Lanctot, C., A. Moreau, M. Chamberland, M.L. Tremblay, and J. Drouin, **Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene.** Development, 1999. **126**(9): p. 1805-10.
93. Shang, J., Y. Luo, and D.A. Clayton, **Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb.** Dev Dyn, 1997. **209**(2): p. 242-53.
94. Lanctot, C., B. Lamolet, and J. Drouin, **The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm.** Development, 1997. **124**(14): p. 2807-17.
95. Chen, Y.N., H. Chen, Y. Xu, X. Zhang, and Y. Luo, **Expression of pituitary homeobox 1 gene in human gastric carcinogenesis and its clinicopathological significance.** World J Gastroenterol, 2008. **14**(2): p. 292-7.
96. Chen, Y., T. Knosel, F. Ye, M. Pacyna-Gengelbach, N. Deutschmann, and I. Petersen, **Decreased PITX1 homeobox gene expression in human lung cancer.** Lung Cancer, 2007. **55**(3): p. 287-94.
97. Kolfshoten, I.G., B. van Leeuwen, K. Berns, J. Mullenders, R.L. Beijersbergen, R. Bernards, P.M. Voorhoeve, and R. Agami, **A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity.** Cell, 2005. **121**(6): p. 849-58.
98. Smidt, M.P., H.S. van Schaick, C. Lanctot, J.J. Tremblay, J.J. Cox, A.A. van der Kleij, G. Wolterink, J. Drouin, and J.P. Burbach, **A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons.** Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(24): p. 13305-10.
99. Semina, E.V., R.S. Reiter, and J.C. Murray, **Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19.** Hum Mol Genet, 1997. **6**(12): p. 2109-16.
100. Semina, E.V., J.C. Murray, R. Reiter, R.F. Hrstka, and J. Graw, **Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice.** Hum Mol Genet, 2000. **9**(11): p. 1575-85.
101. Coulon, V., A. L'Honore, J.F. Ouimette, E. Dumontier, P. van den Munckhof, and J. Drouin, **A muscle-specific promoter directs Pitx3 gene expression in skeletal muscle cells.** J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 33192-200.

102. Semina, E.V., R.E. Ferrell, H.A. Mintz-Hittner, P. Bitoun, W.L. Alward, R.S. Reiter, C. Funkhauser, S. Daack-Hirsch, and J.C. Murray, **A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD**. *Nat Genet*, 1998. **19**(2): p. 167-70.
103. Verdin, H., E.A. Sorokina, F. Meire, I. Casteels, T. de Ravel, E.V. Semina, and E. De Baere, **Novel and recurrent PITX3 mutations in Belgian families with autosomal dominant congenital cataract and anterior segment dysgenesis have similar phenotypic and functional characteristics**. *Orphanet J Rare Dis*, 2014. **9**(1): p. 26.
104. Bidinost, C., M. Matsumoto, D. Chung, N. Salem, K. Zhang, D.W. Stockton, A. Khoury, A. Megarbane, B.A. Bejjani, and E.I. Traboulsi, **Heterozygous and homozygous mutations in PITX3 in a large Lebanese family with posterior polar cataracts and neurodevelopmental abnormalities**. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(4): p. 1274-80.
105. van den Munckhof, P., K.C. Luk, L. Ste-Marie, J. Montgomery, P.J. Blanchet, A.F. Sadikot, and J. Drouin, **Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons**. *Development*, 2003. **130**(11): p. 2535-42.
106. Luk, K.C., V.V. Rymar, P. van den Munckhof, S. Nicolau, C. Steriade, P. Bifsha, J. Drouin, and A.F. Sadikot, **The transcription factor Pitx3 is expressed selectively in midbrain dopaminergic neurons susceptible to neurodegenerative stress**. *J Neurochem*, 2013. **125**(6): p. 932-43.
107. Bergman, O., A. Hakansson, L. Westberg, K. Nordenstrom, A. Carmine Belin, O. Sydow, L. Olson, B. Holmberg, E. Eriksson, and H. Nissbrandt, **PITX3 polymorphism is associated with early onset Parkinson's disease**. *Neurobiol Aging*, 2010. **31**(1): p. 114-7.
108. Gui, Y., Y. Zhao, H. Liu, J. Fu, Z. Xu, and X. Hu, **A novel synonymous SNP in PITX3 is associated with Parkinson's disease in Chinese population**. *Swiss Med Wkly*, 2012. **142**: p. w13521.
109. Guo, Y., W.D. Le, J. Jankovic, H.R. Yang, H.B. Xu, W.J. Xie, Z. Song, and H. Deng, **Systematic genetic analysis of the PITX3 gene in patients with Parkinson disease**. *Mov Disord*, 2011. **26**(9): p. 1729-32.
110. Arakawa, H., T. Nakamura, A.B. Zhadanov, V. Fidanza, T. Yano, F. Bullrich, M. Shimizu, J. Blechman, A. Mazo, E. Canaani, and C.M. Croce, **Identification and characterization of the ARP1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(8): p. 4573-8.
111. Gage, P.J., H. Suh, and S.A. Camper, **The bicoid-related Pitx gene family in development**. *Mamm Genome*, 1999. **10**(2): p. 197-200.
112. Kitamura, K., H. Miura, S. Miyagawa-Tomita, M. Yanazawa, Y. Katoh-Fukui, R. Suzuki, H. Ohuchi, A. Suehiro, Y. Motegi, Y. Nakahara, S. Kondo, and M. Yokoyama, **Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and periocular mesoderm and right pulmonary isomerism**. *Development*, 1999. **126**(24): p. 5749-58.
113. Cox, C.J., H.M. Espinoza, B. McWilliams, K. Chappell, L. Morton, T.A. Hjalt, E.V. Semina, and B.A. Amendt, **Differential regulation of gene expression by PITX2-Isoform s**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(28): p. 25001-10.
114. Weisschuh, N., P. Dressler, F. Schuettauf, C. Wolf, B. Wissinger, and E. Gramer, **Novel mutations of FOXC1 and PITX2 in patients with Axenfeld-Rieger malformations**. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(9): p. 3846-52.
115. Tumer, Z. and D. Bach-Holm, **Axenfeld-Rieger syndrome and spectrum of PITX2 and FOXC1 mutations**. *Eur J Hum Genet*, 2009. **17**(12): p. 1527-39.
116. Chang, T.C., C.G. Summers, L.A. Schimmenti, and A.L. Grajewski, **Axenfeld-Rieger syndrome: new perspectives**. *Br J Ophthalmol*, 2012. **96**(3): p. 318-22.
117. Reis, L.M., R.C. Tyler, B.A. Volkmann Kloss, K.F. Schilter, A.V. Levin, R.B. Lowry, P.J. Zwijnenburg, E. Stroh, U. Broeckel, J.C. Murray, and E.V. Semina, **PITX2 and FOXC1 spectrum of mutations in ocular syndromes**. *Eur J Hum Genet*, 2012. **20**(12): p. 1224-33.

118. Amendt, B.A., L.B. Sutherland, E.V. Semina, and A.F. Russo, **The molecular basis of Rieger syndrome. Analysis of Pitx2 homeodomain protein activities.** J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20066-72.
119. Amendt, B.A., E.V. Semina, and W.L. Alward, **Rieger syndrome: a clinical, molecular, and biochemical analysis.** Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(11): p. 1652-66.
120. Kozlowski, K. and M.A. Walther, **Variation in residual PITX2 activity underlies the phenotypic spectrum of anterior segment developmental disorders.** Hum Mol Genet, 2000. **9**(14): p. 2131-9.
121. Doward, W., R. Perveen, I.C. Lloyd, A.E. Ridgway, L. Wilson, and G.C. Black, **A mutation in the RIEG1 gene associated with Peters' anomaly.** J Med Genet, 1999. **36**(2): p. 152-5.
122. Gudbjartsson, D.F., D.O. Arnar, A. Helgadóttir, S. Gretarsdóttir, H. Holm, A. Sigurdsson, A. Jonasdóttir, A. Baker, G. Thorleifsson, K. Kristjánsson, A. Pálsson, T. Blöndal, P. Sulem, V.M. Backman, G.A. Hardarson, E. Páldóttir, A. Helgason, R. Sigurjonsdóttir, J.T. Sverrisson, K. Kostulas, M.C. Ng, L. Baum, W.Y. So, K.S. Wong, J.C. Chan, K.L. Furie, S.M. Greenberg, M. Sale, P. Kelly, C.A. MacRae, E.E. Smith, J. Rosand, J. Hillert, R.C. Ma, P.T. Ellinor, G. Thorgeirsson, J.R. Gulcher, A. Kong, U. Thorsteinsdóttir, and K. Stefansson, **Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25.** Nature, 2007. **448**(7151): p. 353-7.
123. Campione, M., H. Steinbeisser, A. Schweickert, K. Deissler, F. van Bebber, L.A. Lowe, S. Nowotschin, C. Viebahn, P. Haffter, M.R. Kuehn, and M. Blum, **The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping.** Development, 1999. **126**(6): p. 1225-34.
124. Gage, P.J., H. Suh, and S.A. Camper, **Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs.** Development, 1999. **126**(20): p. 4643-51.
125. Lin, C.R., C. Kioussi, S. O'Connell, P. Briata, D. Szeto, F. Liu, J.C. Izpisua-Belmonte, and M.G. Rosenfeld, **Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis.** Nature, 1999. **401**(6750): p. 279-82.
126. Lu, M.F., C. Pressman, R. Dyer, R.L. Johnson, and J.F. Martin, **Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development.** Nature, 1999. **401**(6750): p. 276-8.
127. Ryan, A.K., B. Blumberg, C. Rodriguez-Esteban, S. Yonei-Tamura, K. Tamura, T. Tsukui, J. de la Pena, W. Sabbagh, J. Greenwald, S. Choe, D.P. Norris, E.J. Robertson, R.M. Evans, M.G. Rosenfeld, and J.C. Izpisua Belmonte, **Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates.** Nature, 1998. **394**(6693): p. 545-51.
128. Bamforth, S.D., J. Braganca, C.R. Farthing, J.E. Schneider, C. Broadbent, A.C. Michell, K. Clarke, S. Neubauer, D. Norris, N.A. Brown, R.H. Anderson, and S. Bhattacharya, **Cited2 controls left-right patterning and heart development through a Nodal-Pitx2c pathway.** Nat Genet, 2004. **36**(11): p. 1189-96.
129. Essner, J.J., W.W. Branford, J. Zhang, and H.J. Yost, **Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by PITX2-Isoform s.** Development, 2000. **127**(5): p. 1081-93.
130. Liu, C., W. Liu, M.F. Lu, N.A. Brown, and J.F. Martin, **Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity.** Development, 2001. **128**(11): p. 2039-48.
131. Schweickert, A., M. Campione, H. Steinbeisser, and M. Blum, **PITX2-Isoform s: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry.** Mech Dev, 2000. **90**(1): p. 41-51.
132. Kirchhof, P., P.C. Kahr, S. Kaese, I. Piccini, I. Vokshi, H.H. Scheld, H. Roterig, L. Fortmueller, S. Laakmann, S. Verheule, U. Schotten, L. Fabritz, and N.A. Brown, **PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression.** Circ Cardiovasc Genet, 2011. **4**(2): p. 123-33.

133. Liu, C., W. Liu, J. Palie, M.F. Lu, N.A. Brown, and J.F. Martin, **Pitx2c patterns anterior myocardium and aortic arch vessels and is required for local cell movement into atrioventricular cushions.** *Development*, 2002. **129**(21): p. 5081-91.
134. Kioussi, C., P. Briata, S.H. Baek, D.W. Rose, N.S. Hamblet, T. Herman, K.A. Ohgi, C. Lin, A. Gleiberman, J. Wang, V. Brault, P. Ruiz-Lozano, H.D. Nguyen, R. Kemler, C.K. Glass, A. Wynshaw-Boris, and M.G. Rosenfeld, **Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development.** *Cell*, 2002. **111**(5): p. 673-85.
135. Martinez-Fernandez, S., F. Hernandez-Torres, D. Franco, G.E. Lyons, F. Navarro, and A.E. Aranega, **Pitx2c overexpression promotes cell proliferation and arrests differentiation in myoblasts.** *Dev Dyn*, 2006. **235**(11): p. 2930-9.
136. Li, X., S. Florez, J. Wang, H. Cao, and B.A. Amendt, **Dact2 represses PITX2 transcriptional activation and cell proliferation through Wnt/beta-catenin signaling during odontogenesis.** *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54868.
137. Ai, D., J. Wang, M. Amen, M.F. Lu, B.A. Amendt, and J.F. Martin, **Nuclear factor 1 and T-cell factor/LEF recognition elements regulate Pitx2 transcription in pituitary development.** *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(16): p. 5765-75.
138. Baek, S.H., C. Kioussi, P. Briata, D. Wang, H.D. Nguyen, K.A. Ohgi, C.K. Glass, A. Wynshaw-Boris, D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld, **Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(6): p. 3245-50.
139. Huang, Y., C.J. Guigon, J. Fan, S.Y. Cheng, and G.Z. Zhu, **Pituitary homeobox 2 (PITX2) promotes thyroid carcinogenesis by activation of cyclin D2.** *Cell Cycle*, 2010. **9**(7): p. 1333-41.
140. L'Honore, A., J.F. Ouimette, M. Lavertu-Jolin, and J. Drouin, **Pitx2 defines alternate pathways acting through MyoD during limb and somitic myogenesis.** *Development*, 2010. **137**(22): p. 3847-56.
141. Huang, Y., K. Huang, G. Boskovic, Y. Dementieva, J. Denvir, D.A. Primerano, and G.Z. Zhu, **Proteomic and genomic analysis of PITX2 interacting and regulating networks.** *FEBS Lett*, 2009. **583**(4): p. 638-42.
142. Gage, P.J., M. Qian, D. Wu, and K.I. Rosenberg, **The canonical Wnt signaling antagonist DKK2 is an essential effector of PITX2 function during normal eye development.** *Dev Biol*, 2008. **317**(1): p. 310-24.
143. Briata, P., C. Ilengo, G. Corte, C. Moroni, M.G. Rosenfeld, C.Y. Chen, and R. Gherzi, **The Wnt/beta-catenin-->Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs.** *Mol Cell*, 2003. **12**(5): p. 1201-11.
144. Wei, Q. and R.S. Adelstein, **Pitx2a expression alters actin-myosin cytoskeleton and migration of HeLa cells through Rho GTPase signaling.** *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(2): p. 683-97.
145. Fung, F.K., D.W. Chan, V.W. Liu, T.H. Leung, A.N. Cheung, and H.Y. Ngan, **Increased expression of PITX2 transcription factor contributes to ovarian cancer progression.** *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37076.
146. Hirose, H., H. Ishii, K. Mimori, F. Tanaka, I. Takemasa, T. Mizushima, M. Ikeda, H. Yamamoto, M. Sekimoto, Y. Doki, and M. Mori, **The significance of PITX2 overexpression in human colorectal cancer.** *Ann Surg Oncol*, 2011. **18**(10): p. 3005-12.
147. Zhang, J.X., Z.T. Tong, L. Yang, F. Wang, H.P. Chai, F. Zhang, M.R. Xie, A.L. Zhang, L.M. Wu, H. Hong, L. Yin, H. Wang, H.Y. Wang, and Y. Zhao, **PITX2: a promising predictive biomarker of patients' prognosis and chemoradioresistance in esophageal squamous cell carcinoma.** *Int J Cancer*, 2013. **132**(11): p. 2567-77.
148. Meeh, P.F., C.L. Farrell, R. Croshaw, H. Crimm, S.K. Miller, D. Oroian, S. Kowli, J. Zhu, W. Carver, W. Wu, E. Pena, and P.J. Buckhaults, **A gene expression classifier of node-positive colorectal cancer.** *Neoplasia*, 2009. **11**(10): p. 1074-83.

149. Lee, W.K., P.K. Chakraborty, and F. Thevenod, **Pituitary homeobox 2 (PITX2) protects renal cancer cell lines against doxorubicin toxicity by transcriptional activation of the multidrug transporter ABCB1.** *Int J Cancer*, 2013. **133**(3): p. 556-67.
150. Acunzo, J., C. Roche, C. Defilles, S. Thirion, M.H. Quentien, D. Figarella-Branger, T. Graillon, H. Dufour, T. Brue, I. Pellegrini, A. Enjalbert, and A. Barlier, **Inactivation of PITX2 transcription factor induced apoptosis of gonadotroph tumoral cells.** *Endocrinology*, 2011. **152**(10): p. 3884-92.
151. Maier, S., I. Nimmrich, T. Koenig, S. Eppenberger-Castori, I. Bohlmann, A. Paradiso, F. Spyrtos, C. Thomssen, V. Mueller, J. Nahrig, F. Schittulli, R. Kates, R. Lesche, I. Schwöpe, A. Kluth, A. Marx, J.W. Martens, J.A. Foekens, M. Schmitt, N. Harbeck, R. European Organisation for, and g. Treatment of Cancer PathoBiology, **DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients--Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group.** *Eur J Cancer*, 2007. **43**(11): p. 1679-86.
152. Nimmrich, I., A.M. Sieuwerts, M.E. Meijer-van Gelder, I. Schwöpe, J. Bolt-de Vries, N. Harbeck, T. Koenig, O. Hartmann, A. Kluth, D. Dietrich, V. Magdolen, H. Portengen, M.P. Look, J.G. Klijn, R. Lesche, M. Schmitt, S. Maier, J.A. Foekens, and J.W. Martens, **DNA hypermethylation of PITX2 is a marker of poor prognosis in untreated lymph node-negative hormone receptor-positive breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **111**(3): p. 429-37.
153. Vinarskaja, A., W.A. Schulz, M. Ingenwerth, C. Hader, and C. Arsov, **Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter hypermethylation and poor prognosis.** *Urol Oncol*, 2013. **31**(5): p. 622-7.
154. Vela, I., C. Morrissey, X. Zhang, S. Chen, E. Corey, G.M. Strutton, C.C. Nelson, D.L. Nicol, J.A. Clements, and E.M. Gardiner, **PITX2 and non-canonical Wnt pathway interaction in metastatic prostate cancer.** *Clin Exp Metastasis*, 2014. **31**(2): p. 199-211.
155. Rinnab, L., S.V. Schutz, J. Diesch, E. Schmid, R. Kufer, R.E. Hautmann, K.D. Spindler, and M.V. Cronauer, **Inhibition of glycogen synthase kinase-3 in androgen-responsive prostate cancer cell lines: are GSK inhibitors therapeutically useful?** *Neoplasia*, 2008. **10**(6): p. 624-34.
156. Florl, A.R., C. Steinhoff, M. Müller, H.H. Seifert, C. Hader, R. Engers, R. Ackermann, and W.A. Schulz, **Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation.** *Br J Cancer*, 2004. **91**(5): p. 985-94.
157. Nordeen, S.K., **Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers.** *Biotechniques*, 1988. **6**(5): p. 454-8.
158. Emadi Baygi, M., Z.S. Soheili, I. Schmitz, S. Sameie, and W.A. Schulz, **Snail regulates cell survival and inhibits cellular senescence in human metastatic prostate cancer cell lines.** *Cell Biol Toxicol*, 2010. **26**(6): p. 553-67.
159. Ramachandran, K., G. Gopisetty, E. Gordian, L. Navarro, C. Hader, I.M. Reis, W.A. Schulz, and R. Singal, **Methylation-mediated repression of GADD45alpha in prostate cancer and its role as a potential therapeutic target.** *Cancer Res*, 2009. **69**(4): p. 1527-35.
160. Hanashiro, I. and P.J. Roach, **Mutations of muscle glycogen synthase that disable activation by glucose 6-phosphate.** *Arch Biochem Biophys*, 2002. **397**(2): p. 286-92.
161. Al-Khouri, A.M., Y. Ma, S.H. Togo, S. Williams, and T. Mustelin, **Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta.** *J Biol Chem*, 2005. **280**(42): p. 35195-202.
162. Gao, Y. and H.Y. Wang, **Casein kinase 2 is activated and essential for Wnt/beta-catenin signaling.** *J Biol Chem*, 2006. **281**(27): p. 18394-400.

163. Seldin, D.C., E. Landesman-Bollag, M. Farago, N. Currier, D. Lou, and I. Dominguez, **CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumourigenesis**. *Mol Cell Biochem*, 2005. **274**(1-2): p. 63-7.
164. Wu, D. and W. Pan, **GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling**. *Trends Biochem Sci*, 2010. **35**(3): p. 161-8.
165. Morin, P.J., A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, **Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC**. *Science*, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
166. Chakraborty, P.K., W.K. Lee, M. Molitor, N.A. Wolff, and F. Thevenod, **Cadmium induces Wnt signaling to upregulate proliferation and survival genes in sub-confluent kidney proximal tubule cells**. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 102.
167. Yamada, T., A.S. Takaoka, Y. Naishiro, R. Hayashi, K. Maruyama, C. Maesawa, A. Ochiai, and S. Hirohashi, **Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis**. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4761-6.
168. McDonald, S., L. Brive, D.B. Agus, H.I. Scher, and K.R. Ely, **Ligand responsiveness in human prostate cancer: structural analysis of mutant androgen receptors from LNCaP and CWR22 tumors**. *Cancer Res*, 2000. **60**(9): p. 2317-22.
169. Knudsen, K.E., K.C. Arden, and W.K. Cavenee, **Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells**. *J Biol Chem*, 1998. **273**(32): p. 20213-22.
170. Xu, Y., S.Y. Chen, K.N. Ross, and S.P. Balk, **Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins**. *Cancer Res*, 2006. **66**(15): p. 7783-92.
171. Halvorsen, O.J., S.A. Haukaas, and L.A. Akslen, **Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer**. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(4): p. 1474-9.
172. Gao, H., X. Ouyang, W. Banach-Petrosky, A.D. Borowsky, Y. Lin, M. Kim, H. Lee, W.J. Shih, R.D. Cardiff, M.M. Shen, and C. Abate-Shen, **A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(49): p. 17204-9.
173. Ye, D., J. Mendelsohn, and Z. Fan, **Androgen and epidermal growth factor down-regulate cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and costimulate proliferation of MDA PCa 2a and MDA PCa2b prostate cancer cells**. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(8): p. 2171-7.
174. Kolar, Z., P.G. Murray, K. Scott, A. Harrison, B. Vojtesek, and J. Dusek, **Relation of Bcl-2 expression to androgen receptor, p21WAF1/CIP1, and cyclin D1 status in prostate cancer**. *Mol Pathol*, 2000. **53**(1): p. 15-8.
175. Lu, S., M. Liu, D.E. Epner, S.Y. Tsai, and M.J. Tsai, **Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter**. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(3): p. 376-84.
176. Padar, A., U.G. Sathyanarayana, M. Suzuki, R. Maruyama, J.T. Hsieh, E.P. Frenkel, J.D. Minna, and A.F. Gazdar, **Inactivation of cyclin D2 gene in prostate cancers by aberrant promoter methylation**. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(13): p. 4730-4.
177. Massague, J. and Y.G. Chen, **Controlling TGF-beta signaling**. *Genes Dev*, 2000. **14**(6): p. 627-44.
178. Massague, J. and D. Wotton, **Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system**. *EMBO J*, 2000. **19**(8): p. 1745-54.
179. Pardali, E., M.J. Goumans, and P. ten Dijke, **Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease**. *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(9): p. 556-67.
180. Kim, S.I., J.H. Kwak, M. Zachariah, Y. He, L. Wang, and M.E. Choi, **TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-**

- p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen.** *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(5): p. F1471-8.
181. Alarcon, C., A.I. Zaromytidou, Q. Xi, S. Gao, J. Yu, S. Fujisawa, A. Barlas, A.N. Miller, K. Manova-Todorova, M.J. Macias, G. Sapkota, D. Pan, and J. Massague, **Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways.** *Cell*, 2009. **139**(4): p. 757-69.
182. Gao, S., C. Alarcon, G. Sapkota, S. Rahman, P.Y. Chen, N. Goerner, M.J. Macias, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and J. Massague, **Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling.** *Mol Cell*, 2009. **36**(3): p. 457-68.
183. Ebisawa, T., M. Fukuchi, G. Murakami, T. Chiba, K. Tanaka, T. Imamura, and K. Miyazono, **Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation.** *J Biol Chem*, 2001. **276**(16): p. 12477-80.
184. Kavsak, P., R.K. Rasmussen, C.G. Causing, S. Bonni, H. Zhu, G.H. Thomsen, and J.L. Wrana, **Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation.** *Mol Cell*, 2000. **6**(6): p. 1365-75.
185. Al-Salihi, M.A., L. Herhaus, T. Macartney, and G.P. Sapkota, **USP11 augments TGFbeta signalling by deubiquitylating ALK5.** *Open Biol*, 2012. **2**(6): p. 120063.
186. Eichhorn, P.J., L. Rodon, A. Gonzalez-Junca, A. Dirac, M. Gili, E. Martinez-Saez, C. Aura, I. Barba, V. Peg, A. Prat, I. Cuartas, J. Jimenez, D. Garcia-Dorado, J. Sahuquillo, R. Bernards, J. Baselga, and J. Seoane, **USP15 stabilizes TGF-beta receptor I and promotes oncogenesis through the activation of TGF-beta signaling in glioblastoma.** *Nat Med*, 2012. **18**(3): p. 429-35.
187. Zhang, L., F. Zhou, Y. Drabsch, R. Gao, B.E. Snaar-Jagalska, C. Mickanin, H. Huang, K.A. Sheppard, J.A. Porter, C.X. Lu, and P. ten Dijke, **USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF-beta type I receptor.** *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(7): p. 717-26.
188. Inui, M., A. Manfrin, A. Mamidi, G. Martello, L. Morsut, S. Soligo, E. Enzo, S. Moro, S. Polo, S. Dupont, M. Cordenonsi, and S. Piccolo, **USP15 is a deubiquitylating enzyme for receptor-activated SMADs.** *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(11): p. 1368-75.
189. Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, **Smad transcription factors.** *Genes Dev*, 2005. **19**(23): p. 2783-810.
190. Gomis, R.R., C. Alarcon, C. Nadal, C. Van Poznak, and J. Massague, **C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells.** *Cancer Cell*, 2006. **10**(3): p. 203-14.
191. Seoane, J., C. Pouponnot, P. Staller, M. Schader, M. Eilers, and J. Massague, **TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b.** *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(4): p. 400-8.
192. Rodriguez-Esteban, C., J. Capdevila, Y. Kawakami, and J.C. Izpisua Belmonte, **Wnt signaling and PKA control Nodal expression and left-right determination in the chick embryo.** *Development*, 2001. **128**(16): p. 3189-95.
193. Hoppler, S. and R.T. Moon, **BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the Xenopus mesoderm.** *Mech Dev*, 1998. **71**(1-2): p. 119-29.
194. Jin, E.J., S.Y. Lee, Y.A. Choi, J.C. Jung, O.S. Bang, and S.S. Kang, **BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a pathway.** *Mol Cells*, 2006. **22**(3): p. 353-9.
195. Kim, J.S., H. Crooks, T. Dracheva, T.G. Nishanian, B. Singh, J. Jen, and T. Waldman, **Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells.** *Cancer Res*, 2002. **62**(10): p. 2744-8.
196. Luo, Q., Q. Kang, W. Si, W. Jiang, J.K. Park, Y. Peng, X. Li, H.H. Luu, J. Luo, A.G. Montag, R.C. Haydon, and T.C. He, **Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells.** *J Biol Chem*, 2004. **279**(53): p. 55958-68.

197. Strizzi, L., C. Bianco, N. Normanno, and D. Salomon, **Cripto-1: a multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis**. *Oncogene*, 2005. **24**(37): p. 5731-41.
198. Labbe, E., A. Letamendia, and L. Attisano, **Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(15): p. 8358-63.
199. Laurent, M.N. and K.W. Cho, **Bone morphogenetic protein antagonism of Spemann's organizer is independent of Wnt signaling**. *Dev Biol*, 1999. **206**(2): p. 157-62.
200. Willert, J., M. Epping, J.R. Pollack, P.O. Brown, and R. Nusse, **A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells**. *BMC Dev Biol*, 2002. **2**: p. 8.
201. Green, P.D., T.A. Hjalt, D.E. Kirk, L.B. Sutherland, B.L. Thomas, P.T. Sharpe, M.L. Snead, J.C. Murray, A.F. Russo, and B.A. Amendt, **Antagonistic regulation of Dlx2 expression by PITX2 and Msx2: implications for tooth development**. *Gene Expr*, 2001. **9**(6): p. 265-81.
202. Lei, S., A. Dubeykovskiy, A. Chakladar, L. Wojtukiewicz, and T.C. Wang, **The murine gastrin promoter is synergistically activated by transforming growth factor-beta/Smad and Wnt signaling pathways**. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 42492-502.
203. Jian, H., X. Shen, I. Liu, M. Semenov, X. He, and X.F. Wang, **Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells**. *Genes Dev*, 2006. **20**(6): p. 666-74.
204. Furuhashi, M., K. Yagi, H. Yamamoto, Y. Furukawa, S. Shimada, Y. Nakamura, A. Kikuchi, K. Miyazono, and M. Kato, **Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway**. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(15): p. 5132-41.
205. Guo, X., A. Ramirez, D.S. Waddell, Z. Li, X. Liu, and X.F. Wang, **Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling**. *Genes Dev*, 2008. **22**(1): p. 106-20.
206. Han, G., A.G. Li, Y.Y. Liang, P. Owens, W. He, S. Lu, Y. Yoshimatsu, D. Wang, P. Ten Dijke, X. Lin, and X.J. Wang, **Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development**. *Dev Cell*, 2006. **11**(3): p. 301-12.
207. Tang, Y., Z. Liu, L. Zhao, T.L. Clemens, and X. Cao, **Smad7 stabilizes beta-catenin binding to E-cadherin complex and promotes cell-cell adhesion**. *J Biol Chem*, 2008. **283**(35): p. 23956-63.
208. Liu, W., H. Rui, J. Wang, S. Lin, Y. He, M. Chen, Q. Li, Z. Ye, S. Zhang, S.C. Chan, Y.G. Chen, J. Han, and S.C. Lin, **Axin is a scaffold protein in TGF-beta signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia**. *EMBO J*, 2006. **25**(8): p. 1646-58.
209. Edlund, S., S.Y. Lee, S. Grimsby, S. Zhang, P. Aspenstrom, C.H. Heldin, and M. Landstrom, **Interaction between Smad7 and beta-catenin: importance for transforming growth factor beta-induced apoptosis**. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(4): p. 1475-88.
210. Lu, S., J. Lee, M. Revelo, X. Wang, S. Lu, and Z. Dong, **Smad3 is overexpressed in advanced human prostate cancer and necessary for progressive growth of prostate cancer cells in nude mice**. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(19): p. 5692-702.
211. Song, K., H. Wang, T.L. Krebs, B. Wang, T.J. Kelley, and D. Danielpour, **DHT selectively reverses Smad3-mediated/TGF-beta-induced responses through transcriptional down-regulation of Smad3 in prostate epithelial cells**. *Mol Endocrinol*, 2010. **24**(10): p. 2019-29.
212. Huang, S., Q. Liao, L. Li, and D. Xin, **PTTG1 inhibits SMAD3 in prostate cancer cells to promote their proliferation**. *Tumour Biol*, 2014.
213. Spanjol, J., G. Djordjevic, D. Markic, M. Klaric, D. Fuckar, and D. Bobinac, **Role of bone morphogenetic proteins in human prostate cancer pathogenesis and development of bone metastases: immunohistochemical study**. *Coll Antropol*, 2010. **34 Suppl 2**: p. 119-25.

214. Lai, T.H., Y.C. Fong, W.M. Fu, R.S. Yang, and C.H. Tang, **Osteoblasts-derived BMP-2 enhances the motility of prostate cancer cells via activation of integrins**. *Prostate*, 2008. **68**(12): p. 1341-53.
215. Suszko, M.I., M. Antenos, D.M. Balkin, and T.K. Woodruff, **Smad3 and Pitx2 cooperate in stimulation of FSHbeta gene transcription**. *Mol Cell Endocrinol*, 2008. **281**(1-2): p. 27-36.
216. Lamba, P., V. Khivansara, A.C. D'Alessio, M.M. Santos, and D.J. Bernard, **Paired-like homeodomain transcription factors 1 and 2 regulate follicle-stimulating hormone beta-subunit transcription through a conserved cis-element**. *Endocrinology*, 2008. **149**(6): p. 3095-108.
217. Nickeleit, I., S. Zender, U. Kossatz, and N.P. Malek, **p27kip1: a target for tumor therapies?** *Cell Div*, 2007. **2**: p. 13.
218. Johnsen, S.A., C. Gungor, T. Prenzel, S. Riethdorf, L. Riethdorf, N. Taniguchi-Ishigaki, T. Rau, B. Tursun, J.D. Furlow, G. Sauter, M. Scheffner, K. Pantel, F. Gannon, and I. Bach, **Regulation of estrogen-dependent transcription by the LIM cofactors CLIM and RLIM in breast cancer**. *Cancer Res*, 2009. **69**(1): p. 128-36.
219. Bach, I., C. Carriere, H.P. Ostendorff, B. Andersen, and M.G. Rosenfeld, **A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins**. *Genes Dev*, 1997. **11**(11): p. 1370-80.
220. Liu, Z., Y. Zhan, Y. Tu, K. Chen, Z. Liu, and C. Wu, **PDZ and LIM domain protein 1(PDLIM1)/CLP36 promotes breast cancer cell migration, invasion and metastasis through interaction with alpha-actinin**. *Oncogene*, 2014. **0**.
221. Hong, S.H., **Identification of CLP36 as a tumor antigen that induces an antibody response in pancreatic cancer**. *Cancer Res Treat*, 2005. **37**(1): p. 71-7.
222. Zhao, H., S. Jin, M.J. Antinore, F.D. Lung, F. Fan, P. Blanck, P. Roller, A.J. Fornace, Jr., and Q. Zhan, **The central region of Gadd45 is required for its interaction with p21/WAF1**. *Exp Cell Res*, 2000. **258**(1): p. 92-100.
223. el-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, **WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression**. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 817-25.
224. Kastan, M.B., Q. Zhan, W.S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W.V. Walsh, B.S. Plunkett, B. Vogelstein, and A.J. Fornace, Jr., **A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia**. *Cell*, 1992. **71**(4): p. 587-97.
225. Zhan, Q., W. Eldeiry, I. Bae, I. Alamo, M. Kastan, B. Vogelstein, and A. Fornace, **Similarity of the DNA-damage responsiveness and growth-suppressive properties of waf1/cip1 and gadd45**. *Int J Oncol*, 1995. **6**(5): p. 937-46.
226. Masui, S., Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A.A. Sharov, M.S. Ko, and H. Niwa, **Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells**. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(6): p. 625-35.
227. Park, I.H., R. Zhao, J.A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T.A. Ince, P.H. Lerou, M.W. Lensch, and G.Q. Daley, **Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors**. *Nature*, 2008. **451**(7175): p. 141-6.
228. Chen, Y., L. Shi, L. Zhang, R. Li, J. Liang, W. Yu, L. Sun, X. Yang, Y. Wang, Y. Zhang, and Y. Shang, **The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer**. *J Biol Chem*, 2008. **283**(26): p. 17969-78.
229. Jia, X., X. Li, Y. Xu, S. Zhang, W. Mou, Y. Liu, Y. Liu, D. Lv, C.H. Liu, X. Tan, R. Xiang, and N. Li, **SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell**. *J Mol Cell Biol*, 2011. **3**(4): p. 230-8.
230. Saigusa, S., K. Tanaka, Y. Toiyama, T. Yokoe, Y. Okugawa, Y. Ioue, C. Miki, and M. Kusunoki, **Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy**. *Ann Surg Oncol*, 2009. **16**(12): p. 3488-98.

231. Chen, S., Y. Xu, Y. Chen, X. Li, W. Mou, L. Wang, Y. Liu, R.A. Reisfeld, R. Xiang, D. Lv, and N. Li, **SOX2 gene regulates the transcriptional network of oncogenes and affects tumorigenesis of human lung cancer cells**. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36326.
232. Li, X., Y. Xu, Y. Chen, S. Chen, X. Jia, T. Sun, Y. Liu, X. Li, R. Xiang, and N. Li, **SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/beta-catenin signal network**. Cancer Lett, 2013. **336**(2): p. 379-89.
233. Sun, X.J., L.M. Wang, Y. Zhang, L. Yenush, M.G. Myers, Jr., E. Glasheen, W.S. Lane, J.H. Pierce, and M.F. White, **Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling**. Nature, 1995. **377**(6545): p. 173-7.
234. Lee, Y.H. and M.F. White, **Insulin receptor substrate proteins and diabetes**. Arch Pharm Res, 2004. **27**(4): p. 361-70.
235. Reuveni, H., E. Flashner-Abramson, L. Steiner, K. Makedonski, R. Song, A. Shir, M. Herlyn, M. Bar-Eli, and A. Levitzki, **Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment**. Cancer Res, 2013. **73**(14): p. 4383-94.
236. Dearth, R.K., X. Cui, H.J. Kim, D.L. Hadsell, and A.V. Lee, **Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2**. Cell Cycle, 2007. **6**(6): p. 705-13.
237. Day, E., G. Pouligiannis, F. McCaughan, S. Mulholland, M.J. Arends, A.E. Ibrahim, and P.H. Dear, **IRS2 is a candidate driver oncogene on 13q34 in colorectal cancer**. Int J Exp Pathol, 2013. **94**(3): p. 203-11.
238. Boissan, M., E. Beurel, D. Wendum, C. Rey, Y. Lecluse, C. Housset, M.L. Lacombe, and C. Desbois-Mouthon, **Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma**. Am J Pathol, 2005. **167**(3): p. 869-77.
239. Chan, B.T. and A.V. Lee, **Insulin receptor substrates (IRSs) and breast tumorigenesis**. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008. **13**(4): p. 415-22.
240. Porter, H.A., A. Perry, C. Kingsley, N.L. Tran, and A.D. Keegan, **IRS1 is highly expressed in localized breast tumors and regulates the sensitivity of breast cancer cells to chemotherapy, while IRS2 is highly expressed in invasive breast tumors**. Cancer Lett, 2013. **338**(2): p. 239-48.
241. Sreedharan, S., M.S. Almen, V.P. Carlini, T. Haitina, O. Stephansson, W.H. Sommer, M. Heilig, S.R. de Barioglio, R. Fredriksson, and H.B. Schioth, **The G protein coupled receptor Gpr153 shares common evolutionary origin with Gpr162 and is highly expressed in central regions including the thalamus, cerebellum and the arcuate nucleus**. FEBS J, 2011. **278**(24): p. 4881-94.
242. Stipp, C.S., E.D. Litwack, and A.D. Lander, **Cerebroglycan: an integral membrane heparan sulfate proteoglycan that is unique to the developing nervous system and expressed specifically during neuronal differentiation**. J Cell Biol, 1994. **124**(1-2): p. 149-60.
243. Burgaya, F., X. Fontana, A. Martinez, M. Montolio, A. Mingorance, S. Simo, J.A. del Rio, and E. Soriano, **Semaphorin 6C leads to GSK-3-dependent growth cone collapse and redistributes after entorhino-hippocampal axotomy**. Mol Cell Neurosci, 2006. **33**(3): p. 321-34.
244. Xu, X., R.F. Liu, B.B. Wan, W.M. Xing, J. Huang, and Z.G. Han, **Expression of a novel gene FAM43B repressing cell proliferation is regulated by DNA methylation in hepatocellular carcinoma cell lines**. Mol Cell Biochem, 2011. **354**(1-2): p. 11-20.
245. Dietrich, D., O. Hasinger, V. Liebenberg, J.K. Field, G. Kristiansen, and A. Soltermann, **DNA methylation of the homeobox genes PITX2 and SHOX2 predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients**. Diagn Mol Pathol, 2012. **21**(2): p. 93-104.
246. Korinek, V., N. Barker, P.J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and H. Clevers, **Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma**. Science, 1997. **275**(5307): p. 1784-7.
247. van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A.P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den

- Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema, and H. Clevers, **The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells**. *Cell*, 2002. **111**(2): p. 241-50.
248. Chesire, D.R., C.M. Ewing, J. Sauvageot, G.S. Bova, and W.B. Isaacs, **Detection and analysis of beta-catenin mutations in prostate cancer**. *Prostate*, 2000. **45**(4): p. 323-34.
249. Voeller, H.J., C.I. Truica, and E.P. Gelmann, **Beta-catenin mutations in human prostate cancer**. *Cancer Res*, 1998. **58**(12): p. 2520-3.
250. de la Taille, A., M.A. Rubin, M.W. Chen, F. Vacherot, S.G. de Medina, M. Burchardt, R. Buttyan, and D. Chopin, **Beta-catenin-related anomalies in apoptosis-resistant and hormone-refractory prostate cancer cells**. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(5): p. 1801-7.
251. Deocampo, N.D., H. Huang, and D.J. Tindall, **The role of PTEN in the progression and survival of prostate cancer**. *Minerva Endocrinol*, 2003. **28**(2): p. 145-53.
252. Liu, C., Y. Li, M. Semenov, C. Han, G.H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, and X. He, **Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism**. *Cell*, 2002. **108**(6): p. 837-47.
253. Persad, S., A.A. Troussard, T.R. McPhee, D.J. Mulholland, and S. Dedhar, **Tumor suppressor PTEN inhibits nuclear accumulation of beta-catenin and T cell/lymphoid enhancer factor 1-mediated transcriptional activation**. *J Cell Biol*, 2001. **153**(6): p. 1161-74.
254. Sharma, M., W.W. Chuang, and Z. Sun, **Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3beta inhibition and nuclear beta-catenin accumulation**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(34): p. 30935-41.
255. Hussein, S.M., E.K. Duff, and C. Sirard, **Smad4 and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of Msx2**. *J Biol Chem*, 2003. **278**(49): p. 48805-14.
256. Billin, A.N., H. Thirlwell, and D.E. Ayer, **Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator**. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(18): p. 6882-90.
257. Mulholland, D.J., H. Cheng, K. Reid, P.S. Rennie, and C.C. Nelson, **The androgen receptor can promote beta-catenin nuclear translocation independently of adenomatous polyposis coli**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(20): p. 17933-43.
258. Basu, M. and S.S. Roy, **Wnt/beta-catenin pathway is regulated by PITX2 homeodomain protein and thus contributes to the proliferation of human ovarian adenocarcinoma cell, SKOV-3**. *J Biol Chem*, 2013. **288**(6): p. 4355-67.
259. Karasawa, T., H. Yokokura, J. Kitajewski, and P.J. Lombroso, **Frizzled-9 is activated by Wnt-2 and functions in Wnt/beta-catenin signaling**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 37479-86.
260. Wang, H.X., F.R. Tekpetey, and G.M. Kidder, **Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells**. *Mol Hum Reprod*, 2009. **15**(1): p. 11-7.
261. Zeng, X., H. Huang, K. Tamai, X. Zhang, Y. Harada, C. Yokota, K. Almeida, J. Wang, B. Doble, J. Woodgett, A. Wynshaw-Boris, J.C. Hsieh, and X. He, **Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions**. *Development*, 2008. **135**(2): p. 367-75.
262. Lustig, B., B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P.M. Schlag, W. Birchmeier, and J. Behrens, **Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors**. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(4): p. 1184-93.
263. Dehm, S.M., L.J. Schmidt, H.V. Heemers, R.L. Vessella, and D.J. Tindall, **Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance**. *Cancer Res*, 2008. **68**(13): p. 5469-77.
264. Hu, R., T.A. Dunn, S. Wei, S. Isharwal, R.W. Veltri, E. Humphreys, M. Han, A.W. Partin, R.L. Vessella, W.B. Isaacs, G.S. Bova, and J. Luo, **Ligand-independent androgen receptor**

- variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 2009. **69**(1): p. 16-22.
265. Schayek, H., I. Bentov, J. Jacob-Hirsch, C. Yeung, C. Khanna, L.J. Helman, S.R. Plymate, and H. Werner, **Global methylation analysis identifies PITX2 as an upstream regulator of the androgen receptor and IGF-I receptor genes in prostate cancer**. *Horm Metab Res*, 2012. **44**(7): p. 511-9.
266. Hayes, S.A., M. Zarnegar, M. Sharma, F. Yang, D.M. Peehl, P. ten Dijke, and Z. Sun, **SMAD3 represses androgen receptor-mediated transcription**. *Cancer Res*, 2001. **61**(5): p. 2112-8.
267. Kang, H.Y., K.E. Huang, S.Y. Chang, W.L. Ma, W.J. Lin, and C. Chang, **Differential modulation of androgen receptor-mediated transactivation by Smad3 and tumor suppressor Smad4**. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 43749-56.
268. List, H.J., C.L. Smith, O. Rodriguez, M. Danielsen, and A.T. Riegel, **Inhibition of histone deacetylation augments dihydrotestosterone induction of androgen receptor levels: an explanation for trichostatin A effects on androgen-induced chromatin remodeling and transcription of the mouse mammary tumor virus promoter**. *Exp Cell Res*, 1999. **252**(2): p. 471-8.
269. Schwartz, C., K. Beck, S. Mink, M. Schmolke, B. Budde, D. Wenning, and K.H. Klempnauer, **Recruitment of p300 by C/EBPbeta triggers phosphorylation of p300 and modulates coactivator activity**. *EMBO J*, 2003. **22**(4): p. 882-92.
270. Yuan, L.W., J.W. Soh, and I.B. Weinstein, **Inhibition of histone acetyltransferase function of p300 by PKCdelta**. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1592**(2): p. 205-11.
271. Shiota, M., A. Yokomizo, D. Masubuchi, Y. Tada, J. Inokuchi, M. Eto, T. Uchiumi, N. Fujimoto, and S. Naito, **Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus**. *Prostate*, 2010. **70**(5): p. 540-54.
272. Levy, L., Y. Wei, C. Labalette, Y. Wu, C.A. Renard, M.A. Buendia, and C. Neuveut, **Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-Tcf4 interaction**. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(8): p. 3404-14.
273. Akiyoshi, S., H. Inoue, J. Hanai, K. Kusanagi, N. Nemoto, K. Miyazono, and M. Kawabata, **c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads**. *J Biol Chem*, 1999. **274**(49): p. 35269-77.
274. Nomura, T., M.M. Khan, S.C. Kaul, H.D. Dong, R. Wadhwa, C. Colmenares, I. Kohno, and S. Ishii, **Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor**. *Genes Dev*, 1999. **13**(4): p. 412-23.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von Androgen-Rezeptor Gen und Protein	5
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von PITX2 Gen und PITX2 Isoformen	13
Abbildung 1.3: Arbeitshypothese	17
Abbildung 3.1: Vergleich der Expression der verschiedenen PITX2 Transkripte	44
Abbildung 3.2: Vergleich des PITX2 mRNA Expressionsprofils in Prostatageweben	45
Abbildung 3.3: Expressionsstatus von PITX2 und AR in Zelllinien und Geweben	46
Abbildung 3.4: Ergebnisse der Methylierungsanalysen (Pyrosequenzierungsassays)	47
Abbildung 3.5: Expression von p21, PITX2 und AR nach Behandlung mit Aza und SAHA	49
Abbildung 3.6: Expressionsstatus von PITX1 in Zelllinien und Geweben	50
Abbildung 3.7: Klonogenitätsassay in der Zelllinie 22Rv1	51
Abbildung 3.8: Klonogenitätsassay in der Zelllinie LNCaP	51
Abbildung 3.9: Klonogenitätsassay in der Zelllinie PC3	52
Abbildung 3.10: Expression von PITX2 in den stabilen PC3 PITX2a Klonen	53
Abbildung 3.11: PITX2a mRNA- und Protein-Reexpression in Klonen der Zelllinien 22Rv1 und PC3	54
Abbildung 3.12: (A) Wachstumskurve der stabil transfizierten 22Rv1 PITX2a Klone und der stabil transfizierten PC3 PITX2a Klone	55
Abbildung 3.13: FACS-Analysen der Zellzyklusverteilung der 22Rv1 PITX2a Klone B1 und B21 nach Tetracyclin-Behandlung für 48 h	56
Abbildung 3.14: FACS-Analysen der Zellzyklusverteilung der 22Rv1 PITX2a Klone B1 und B21 nach Tetracyclin-Behandlung für 96 h	56
Abbildung 3.15: FACS-Analysen der Zellzyklusverteilung der PC3 PITX2a Klone A5 und A14 nach Tetracyclin-Behandlung für 48 h	57
Abbildung 3.16: SA- β -Galaktosidase Assay in der Zelllinie 22Rv1	58
Abbildung 3.17: SA- β -Galaktosidase Assay in der Zelllinie PC3	59
Abbildung 3.18: Immuncytochemische Fluoreszenzfärbung der 22Rv1 PITX2a Klone	61
Abbildung 3.19: Immuncytochemische Fluoreszenzfärbung der PC3 PITX2a Klone	62
Abbildung 3.20: Immuncytochemischer Nachweis von PITX2 in der Zelllinie 22Rv1	65
Abbildung 3.21: Immuncytochemischer Nachweis von PITX2 in der Zelllinie PC3	66
Abbildung 3.22: Auswertung der Microarray-Analyse der stabilen 22Rv1 PITX2a Zellklone B1 und B21	68
Abbildung 3.23: Auswertung der Microarray-Analyse der stabilen PC3 PITX2a Zellklone A5 und A14	69
Abbildung 3.24: Auswertung der Microarray-Analyse des Vergleichs zwischen den stabilen 22Rv1 PITX2a Zellklonen und den stabilen PC3 PITX2a Zellklonen	69
Abbildung 3.25: Verifizierung der Zielgene des Microarrays mittels qRT-PCR	83
Abbildung 3.26: Analyse ausgewählter Gene aus der Microarray-Analyse mittels qRT-PCR in Zelllinien	86
Abbildung 3.27: Protein-Expression von p21 und p27 in den PC3 Zellklonen	86
Abbildung 3.28: Protein-Expression von p21 und p27 in den 22Rv1 Zellklonen	87
Abbildung 3.29: Luciferase Reporter-Assay mit vier verschiedenen androgenabhängigen Konstrukten und PITX2a in der androgensensitiven 22Rv1 Zelllinie im Vergleich	88
Abbildung 3.30: Luciferase Reporter-Assay mit vier verschiedenen androgenabhängigen Konstrukten und PITX2c in der androgensensitiven 22Rv1 Zelllinie im Vergleich	89
Abbildung 3.31: Luciferase Reporter-Assay mit vier verschiedenen androgenabhängigen Konstrukten und PITX2a in der androgenunabhängigen PC3 Zelllinie im Vergleich	89
Abbildung 3.32: Luciferase Reporter-Assay mit vier verschiedenen androgenabhängigen Konstrukten und PITX2c in der androgenunabhängigen PC3 Zelllinie im Vergleich	90

Abbildung 3.33: Luciferase Assay mit dem androgenabhängigen Reporterkonstrukt ARE, PITX2 und konstitutiv aktiven β -Catenin.....	90
Abbildung 3.34: Luciferase Reporter-Assays mit den androgenunabhängigen Kontrollplasmiden pT109luc und LacZ.....	91
Abbildung 3.35: Western Blot der Kombinationstransfektion von PITX2a und dem AR	92
Abbildung 3.36: mRNA-Expression des AR, PITX2 und CTNNB1 nach Kombinationstransfektion .	93
Abbildung 3.37: Western Blot der AR Zeitkurve nach Ko-Transfektion mit PITX2a	93
Abbildung 3.38: mRNA-Expression des AR nach Ko-Transfektion mit PITX2a	94
Abbildung 3.39: Two Hybrid Luciferase-Assay mit AR und PITX2a.....	94
Abbildung 3.40: Immuncytochemische Fluoreszenzfärbung der AR-Lokalisation in der Zelllinie PC3	96
Abbildung 3.41: Immuncytochemische Fluoreszenzfärbung der AR-Lokalisation in der Zelllinie 22Rv1.....	97
Abbildung 3.42: Luciferase Reporter-Assay mit WNT-abhängigen Konstrukten in der Zelllinie PC3	98
Abbildung 3.43: Luciferase Reporter-Assay mit WNT-abhängigen Konstrukten in der Zelllinie 22Rv1.....	99
Abbildung 3.44: PITX2c Aminosäure-Sequenz.....	100
Abbildung 3.45: Western Blot der transienten Transfektion von PITX2a und PITX2c in den Zelllinien PC3 und 22Rv1.....	100
Abbildung 3.46: Western Blot der GSK3- und CK2-Inhibitor Behandlung.....	101
Abbildung 4.1: Regulationsnetzwerk des AR.....	128
Abbildung 9.1: Auszug der PITX2 Transkripte aus der ensembl Datenbank	152
Abbildung 9.2: PITX2a Sequenz.	153
Abbildung 9.3: PITX2c Sequenz	153
Abbildung 9.4: Selbst erstelltes Expressionskonstrukt pcDNA 4/TO PITX2a.....	154
Abbildung 9.5: Selbst erstelltes Expressionskonstrukt pcDNA 4/TO PITX2c.....	154
Abbildung 9.6: Selbst erstelltes Reporterkonstrukt pACT PITX2a	155
Abbildung 9.7: Selbst erstelltes Reporterkonstrukt pBind PITX2a	155

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Klinische Parameter von Prostatakarzinom Gewebeproben	18
Tabelle 2.2: Chemikalien, Reagenzien und Kits	20
Tabelle 2.3: Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse	23
Tabelle 2.4: Lösungen für Immuncytochemie	24
Tabelle 2.5: Puffer und Lösungen für SA- β -Galaktosidase Assay	24
Tabelle 2.6: Lösung für Zellzyklus-Analysen	25
Tabelle 2.7: Primäre und sekundäre Antikörper	25
Tabelle 2.8: Primer für Endpunkt und qRT-PCR.....	26
Tabelle 2.9: PITX2 Assays für Pyrosequenzierung	27
Tabelle 2.10: Plasmide	28
Tabelle 2.11: Geräte.....	29
Tabelle 3.1: Korrelation zwischen PITX2 und Genen aus dem Gewebedatensatz aus Taylor et al.	74
Tabelle 3.2: Antikorrelation zwischen PITX2 und Genen aus dem Gewebedatensatz aus Taylor et al.....	76
Tabelle 3.3: Auswertung des GO Terms 0016055: <i>WNT signaling</i> in Abhängigkeit der differentiell exprimierten Gene der Microarrays.....	77
Tabelle 3.4: Auswertung der GO Terms 0030521: <i>Androgen receptor signaling</i> und 0050681: <i>Androgen receptor binding</i> in Abhängigkeit der differentiell exprimierten Gene der Microarrays. ...	79
Tabelle 3.5: Auswahl der zu verifizierenden Gene	81
Tabelle 9.1: Signifikanzwerte der Aza- und SAHA-Behandlungen der mRNA-Expression von p21 ^{CIP1} und des AR.	156
Tabelle 9.2: Signifikanzwerte der Aza- und SAHA-Behandlungen der mRNA-Expression von PITX2 Ex 56 und PITX2 Ex 12.	157
Tabelle 9.3: Signifikanzwerte der mRNA-Expression von AR, BMP2, IRS2 und p15.....	158
Tabelle 9.4: Signifikanzwerte der mRNA-Expression von p27, PDLIM1, SMAD3 und SOX2.....	159
Tabelle 9.5: Signifikanzwerte der mRNA-Expression von KRT6A, GADD45A, CTNNB1 und p21. ..	160
Tabelle 9.6: Signifikanzwerte der Reporter-Kontrollen	161
Tabelle 9.7: Signifikanzwerte der androgenabhängigen Reporterkonstrukte in der Zelllinie PC3	161
Tabelle 9.8: Signifikanzwerte der androgenabhängigen Reporterkonstrukte in der Zelllinie 22Rv1	162
Tabelle 9.9: Signifikanzwerte der androgenabhängigen Reporterkonstrukte in der Zelllinie 22Rv1	163
Tabelle 9.10: Signifikanzwerte der stabilen induzierbaren PITX2a Klone	163
Tabelle 9.11: Signifikanzwerte der AR / PITX2a Kombinationstransfektion.....	164
Tabelle 9.12: Signifikanzwerte der TOPflash /FOPflash Reporterkonstrukte.....	164
Tabelle 9.13: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, der Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie 22Rv1 herunterreguliert sind	165
Tabelle 9.14: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktion, der Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie 22Rv1 herunterreguliert sind	165
Tabelle 9.15: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, der Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie 22Rv1 hochreguliert sind	165
Tabelle 9.16: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, der Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie PC3 herunterreguliert sind..	166
Tabelle 9.17: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, der Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie PC3 herunterreguliert sind..	167

Tabelle 9.18: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, der Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie PC3 hochreguliert sind.....	167
Tabelle 9.19: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, der Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie PC3 hochreguliert sind.....	169
Tabelle 9.20: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, der Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie 22Rv1 herunterreguliert sind.	169
Tabelle 9.21: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, der Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie 22Rv1 herunterreguliert sind.	171
Tabelle 9.22: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, der Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie 22Rv1 hochreguliert sind	172
Tabelle 9.23: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, der Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie 22Rv1 hochreguliert sind	176
Tabelle 9.24: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, der Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie PC3 herunterreguliert sind.....	177
Tabelle 9.25: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, der Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie PC3 herunterreguliert sind.....	179
Tabelle 9.26: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, der Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie PC3 hochreguliert sind	179
Tabelle 9.27: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, der Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie PC3 hochreguliert sind	184

8 Abkürzungsverzeichnis

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Gene, wurde das offizielle Gen-Symbol verwendet.

APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgen-Rezeptor
ARE	Androgen-responsive Elemente
AS	Aminosäuren (<i>amino acids</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BPH	benigne Prostata-Hyperplasie
BSA	Albumin aus Rinderserum (<i>bovine serum albumin</i>)
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRPC	Kastrations-resistentes Prostatakarzinom
kDa	kilo Dalton
DBD	DNA-bindende Domäne
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	2'Desoxy-nucleotid 5'Triphosphat (<i>deoxynucleotide triphosphates</i>)
DUB	Deubiquitinasen
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ER	Estrogen-Rezeptor
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	Glukokortikoid-responsible Elemente
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylasen
HRE	Hormon-responsive Elemente
KDM	Lysin-Demethylase
KMT	Lysin-Methyltransferase
LBD	Liganden-bindende Domäne
MR	Mineralkortikoid-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NR	nukleäre Rezeptoren
NTD	N-terminale Domäne
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAU	<i>transcriptional activation units</i>
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TNM	<u>T</u> umor, <u>N</u> ode, <u>M</u> etastasis
TR	Tet-Repressor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>

9 Anhang

9.1 PITX2 Transkript-Varianten

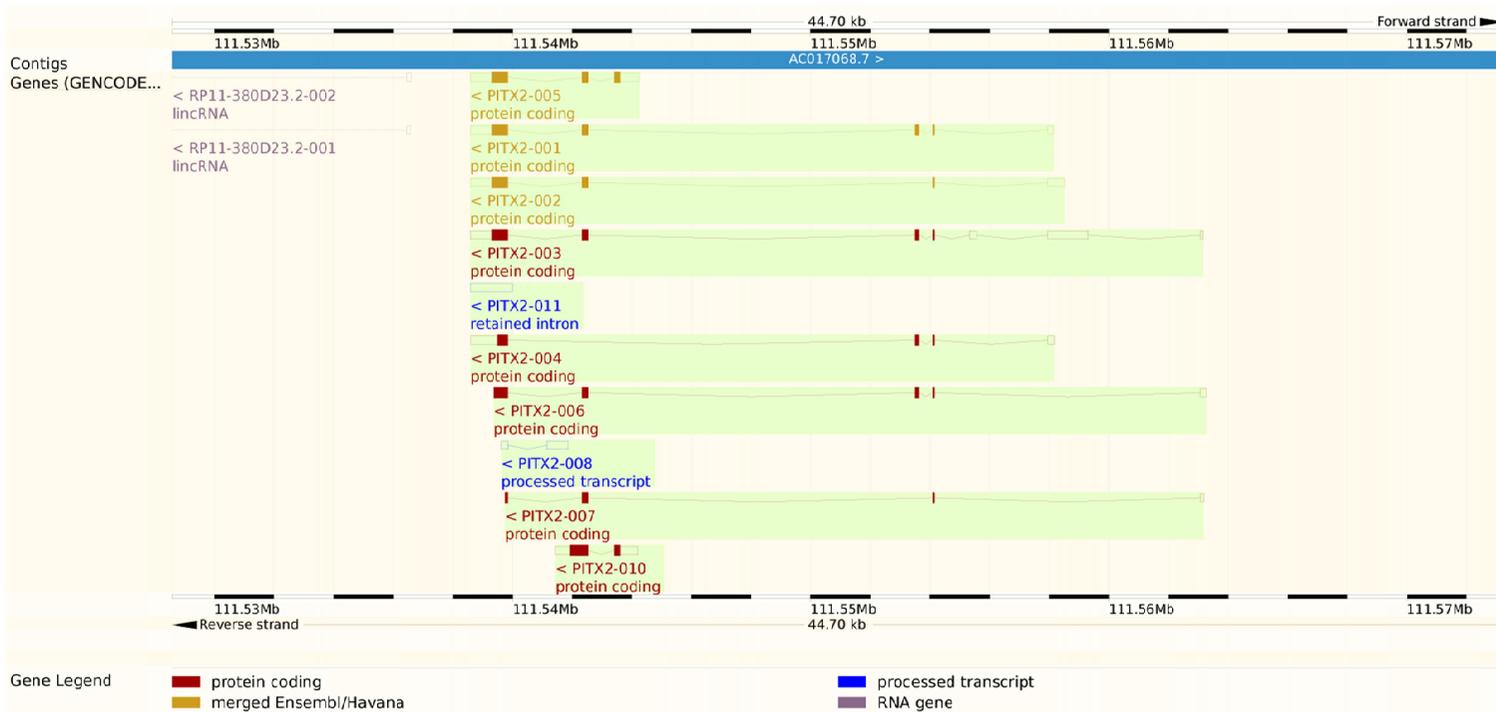


Abbildung 9.1: Auszug der PITX2 Transkripte aus der ensembl Datenbank (Abschnitt 2.1.10). **Pitx2-001:** PITX2 Isoform B. **Pitx2-002:** PITX2 Isoform A. **Pitx2-005:** PITX2 Isoform C.

9.2 Sequenzen der PITX2 mRNAs und Proteine

ATGGAGACCAACTGCCGCAAACCTGGTGTCCGGCTGTGTGCAATTAGAGAAAGATAAAAGCCAGCAGGGGAAGAA
 TGAGGACGTGGGCGCCGAGGACCCGTCTAAGAAGAAGCGGCAAAGGCGGCAGCGGACTCACTTTACCAGCCAGC
 AGCTCCAGGAGCTGGAGGCCACTTTCCAGAGGAACCGCTACCCGGACATGTCCACACGCGAAGAAATCGCTGTGT
 GGACCAACCTACGGAAGCCCGAGTCCGGGTTTGGTTCAAGAATCGTCGGGCCAAATGGAGAAAAGAGGGAGCGC
 AACCAGCAGGCCGAGCTATGCAAGAATGGCTTCGGGCCGAGTTCAATGGGCTCATGCAGCCCTACGACGACATG
 TACCCAGGCTATTCTACAACAACCTGGGCCGCCAAGGGCCTTACATCCGCCTCCCTATCCACCAAGAGCTTCCCCTT
 CTTCAACTCTATGAACGTCAACCCCTGTATCACAGAGCATGTTTTCCCCACCAACTCTATCTCGTCCATGAGCAT
 GTCGTCCAGCATGGTGCCCTCAGCAGTGACAGGCGTCCCGGGCTCCAGTCTCAACAGCCTGAATAACTTGAACAAC
 CTGAGTAGCCCGTCGCTGAATTCGCGGTGCCGACGCTGCCTGTCTTACGCGCCCGGACTCCTCCGTATGTTA
 TAGGGACACGTGTAACCTGAGCCTGGCCAGCCTGAGACTGAAAGCAAAGCAGCACTCCAGCTTCGGCTACGCCAG
 CGTGCAGAACCCGGCCTCAACCTGAGTGCTTGCCAGTATGCAGTGGACCGGCCCGTGTGA

METNCRKLVSA CVQL EKDKSQQGNEDVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQELEATFQRNRYPDMSTREEIAVWVT
 NLTEARVR VWFKNRRAKWRKRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKLTASLSTKSFPPFNS
 MNVNP LSSQSMFSPNSISSMSMSSSMVPSAVTGVP GSSLNSLNNLNLSSPSLNSAVPTPACPYAPPTPPYVYRDTC
 NSSLASLRLKAKQHSSFGYASVQNPASNLSACQYAVDRPV

Abbildung 9.2: PITX2a mRNA- (oben) und Protein- (unten) Sequenz. **Grau:** Exon 2. **Blau:** Exon 5. **Rot:** Exon 6. Die PITX2a Sequenz enthält insgesamt 816 Nukleotide, was 272 Aminosäuren entspricht.

ATGAACTGCATGAAAGGCCCGCTTCACTTGGAGCACCGAGCAGCGGGACCAAGCTGTCGGCCGTCTCCTCAT
 CTTCTGTACCATCCCCAGCCGTTAGCCATGGCTTCGGTTCTGGCTCCCGGTCAGCCCCGGTCGCTGGACTCCT
 CCAAGCACAGGCTGGAGGTGCACACCATCTCCGACACCTCCAGCCCGGAGGCCGAGAGAAAGATAAAAGCC
 AGCAGGGGAAGAATGAGGACGTGGGCGCCGAGGACCCGTCTAAGAAGAAGCGGCAAAGGCGGCAGCGGAC
 TCACTTTACCAGCCAGCAGCTCCAGGAGCTGGAGGCCACTTTCCAGAGGAACCGCTACCCGGACATGTCCACA
 CGCGAAGAAATCGCTGTGTGGACCAACCTACGGAAGCCCGAGTCCGGGTTTGGTTCAAGAATCGTCGGGCC
 AAATGGAGAAAAGAGGGAGCGCAACCAGCAGGCCGAGCTATGCAAGAATGGCTTCGGGCCGAGTTCAATGG
 GCTCATGCAGCCCTACGACGACATGTACCCAGGCTATTCTACAACAACCTGGGCCGCCAAGGGCCTTACATCC
 GCCTCCCTATCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTCAACTCTATGAACGTCAACCCCTGTATCACAGAGCATGTTTT
 CCCCACCAACTCTATCTCGTCCATGAGCATGTCGTCCAGCATGGTGCCCTCAGCAGTGACAGGCGTCCCGGGC
 TCCAGTCTCAACAGCCTGAATAACTTGAACAACCTGAGTAGCCCGTCGCTGAATTCGCGGTGCCGACGCTGC
 CTGTCCTTACGCGCCCGGACTCCTCCGTATGTTATAGGGACACGTGTAACCTGAGCCTGGCCAGCCTGAGAC
 TGAAAGCAAAGCAGCACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAACCCGGCCTCAACCTGAGTGCTTGCCA
 GTATGCAGTGGACCGGCCCGTGTGA

MNCMKGPLHLEHRAAGTKLSAVSSSSCHHPQPLAMASV LAPGQPRSLDSSKHRLEVHTISDTSSPEAA EKDKSQQ
 GNEDVGAEDPSKKKRQRQRTHFTSQQLQELEATFQRNRYPDMSTREEIAVWVTNLTEARVR VWFKNRRAKWR
 KRERNQQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMYPGYSYNNWAAKGLTASLSTKSFPPFNSMNVNP LSSQSMFSP
 NSISSMSMSSSMVPSAVTGVP GSSLNSLNNLNLSSPSLNSAVPTPACPYAPPTPPYVYRDTCNSSLASLRLKAKQH
 SSFGYASVQNPASNLSACQYAVDRPV

Abbildung 9.3: PITX2c mRNA- (oben) und Protein- (unten) Sequenz. **Gelb:** Exon 4. **Blau:** Exon 5. **Rot:** Exon 6. Die PITX2c Sequenz enthält insgesamt 975 Nukleotide, was ohne das Stopcodon 324 Aminosäuren entspricht.

9.3 Erstellte Plasmid-Vektoren

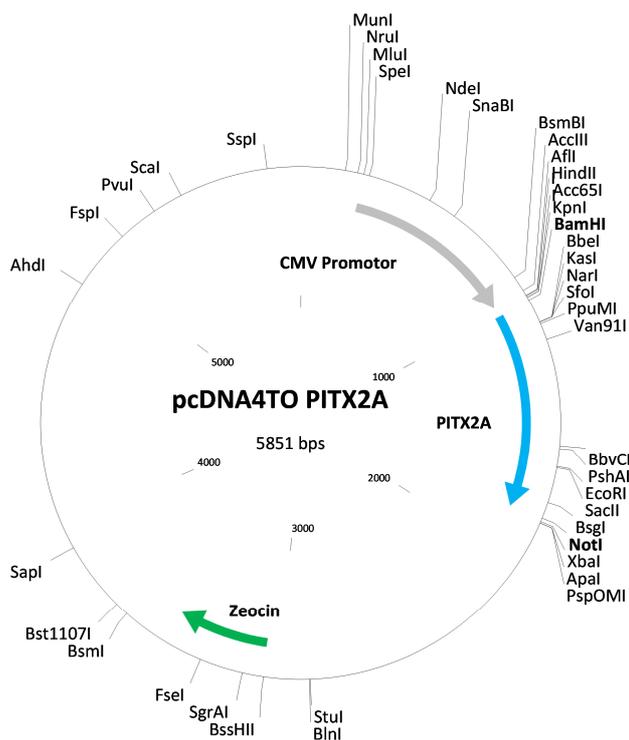


Abbildung 9.4: Selbst erstelltes Expressionskonstrukt pcDNA 4/TO PITX2a. **Grau:** CMV Promotor. **Grün:** Selektionsresistenz. **Blau:** Kloniertes PITX2a Konstrukt. Verwendete Schnittstellen: **BamHI** und **NotI**.

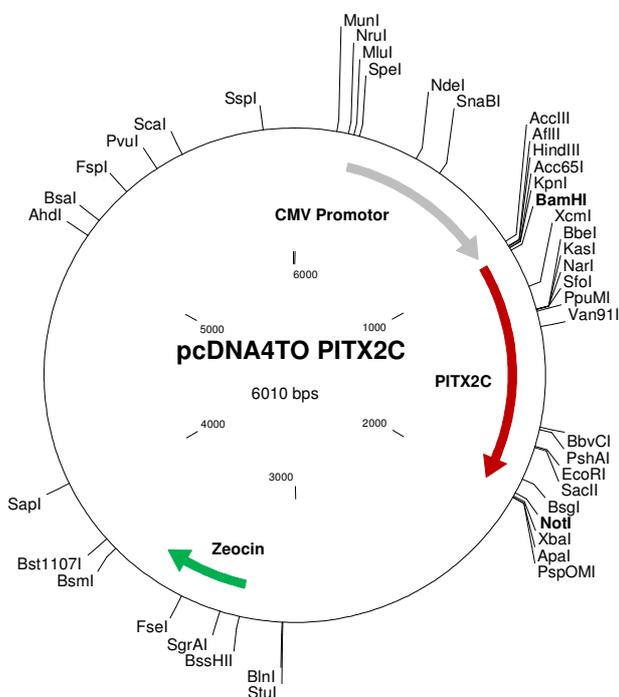


Abbildung 9.5: Selbst erstelltes Expressionskonstrukt pcDNA 4/TO PITX2c. **Grau:** CMV Promotor. **Grün:** Selektionsresistenz. **Rot:** Kloniertes PITX2c Konstrukt. Verwendete Schnittstellen: **BamHI** und **NotI**.

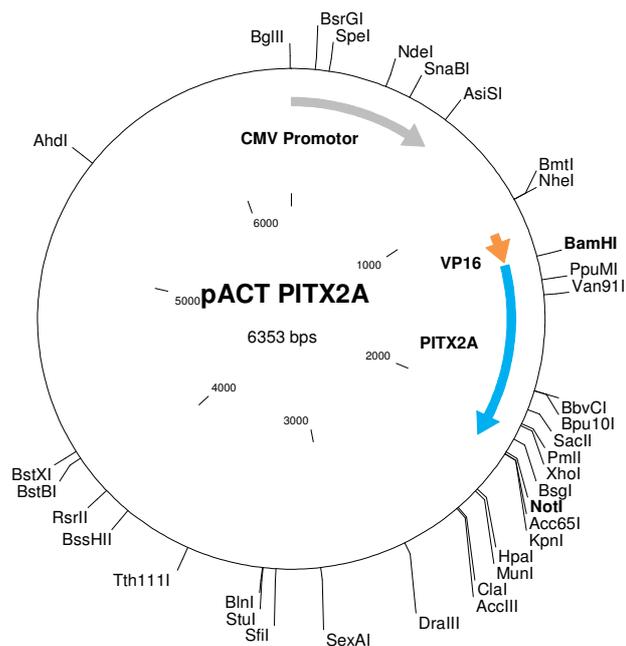


Abbildung 9.6: Selbst erstelltes Reporterkonstrukt pACT PITX2a. **Grau:** CMV Promotor. **Orange:** Fusionsprotein VP16. **Blau:** Kloniertes PITX2a Konstrukt. Verwendete Schnittstellen: **BamHI** und **NotI**.

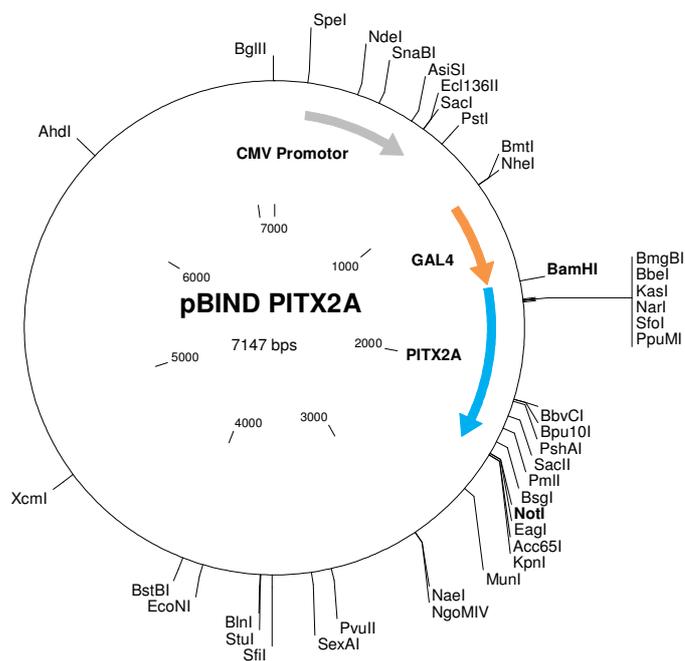


Abbildung 9.7: Selbst erstelltes Reporterkonstrukt pBind PITX2a. **Grau:** CMV Promotor. **Orange:** Fusionsprotein GAL4. **Blau:** Kloniertes PITX2a Konstrukt. Verwendete Schnittstellen: **BamHI** und **NotI**.

9.4 Übersicht der Signifikanzwerte

P21	22Rv1 ub	22Rv1 Aza	22Rv1 Saha	22Rv1 Kombi	LNcaP ub	LNcaP Aza	LNcaP Saha	LNcaP Kombi	PC3 ub	PC3 Aza	PC3 Saha	PC3 Kombi
22Rv1 ub		0,0026	0,0010	0,0001								
22Rv1 Aza	0,0026		0,0010									
22Rv1 Saha	0,0010	0,0010		0,0004								
22Rv1 Kombi	0,0001		0,0004									
LNcaP ub						0,0002	0,0122	0,0052				
LNcaP Aza					0,0002		0,0101					
LNcaP Saha					0,0122	0,0101		0,0230				
LNcaP Kombi					0,0052		0,0230					
PC3 ub										0,0000	0,0001	0,0020
PC3 Aza									0,0000		0,0001	
PC3 Saha									0,0001	0,0001		0,0041
PC3 Kombi									0,0020		0,0041	
AR	22Rv1 ub	22Rv1 Aza	22Rv1 Saha	22Rv1 Kombi	LNcaP ub	LNcaP Aza	LNcaP Saha	LNcaP Kombi	PC3 ub	PC3 Aza	PC3 Saha	PC3 Kombi
22Rv1 ub			0,0158	0,0008								
22Rv1 Aza			0,0239									
22Rv1 Saha	0,0158	0,0239		0,0000								
22Rv1 Kombi	0,0008		0,0000									
LNcaP ub												
LNcaP Aza							0,0126					
LNcaP Saha						0,0126		0,0260				
LNcaP Kombi							0,0260					
PC3 ub										0,0114	0,0006	0,0100
PC3 Aza									0,0114		0,0001	0,0028
PC3 Saha									0,0006	0,0001		
PC3 Kombi									0,0100	0,0028		

Tabelle 9.1: Signifikanzwerte der Aza- und SAHA-Behandlungen, einzeln und in Kombination, in den Zelllinien 22Rv1, LNcaP und PC3. Gemessen wurde die mRNA-Expression von p21^{CIP1} und des AR.

PITX2 Ex56	22Rv1 ub	22Rv1 Aza	22Rv1 Saha	22Rv1 Kombi	LNcaP ub	LNcaP Aza	LNcaP Saha	LNcaP Kombi	PC3 ub	PC3 Aza	PC3 Saha	PC3 Kombi
22Rv1 ub		0,0175										
22Rv1 Aza	0,0175		0,0064	0,0057								
22Rv1 Saha		0,0064										
22Rv1 Kombi		0,0057										
LNcaP ub							0,0030	0,0004				
LNcaP Aza							0,0066	0,00066753				
LNcaP Saha					0,0030	0,0066		0,0182				
LNcaP Kombi					0,0004	0,0007	0,0182					
PC3 ub										0,0082	0,0023	0,0018
PC3 Aza									0,0082		0,0024	
PC3 Saha									0,0023	0,0024		0,0004
PC3 Kombi									0,0018		0,0004	
PITX2 Ex12	22Rv1 ub	22Rv1 Aza	22Rv1 Saha	22Rv1 Kombi	LNcaP ub	LNcaP Aza	LNcaP Saha	LNcaP Kombi	PC3 ub	PC3 Aza	PC3 Saha	PC3 Kombi
22Rv1 ub												
22Rv1 Aza												
22Rv1 Saha												
22Rv1 Kombi												
LNcaP ub												
LNcaP Aza												
LNcaP Saha												
LNcaP Kombi												
PC3 ub												0,0258
PC3 Aza												
PC3 Saha												0,0251
PC3 Kombi									0,0258		0,0251	

Tabelle 9.2: Signifikanzwerte der Aza- und SAHA-Behandlungen, einzeln und in Kombination, in den Zelllinien 22Rv1, LNcaP und PC3. Gemessen wurde die mRNA-Expression von PITX2 Ex 56 und PITX2 Ex 12.

Tabelle 9.3: Signifikanzwerte der mRNA-Expression von AR, BMP2, IRS2 und p15. Gemessen wurden die Gene in den PITX2a Zellklonen der Zelllinien PC3 und 22Rv1 sowie der Mutterzelllinie.

AR	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58		0,0073	0,0017	0,0144	0,0061					
A5 -	0,0073		0,0000							
A5 +	0,0017	0,0000								
A14 -	0,0144									
A14 +	0,0061									
A11									0,0269	
B21 -										
B21 +										
B1 -						0,0269				
B1 +										
BMP2	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58			0,0006		0,0073					
A5 -			0,0006							
A5 +	0,0006	0,0006								
A14 -					0,0068					
A14 +	0,0073			0,0068						
A11									0,0065	0,0021
B21 -										
B21 +										
B1 -						0,0065				0,0006
B1 +						0,0021			0,0006	
IRS2	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58			0,0123		0,0034					
A5 -			0,0128							
A5 +	0,0123	0,0128								
A14 -					0,0002					
A14 +	0,0034			0,0002						
A11								0,0018	0,0047	0,0004
B21 -										
B21 +						0,0018				
B1 -						0,0047				0,0462
B1 +						0,0004			0,0462	
P15	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58		0,0095	0,0000	0,0397	0,0000					
A5 -	0,0095		0,0000							
A5 +	0,0000	0,0000		0,0000						
A14 -	0,0397									
A14 +	0,0000			0,0000						
A11								0,0001	0,0137	0,0009
B21 -								0,0003		
B21 +						0,0001	0,0003			
B1 -						0,0137				0,0029
B1 +						0,0009			0,0029	

Tabelle 9.4: Signifikanzwerte der mRNA-Expression von p27, PDLIM1, SMAD3 und SOX2. Gemessen wurden die Gene in den PITX2a Zellklonen der Zelllinien PC3 und 22Rv1 sowie der Mutterzelllinie.

P27	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58					0,0086					
A5 -										
A5 +										
A14 -					0,0098					
A14 +	0,0086			0,0098						
A11							0,0022			
B21 -						0,0022				
B21 +										
B1 -										
B1 +										
PDLIM1	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58										
A5 -										
A5 +										
A14 -										
A14 +										
A11							0,0263	0,0000	0,0152	0,0044
B21 -						0,0263		0,0000		
B21 +						0,0000	0,0000			
B1 -						0,0152				0,0028
B1 +						0,0044			0,0028	
SMAD3	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58			0,0224		0,0197					
A5 -			0,0010							
A5 +	0,0224	0,0010								
A14 -					0,0001					
A14 +	0,0197			0,0001						
A11								0,0002		0,005
B21 -								0,0012		
B21 +						0,0002	0,0012			
B1 -										0,0022
B1 +						0,005			0,0022	
SOX2	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58		0,0084	0,0001	0,0025	0,0003					
A5 -	0,0084		0,0000							
A5 +	0,0001	0,0000								
A14 -	0,0025				0,0001					
A14 +	0,0003			0,0001						
A11							0,0462	0,0382	0,0000	0,0002
B21 -						0,0462				
B21 +						0,0382				
B1 -						0,0000				0,0027
B1 +						0,0002			0,0027	

Tabelle 9.5: Signifikanzwerte der mRNA-Expression von KRT6A, GADD45A, CTNNB1 und p21. Gemessen wurden die Gene in den PITX2a Zellklonen der Zelllinien PC3 und 22Rv1 sowie der Mutterzelllinie.

KRT6A	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58		0,0068	0,0020	0,0002	0,0000					
A5 -	0,0068									
A5 +	0,0020	0,0023								
A14 -	0,0002				0,0000					
A14 +	0,0000			0,0000						
A11										
B21 -										
B21 +										
B1 -										
B1 +										
GADD45A	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58			0,0143		0,0072					
A5 -			0,0166							
A5 +	0,0143	0,0166								
A14 -					0,0012					
A14 +	0,0072			0,0012						
A11							0,0177	0,0005		0,0105
B21 -						0,0177		0,0010		
B21 +						0,0005	0,0010			
B1 -										0,0119
B1 +						0,0105			0,0119	
CTNNB1	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58										
A5 -										
A5 +										
A14 -										
A14 +										
A11							0,0010		0,0009	
B21 -						0,0010				
B21 +										
B1 -						0,0009				
B1 +										
p21	A58	A5 -	A5 +	A14 -	A14 +	A11	B21 -	B21 +	B1 -	B1 +
A58										
A5 -										
A5 +										
A14 -										
A14 +										
A11							0,0032	0,0113		
B21 -						0,0032				
B21 +						0,0113				
B1 -										
B1 +										

Tabelle 9.6: Signifikanzwerte der Reporter-Kontrollen

	PBluc -	PBluc + LacZ	pT109luc -	pT109luc + PITX2a	PBluc + AR + LacZ	pT109luc + AR	pT109luc + AR + PITX2a
PBluc -					0,0006		
PBluc + LacZ					0,0006		
pT109luc -				0,0001			0,0000
pT109luc + PITX2a			0,0001				0,0053
PBluc + AR + LacZ	0,0006	0,0006					
pT109luc + AR							0,0002
pT109luc + AR + PITX2a			0,0000	0,0053		0,0002	

Tabelle 9.7: Signifikanzwerte der androgenabhängigen Reporterkonstrukte in der Zelllinie PC3

PC3 PITX2a	PBluc -	PBluc + AR	PBluc + PITX2a	PBluc + AR / PITX2a		MMTVluc -	MMTVluc + AR	MMTVluc + PITX2a	MMTVluc + AR / PITX2a
PBluc -		0,0104	0,0029	0,0007	MMTVluc -		0,0001	0,0154	0,0040
PBluc + AR	0,0104			0,0040	MMTVluc + AR	0,0001			0,0003
PBluc + PITX2a	0,0029				MMTVluc + PITX2a	0,0154			0,0250
PBluc + AR / PITX2a	0,0007	0,0040			MMTVluc + AR / PITX2a	0,0040	0,0003	0,0250	
	PSA61luc -	PSA61luc + AR	PSA61luc + PITX2a	PSA61luc + AR / PITX2a		AREluc -	AREluc + AR	AREluc + PITX2a	AREluc + AR / PITX2a
PSA61luc -		0,0000	0,0293	0,0089	AREluc -		0,0001	0,0064	0,0115
PSA61luc + AR	0,0000			0,0114	AREluc + AR	0,0001			0,0001
PSA61luc + PITX2a	0,0293				AREluc + PITX2a	0,0064			
PSA61luc + AR / PITX2a	0,0089	0,0114			AREluc + AR / PITX2a	0,0115	0,0001		
PC3 PITX2c	PBluc -	PBluc + AR	PBluc + PITX2a	PBluc + AR / PITX2a		MMTVluc -	MMTVluc + AR	MMTVluc + PITX2a	MMTVluc + AR / PITX2a
PBluc -		0,0001	0,0002	0,0008	MMTVluc -		0,0001	0,0018	0,0058
PBluc + AR	0,0001			0,0001	MMTVluc + AR	0,0001			0,0001
PBluc + PITX2a	0,0002			0,0048	MMTVluc + PITX2a	0,0018			0,0009
PBluc + AR / PITX2a	0,0008	0,0001	0,0048		MMTVluc + AR / PITX2a	0,0058	0,0001	0,0009	
	PSA61luc -	PSA61luc + AR	PSA61luc + PITX2a	PSA61luc + AR / PITX2a		AREluc -	AREluc + AR	AREluc + PITX2a	AREluc + AR / PITX2a
PSA61luc -		0,0002	0,0001	0,0020	AREluc -		0,0000	0,0006	
PSA61luc + AR	0,0002			0,0001	AREluc + AR	0,0000			0,0000
PSA61luc + PITX2a	0,0001			0,0059	AREluc + PITX2a	0,0006			0,0001
PSA61luc + AR / PITX2a	0,0020	0,0001	0,0059		AREluc + AR / PITX2a		0,0000	0,0001	

Tabelle 9.8: Signifikanzwerte der androgenabhängigen Reporterkonstrukte in der Zelllinie 22Rv1

22Rv1 PITX2a	PBluc - R1881	PBluc + PITX2a R1881	- PBluc + R1881	PBluc + PITX2a + R1881
PBluc - R1881		0,0003	0,0000	
PBluc + PITX2a - R1881	0,0003			
PBluc + R1881	0,0000			0,0000
PBluc + PITX2a + R1881			0,0000	
	PSA61luc - R1881	PSA61luc + PITX2a - R1881	PSA61luc + R1881	PSA61luc + PITX2a + R1881
PSA61luc - R1881		0,0005	0,0000	
PSA61luc + PITX2a - R1881	0,0005			
PSA61luc + R1881	0,0000			0,0000
PSA61luc + PITX2a + R1881			0,0000	
22Rv1 PITX2c	PBluc - R1881	PBluc + PITX2c R1881	- PBluc + R1881	PBluc + PITX2c + R1881
PBluc - R1881			0,0010	
PBluc + PITX2c - R1881				
PBluc + R1881	0,0010			0,0010
PBluc + PITX2c + R1881			0,0010	
	PSA61luc - R1881	PSA61luc + PITX2c - R1881	PSA61luc + R1881	PSA61luc + PITX2c + R1881
PSA61luc - R1881		0,0004	0,0006	
PSA61luc + PITX2c - R1881	0,0004			0,0070
PSA61luc + R1881	0,0006			0,0005
PSA61luc + PITX2c + R1881		0,0070	0,0005	

Tabelle 9.9: Signifikanzwerte der androgenabhängigen Reporterkonstrukte in der Zelllinie 22Rv1

	MMTVluc - R1881	MMTVluc + PITX2a - R1881	MMTVluc + R1881	MMTVluc + PITX2a + R1881
MMTVluc - R1881		0,0000	0,0002	
MMTVluc + PITX2a - R1881	0,0000			
MMTVluc + R1881	0,0002			0,0002
MMTVluc + PITX2a + R1881			0,0002	
	AREluc - R1881	AREluc + PITX2a - R1881	AREluc + R1881	AREluc + PITX2a + R1881
AREluc - R1881		0,0001	0,0000	
AREluc + PITX2a - R1881	0,0001			0,0000
AREluc + R1881	0,0000			0,0000
AREluc + PITX2a + R1881		0,0000	0,0000	
	MMTVluc - R1881	MMTVluc + PITX2c - R1881	MMTVluc + R1881	MMTVluc + PITX2c + R1881
MMTVluc - R1881		0,0010	0,0001	
MMTVluc + PITX2c - R1881	0,0010			0,0075
MMTVluc + R1881	0,0001			0,0001
MMTVluc + PITX2c + R1881		0,0075	0,0001	
	AREluc - R1881	AREluc + PITX2c - R1881	AREluc + R1881	AREluc + PITX2c + R1881
AREluc - R1881		0,0004	0,0008	
AREluc + PITX2c - R1881	0,0004			
AREluc + R1881	0,0008			
AREluc + PITX2c + R1881			0,0008	

Tabelle 9.10: Signifikanzwerte der stabilen induzierbaren PITX2a Klone

	PC3 A58	PC3 A5 -	PC3 A5 +	PC3 A12 -	PC3 A12 +	PC3 A14 -	PC3 A14 +
PC3 A58		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
PC3 A5 -	0,0000		0,0000				
PC3 A5 +	0,0000	0,0000					
PC3 A12 -	0,0000				0,0000		
PC3 A12 +	0,0000			0,0000			
PC3 A14 -	0,0000						0,0000
PC3 A14 +	0,0000					0,0000	
	22Rv1 A11	22Rv1 B1 -	22Rv1 B1 +	22Rv1 B21 -	22Rv1 B21 +	22Rv1 C11 -	22Rv1 C11 +
22Rv1 A11		0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000
22Rv1 B1 -	0,0000		0,0000				
22Rv1 B1 +	0,0000	0,0000					
22Rv1 B21 -	0,0013				0,0000		
22Rv1 B21 +	0,0000			0,0000			
22Rv1 C11 -	0,0000						0,0000
22Rv1 C11 +	0,0000					0,0000	

Tabelle 9.11: Signifikanzwerte der AR / PITX2a Kombinationstransfektion

AR	ub -	ub +	AR -	AR +	PITX2a -	PITX2a +	AR/PITX2a -	AR/PITX2a +
ub -								
ub +								
AR -				0,0027			0,0001	
AR +			0,0027					0,0010
PITX2a -							0,0000	
PITX2a +								0,0000
AR/PITX2a -			0,0001		0,0000			0,0000
AR/PITX2a +				0,0010		0,0000	0,0000	
PITX2	ub -	ub +	AR -	AR +	PITX2a -	PITX2a +	AR/PITX2a -	AR/PITX2a +
ub -								
ub +								
AR -							0,0000	
AR +								0,0001
PITX2a -						0,0001		
PITX2a +					0,0001			
AR/PITX2a -			0,0000					0,0000
AR/PITX2a +				0,0001			0,0000	
CTNNB1	ub -	ub +	AR -	AR +	PITX2a -	PITX2a +	AR/PITX2a -	AR/PITX2a +
ub -								
ub +								
AR -								
AR +								
PITX2a -								
PITX2a +								
AR/PITX2a -								
AR/PITX2a +								

Tabelle 9.12: Signifikanzwerte der TOPflash /FOPflash Reporterkonstrukte

Z2Rv1	TOP	TOP + βCat	TOP + βCat / PITX2a	TOP + βCat / FOP PITX2a	FOP + βCat	FOP + βCat / PITX2a	FOP + βCat / PITX2a		
TOP			0,0019	0,0001					
TOP + βCat					0,0170				
TOP + PITX2a	0,0019								
TOP + βCat / PITX2a	0,0001								
FOP					0,0377	0,0444			
FOP + βCat		0,0170		0,0377					
FOP + PITX2a				0,0444					
FOP + βCat / PITX2a									
PC3	TOP	TOP + βCat mut	TOP + βCat wt	TOP + PITX2a	TOP + βCat / FOP PITX2a	FOP + βCat mut	FOP + βCat wt	FOP + PITX2a	FOP + βCat / PITX2a
TOP		0,0071	0,0098	0,0008	0,0025	0,0417			
TOP + βCat mut	0,0071						0,0148		
TOP + βCat wt	0,0098								
TOP + PITX2a	0,0008								
TOP + βCat / PITX2a	0,0025								
FOP	0,0417						0,0033	0,0015	0,0107
FOP + βCat mut		0,0148				0,0033			
FOP + βCat wt									
FOP + PITX2a									
FOP + βCat / PITX2a						0,0015			
						0,0107			

9.5 Auswertung der Microarray-Daten mittels der DAVID Analyse

Tabelle 9.13: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie 22Rv1 herunterreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	4	0,0252
GO:0046394~carboxylic acid biosynthetic process	3	0,0305
GO:0016053~organic acid biosynthetic process	3	0,0305
GO:0018210~peptidyl-threonine modification	2	0,0366

Tabelle 9.14: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktion, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie 22Rv1 herunterreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0016878~acid-thiol ligase activity	2	0,0334
GO:0003711~transcription elongation regulator activity	2	0,0367
GO:0003746~translation elongation factor activity	2	0,0399
GO:0016877~ligase activity, forming carbon-sulfur bonds	2	0,0448

Tabelle 9.15: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie 22Rv1 hochreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	5	0,0021
GO:0032650~regulation of interleukin-1 alpha production	2	0,0032
GO:0032730~positive regulation of interleukin-1 alpha production	2	0,0032
GO:0045779~negative regulation of bone resorption	2	0,0065
GO:0046851~negative regulation of bone remodeling	2	0,0065
GO:0034104~negative regulation of tissue remodeling	2	0,0081
GO:0031401~positive regulation of protein modification process	3	0,0096
GO:0046850~regulation of bone remodeling	2	0,0121

GO:0045124~regulation of bone resorption	2	0,0121
GO:0032732~positive regulation of interleukin-1 production	2	0,0137
GO:0032270~positive regulation of cellular protein metabolic process	3	0,0147
GO:0034103~regulation of tissue remodeling	2	0,0153
GO:0051247~positive regulation of protein metabolic process	3	0,0159
GO:0032845~negative regulation of homeostatic process	2	0,0169
GO:0032652~regulation of interleukin-1 production	2	0,0186
GO:0045778~positive regulation of ossification	2	0,0193
GO:0031399~regulation of protein modification process	3	0,0229
GO:0010522~regulation of calcium ion transport into cytosol	2	0,0233
GO:0019233~sensory perception of pain	2	0,0257
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	4	0,0285
GO:0008283~cell proliferation	3	0,0470

Tabelle 9.16: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie PC3 herunterreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0007156~homophilic cell adhesion	24	0,0000
GO:0016337~cell-cell adhesion	28	0,0000
GO:0007155~cell adhesion	46	0,0000
GO:0022610~biological adhesion	46	0,0000
GO:0002009~morphogenesis of an epithelium	10	0,0004
GO:0055123~digestive system development	5	0,0011
GO:0048546~digestive tract morphogenesis	5	0,0011
GO:0017015~regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	6	0,0017
GO:0010039~response to iron ion	4	0,0021
GO:0035239~tube morphogenesis	10	0,0022
GO:0048729~tissue morphogenesis	12	0,0024
GO:0001655~urogenital system development	9	0,0032
GO:0048754~branching morphogenesis of a tube	7	0,0032
GO:0032963~collagen metabolic process	5	0,0033
GO:0060562~epithelial tube morphogenesis	7	0,0038
GO:0035295~tube development	13	0,0039
GO:0040012~regulation of locomotion	12	0,0039
GO:0030334~regulation of cell migration	11	0,0047
GO:0044259~multicellular organismal macromolecule metabolic process	5	0,0048

Tabelle 9.17: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie PC3 herunterreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0005509~calcium ion binding	55	0,0000
GO:0005520~insulin-like growth factor binding	5	0,0020
GO:0019838~growth factor binding	9	0,0022
GO:0046332~SMAD binding	5	0,0182
GO:0043169~cation binding	110	0,0187
GO:0046872~metal ion binding	109	0,0193
GO:0043167~ion binding	111	0,0212
GO:0005525~GTP binding	15	0,0367
GO:0004866~endopeptidase inhibitor activity	8	0,0415
GO:0032561~guanyl ribonucleotide binding	15	0,0437
GO:0019001~guanyl nucleotide binding	15	0,0437
GO:0005518~collagen binding	4	0,0443
GO:0030528~transcription regulator activity	44	0,0469

Tabelle 9.18: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie PC3 hochreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0008202~steroid metabolic process	16	0,0000
GO:0016125~sterol metabolic process	11	0,0000
GO:0006334~nucleosome assembly	10	0,0000
GO:0031497~chromatin assembly	10	0,0000
GO:0065004~protein-DNA complex assembly	10	0,0000
GO:0008203~cholesterol metabolic process	10	0,0000
GO:0016126~sterol biosynthetic process	7	0,0000
GO:0034728~nucleosome organization	10	0,0000
GO:0065003~macromolecular complex assembly	27	0,0000
GO:0006333~chromatin assembly or disassembly	11	0,0000
GO:0043933~macromolecular complex subunit organization	27	0,0001
GO:0006323~DNA packaging	10	0,0001
GO:0008299~isoprenoid biosynthetic process	5	0,0003
GO:0006694~steroid biosynthetic process	8	0,0005
GO:0006720~isoprenoid metabolic process	6	0,0007
GO:0006695~cholesterol biosynthetic process	5	0,0008
GO:0008610~lipid biosynthetic process	15	0,0009

GO:0051336~regulation of hydrolase activity	14	0,0038
GO:0034622~cellular macromolecular complex assembly	13	0,0064
GO:0007017~microtubule-based process	11	0,0090
GO:0006325~chromatin organization	14	0,0097
GO:0031175~neuron projection development	11	0,0098
GO:0048545~response to steroid hormone stimulus	9	0,0140
GO:0034621~cellular macromolecular complex subunit organization	13	0,0150
GO:0022600~digestive system process	4	0,0179
GO:0030030~cell projection organization	13	0,0185
GO:0006984~ER-nuclear signaling pathway	4	0,0194
GO:0006461~protein complex assembly	16	0,0195
GO:0070271~protein complex biogenesis	16	0,0195
GO:0050716~positive regulation of interleukin-1 secretion	3	0,0214
GO:0012501~programmed cell death	18	0,0237
GO:0042981~regulation of apoptosis	22	0,0237
GO:0050704~regulation of interleukin-1 secretion	3	0,0245
GO:0051259~protein oligomerization	8	0,0248
GO:0030155~regulation of cell adhesion	7	0,0254
GO:0051262~protein tetramerization	4	0,0258
GO:0043067~regulation of programmed cell death	22	0,0260
GO:0010941~regulation of cell death	22	0,0270
GO:0008219~cell death	20	0,0276
GO:0006458~'de novo' protein folding	3	0,0277
GO:0010033~response to organic substance	20	0,0283
GO:0051276~chromosome organization	15	0,0292
GO:0016265~death	20	0,0294
GO:0032732~positive regulation of interleukin-1 production	3	0,0310
GO:0032989~cellular component morphogenesis	13	0,0311
GO:0031647~regulation of protein stability	4	0,0313
GO:0000902~cell morphogenesis	12	0,0331
GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	11	0,0339
GO:0055114~oxidation reduction	18	0,0343
GO:0007204~elevation of cytosolic calcium ion concentration	6	0,0348
GO:0009719~response to endogenous stimulus	13	0,0353
GO:0008206~bile acid metabolic process	3	0,0382
GO:0042060~wound healing	8	0,0382
GO:0009119~ribonucleoside metabolic process	4	0,0395
GO:0009628~response to abiotic stimulus	12	0,0406
GO:0043281~regulation of caspase activity	5	0,0408
GO:0000278~mitotic cell cycle	12	0,0420
GO:0051346~negative regulation of hydrolase activity	4	0,0439
GO:0051480~cytosolic calcium ion homeostasis	6	0,0449
GO:0052548~regulation of endopeptidase activity	5	0,0458
GO:0007256~activation of JNKK activity	2	0,0484
GO:0051046~regulation of secretion	8	0,0491
GO:0006928~cell motion	14	0,0493

Tabelle 9.19: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz nichtinduzierte Klone gegen die Mutterzelllinie, die in der Zelllinie PC3 hochreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0033293~monocarboxylic acid binding	6	0,0017
GO:0050661~NADP or NADPH binding	4	0,0199
GO:0050662~coenzyme binding	8	0,0272
GO:0008289~lipid binding	14	0,0306
GO:0000166~nucleotide binding	48	0,0310
GO:0004221~ubiquitin thiolesterase activity	5	0,0327
GO:0017076~purine nucleotide binding	42	0,0327
GO:0016780~phosphotransferase activity, for other substituted phosphate groups	3	0,0333
GO:0060589~nucleoside-triphosphatase regulator activity	13	0,0351
GO:0004722~protein serine/threonine phosphatase activity	4	0,0356
GO:0016628~oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor	3	0,0368
GO:0001882~nucleoside binding	36	0,0393
GO:0019899~enzyme binding	15	0,0434
GO:0008047~enzyme activator activity	11	0,0447
GO:0030554~adenyl nucleotide binding	35	0,0457

Tabelle 9.20: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie 22Rv1 herunterreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0034470~ncRNA processing	22	0,0000
GO:0046942~carboxylic acid transport	19	0,0000
GO:0015849~organic acid transport	19	0,0000
GO:0022613~ribonucleoprotein complex biogenesis	21	0,0000
GO:0034660~ncRNA metabolic process	24	0,0000
GO:0042254~ribosome biogenesis	17	0,0000
GO:0008033~tRNA processing	12	0,0000
GO:0006865~amino acid transport	13	0,0000
GO:0015837~amine transport	13	0,0004
GO:0006399~tRNA metabolic process	13	0,0004
GO:0006396~RNA processing	33	0,0009

GO:0016072~rRNA metabolic process	11	0,0011
GO:0009064~glutamine family amino acid metabolic process	8	0,0013
GO:0009113~purine base biosynthetic process	4	0,0024
GO:0006364~rRNA processing	10	0,0029
GO:0008295~spermidine biosynthetic process	3	0,0031
GO:0009126~purine nucleoside monophosphate metabolic process	5	0,0035
GO:0009167~purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	5	0,0035
GO:0006259~DNA metabolic process	29	0,0041
GO:0030879~mammary gland development	8	0,0041
GO:0048732~gland development	12	0,0044
GO:0045686~negative regulation of glial cell differentiation	4	0,0046
GO:0014014~negative regulation of gliogenesis	4	0,0046
GO:0009309~amine biosynthetic process	9	0,0046
GO:0007005~mitochondrion organization	12	0,0052
GO:0051450~myoblast proliferation	3	0,0060
GO:0042149~cellular response to glucose starvation	3	0,0060
GO:0008216~spermidine metabolic process	3	0,0060
GO:0009161~ribonucleoside monophosphate metabolic process	5	0,0080
GO:0006144~purine base metabolic process	4	0,0094
GO:0046112~nucleobase biosynthetic process	4	0,0094
GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	20	0,0098
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	21	0,0115
GO:0007595~lactation	5	0,0120
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	21	0,0132
GO:0060548~negative regulation of cell death	21	0,0135
GO:0006536~glutamate metabolic process	4	0,0138
GO:0006400~tRNA modification	4	0,0138
GO:0006537~glutamate biosynthetic process	3	0,0144
GO:0021700~developmental maturation	9	0,0167
GO:0009168~purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	4	0,0192
GO:0009127~purine nucleoside monophosphate biosynthetic process	4	0,0192
GO:0009123~nucleoside monophosphate metabolic process	7	0,0197
GO:0032297~negative regulation of DNA replication initiation	3	0,0197
GO:0000076~DNA replication checkpoint	3	0,0197
GO:0006541~glutamine metabolic process	4	0,0222
GO:0015718~monocarboxylic acid transport	6	0,0223
GO:0042127~regulation of cell proliferation	37	0,0229
GO:0009108~coenzyme biosynthetic process	7	0,0240
GO:0006839~mitochondrial transport	7	0,0240
GO:0045685~regulation of glial cell differentiation	4	0,0255
GO:0006984~ER-nuclear signaling pathway	5	0,0257
GO:0006596~polyamine biosynthetic process	3	0,0257
GO:0007067~mitosis	14	0,0269
GO:0000280~nuclear division	14	0,0269
GO:0019216~regulation of lipid metabolic process	9	0,0289
GO:0007049~cell cycle	36	0,0290
GO:0015804~neutral amino acid transport	4	0,0291

GO:0014013~regulation of gliogenesis	4	0,0291
GO:0042398~cellular amino acid derivative biosynthetic process	6	0,0300
GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle	14	0,0307
GO:0008286~insulin receptor signaling pathway	5	0,0308
GO:0030174~regulation of DNA replication initiation	3	0,0324
GO:0021766~hippocampus development	4	0,0329
GO:0006887~exocytosis	9	0,0332
GO:0048469~cell maturation	7	0,0344
GO:0048285~organelle fission	14	0,0357
GO:0015807~L-amino acid transport	4	0,0369
GO:0009112~nucleobase metabolic process	4	0,0369
GO:0009156~ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	4	0,0369
GO:0009410~response to xenobiotic stimulus	4	0,0369
GO:0051188~cofactor biosynthetic process	8	0,0378
GO:0006576~biogenic amine metabolic process	8	0,0378
GO:0006575~cellular amino acid derivative metabolic process	11	0,0437
GO:0006260~DNA replication	12	0,0451
GO:0022402~cell cycle process	27	0,0455
GO:0007368~determination of left/right symmetry	5	0,0461
GO:0033554~cellular response to stress	27	0,0462
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	19	0,0466
GO:0021895~cerebral cortex neuron differentiation	3	0,0474
GO:0006595~polyamine metabolic process	3	0,0474
GO:0009855~determination of bilateral symmetry	5	0,0496
GO:0009799~determination of symmetry	5	0,0496

Tabelle 9.21: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie 22Rv1 herunterreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0015171~amino acid transmembrane transporter activity	11	0,0000
GO:0005275~amine transmembrane transporter activity	11	0,0001
GO:0015179~L-amino acid transmembrane transporter activity	8	0,0002
GO:0003723~RNA binding	42	0,0002
GO:0008175~tRNA methyltransferase activity	5	0,0003
GO:0008173~RNA methyltransferase activity	6	0,0005
GO:0043531~ADP binding	5	0,0027
GO:0001883~purine nucleoside binding	71	0,0033
GO:0030554~adenyl nucleotide binding	70	0,0035
GO:0017076~purine nucleotide binding	82	0,0039
GO:0001882~nucleoside binding	71	0,0039
GO:0015175~neutral amino acid transmembrane transporter activity	5	0,0039

GO:0004518~nuclease activity	13	0,0046
GO:0000166~nucleotide binding	93	0,0049
GO:0032559~adenyl ribonucleotide binding	66	0,0055
GO:0047115~trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase activity	3	0,0058
GO:0032553~ribonucleotide binding	78	0,0060
GO:0032555~purine ribonucleotide binding	78	0,0060
GO:0005524~ATP binding	65	0,0062
GO:0008408~3'-5' exonuclease activity	5	0,0113
GO:0030515~snoRNA binding	3	0,0139
GO:0016229~steroid dehydrogenase activity	5	0,0161
GO:0031406~carboxylic acid binding	11	0,0167
GO:0004540~ribonuclease activity	7	0,0182
GO:0016595~glutamate binding	3	0,0191
GO:0016628~oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, NAD or NADP as acceptor	4	0,0212
GO:0016796~exonuclease activity, active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5'-phosphomonoesters	4	0,0244
GO:0004527~exonuclease activity	6	0,0261
GO:0043168~anion binding	8	0,0272
GO:0000049~tRNA binding	4	0,0278
GO:0016864~intramolecular oxidoreductase activity, transposing S-S bonds	3	0,0313
GO:0003756~protein disulfide isomerase activity	3	0,0313
GO:0008094~DNA-dependent ATPase activity	6	0,0344
GO:0016862~intramolecular oxidoreductase activity, interconverting keto- and enol-groups	3	0,0384
GO:0008171~O-methyltransferase activity	3	0,0384
GO:0016597~amino acid binding	6	0,0416
GO:0043566~structure-specific DNA binding	10	0,0420
GO:0005313~L-glutamate transmembrane transporter activity	3	0,0459

Tabelle 9.22: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie 22Rv1 hochreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0007156~homophilic cell adhesion	28	0,0000
GO:0007242~intracellular signaling cascade	98	0,0000
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	38	0,0000
GO:0016337~cell-cell adhesion	33	0,0000
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	38	0,0000
GO:0042127~regulation of cell proliferation	65	0,0000
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	61	0,0000

GO:0045449~regulation of transcription	167	0,0000
GO:0043434~response to peptide hormone stimulus	21	0,0000
GO:0007169~transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	26	0,0001
GO:0048812~neuron projection morphogenesis	25	0,0001
GO:0030030~cell projection organization	36	0,0001
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	36	0,0001
GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation	27	0,0001
GO:0006350~transcription	136	0,0002
GO:0031175~neuron projection development	27	0,0003
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	65	0,0003
GO:0048858~cell projection morphogenesis	26	0,0003
GO:0007409~axonogenesis	22	0,0004
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	54	0,0004
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	52	0,0004
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	41	0,0004
GO:0045768~positive regulation of anti-apoptosis	8	0,0004
GO:0048667~cell morphogenesis involved in neuron differentiation	23	0,0005
GO:0007243~protein kinase cascade	34	0,0005
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	50	0,0005
GO:0000902~cell morphogenesis	33	0,0005
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	41	0,0005
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	51	0,0005
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	54	0,0006
GO:0045941~positive regulation of transcription	46	0,0006
GO:0032990~cell part morphogenesis	26	0,0006
GO:0022610~biological adhesion	54	0,0007
GO:0007155~cell adhesion	54	0,0007
GO:0048666~neuron development	31	0,0009
GO:0032868~response to insulin stimulus	14	0,0010
GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	44	0,0010
GO:0010628~positive regulation of gene expression	46	0,0010
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	113	0,0012
GO:0030501~positive regulation of bone mineralization	6	0,0013
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	115	0,0013
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	45	0,0014
GO:0016481~negative regulation of transcription	38	0,0014
GO:0032989~cellular component morphogenesis	34	0,0015
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	44	0,0016
GO:0070169~positive regulation of biomineral formation	6	0,0017
GO:0048008~platelet-derived growth factor receptor signaling pathway	6	0,0017
GO:0007411~axon guidance	14	0,0018
GO:0042325~regulation of phosphorylation	38	0,0018
GO:0045767~regulation of anti-apoptosis	8	0,0020
GO:0019882~antigen processing and presentation	12	0,0020

GO:0019220~regulation of phosphate metabolic process	39	0,0021
GO:0051174~regulation of phosphorus metabolic process	39	0,0021
GO:0060284~regulation of cell development	21	0,0021
GO:0009991~response to extracellular stimulus	22	0,0021
GO:0010629~negative regulation of gene expression	40	0,0023
GO:0051270~regulation of cell motion	20	0,0024
GO:0030500~regulation of bone mineralization	7	0,0027
GO:0031667~response to nutrient levels	20	0,0030
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	53	0,0031
GO:0042981~regulation of apoptosis	57	0,0032
GO:0007264~small GTPase mediated signal transduction	27	0,0033
GO:0010033~response to organic substance	52	0,0035
GO:0070167~regulation of biomineral formation	7	0,0037
GO:0043067~regulation of programmed cell death	57	0,0038
GO:0030182~neuron differentiation	35	0,0040
GO:0030278~regulation of ossification	11	0,0040
GO:0001932~regulation of protein amino acid phosphorylation	18	0,0040
GO:0051094~positive regulation of developmental process	25	0,0041
GO:0045667~regulation of osteoblast differentiation	8	0,0041
GO:0010941~regulation of cell death	57	0,0041
GO:0009968~negative regulation of signal transduction	21	0,0049
GO:0045778~positive regulation of ossification	6	0,0050
GO:0045934~negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	39	0,0052
GO:0048145~regulation of fibroblast proliferation	7	0,0059
GO:0009725~response to hormone stimulus	30	0,0060
GO:0045669~positive regulation of osteoblast differentiation	6	0,0060
GO:0051172~negative regulation of nitrogen compound metabolic process	39	0,0064
GO:0007568~aging	13	0,0065
GO:0010761~fibroblast migration	3	0,0067
GO:0040007~growth	18	0,0071
GO:0045597~positive regulation of cell differentiation	21	0,0073
GO:0030334~regulation of cell migration	17	0,0074
GO:0018205~peptidyl-lysine modification	5	0,0076
GO:0002474~antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	5	0,0076
GO:0007507~heart development	20	0,0077
GO:0043065~positive regulation of apoptosis	33	0,0094
GO:0035295~tube development	20	0,0098
GO:0017015~regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	7	0,0101
GO:0030858~positive regulation of epithelial cell differentiation	4	0,0103
GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	33	0,0103
GO:0010942~positive regulation of cell death	33	0,0111
GO:0040012~regulation of locomotion	18	0,0112
GO:0031668~cellular response to extracellular stimulus	9	0,0112
GO:0051050~positive regulation of transport	20	0,0112

GO:0001666~response to hypoxia	14	0,0123
GO:0032583~regulation of gene-specific transcription	14	0,0123
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	28	0,0129
GO:0051051~negative regulation of transport	14	0,0131
GO:0034097~response to cytokine stimulus	10	0,0132
GO:0043549~regulation of kinase activity	28	0,0133
GO:0060429~epithelium development	20	0,0134
GO:0033273~response to vitamin	9	0,0134
GO:0042692~muscle cell differentiation	13	0,0135
GO:0006928~cell motion	35	0,0135
GO:0009967~positive regulation of signal transduction	24	0,0154
GO:0046649~lymphocyte activation	18	0,0155
GO:0045859~regulation of protein kinase activity	27	0,0157
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	28	0,0158
GO:0032869~cellular response to insulin stimulus	9	0,0158
GO:0010647~positive regulation of cell communication	26	0,0160
GO:0010648~negative regulation of cell communication	21	0,0165
GO:0007584~response to nutrient	14	0,0172
GO:0031102~neuron projection regeneration	4	0,0175
GO:0042306~regulation of protein import into Nukleus	7	0,0179
GO:0031669~cellular response to nutrient levels	7	0,0179
GO:0070482~response to oxygen levels	14	0,0182
GO:0019221~cytokine-mediated signaling pathway	9	0,0186
GO:0042326~negative regulation of phosphorylation	7	0,0199
GO:0009719~response to endogenous stimulus	30	0,0207
GO:0070120~ciliary neurotrophic factor-mediated signaling pathway	3	0,0209
GO:0051338~regulation of transferase activity	28	0,0216
GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation	7	0,0219
GO:0051100~negative regulation of binding	8	0,0224
GO:0048598~embryonic morphogenesis	24	0,0236
GO:0045321~leukocyte activation	20	0,0244
GO:0051146~striated muscle cell differentiation	10	0,0252
GO:0045936~negative regulation of phosphate metabolic process	7	0,0265
GO:0010563~negative regulation of phosphorus metabolic process	7	0,0265
GO:0032582~negative regulation of gene-specific transcription	7	0,0265
GO:0001934~positive regulation of protein amino acid phosphorylation	10	0,0269
GO:0010171~body morphogenesis	4	0,0270
GO:0046068~cGMP metabolic process	4	0,0270
GO:0060322~head development	4	0,0270
GO:0031399~regulation of protein modification process	23	0,0274
GO:0009914~hormone transport	7	0,0291
GO:0043627~response to estrogen stimulus	11	0,0294
GO:0042733~embryonic digit morphogenesis	5	0,0299
GO:0010817~regulation of hormone levels	14	0,0300
GO:0051923~sulfation	3	0,0304
GO:0006477~protein amino acid sulfation	3	0,0304
GO:0000165~MAPKKK cascade	16	0,0319

GO:0030855~epithelial cell differentiation	13	0,0322
GO:0048146~positive regulation of fibroblast proliferation	5	0,0340
GO:0001501~skeletal system development	24	0,0343
GO:0043392~negative regulation of DNA binding	7	0,0346
GO:0006917~induction of apoptosis	24	0,0354
GO:0006897~endocytosis	18	0,0365
GO:0010324~membrane invagination	18	0,0365
GO:0012502~induction of programmed cell death	24	0,0367
GO:0032535~regulation of cellular component size	21	0,0376
GO:0001952~regulation of cell-matrix adhesion	5	0,0385
GO:0008361~regulation of cell size	17	0,0400
GO:0033157~regulation of intracellular protein transport	7	0,0407
GO:0048013~ephrin receptor signaling pathway	3	0,0412
GO:0006468~protein amino acid phosphorylation	43	0,0423
GO:0030029~actin filament-based process	19	0,0424
GO:0032101~regulation of response to external stimulus	14	0,0428
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	29	0,0430
GO:0035051~cardiac cell differentiation	5	0,0433
GO:0048002~antigen processing and presentation of peptide antigen	5	0,0433
GO:0007173~epidermal growth factor receptor signaling pathway	5	0,0433
GO:0042327~positive regulation of phosphorylation	10	0,0433
GO:0016477~cell migration	21	0,0439
GO:0008629~induction of apoptosis by intracellular signals	7	0,0440
GO:0032355~response to estradiol stimulus	7	0,0440
GO:0015833~peptide transport	7	0,0440
GO:0030036~actin cytoskeleton organization	18	0,0452
GO:0043242~negative regulation of protein complex disassembly	6	0,0454
GO:0042307~positive regulation of protein import into Nukleus	4	0,0454
GO:0040017~positive regulation of locomotion	10	0,0458
GO:0051272~positive regulation of cell motion	10	0,0458
GO:0007010~cytoskeleton organization	30	0,0479
GO:0030856~regulation of epithelial cell differentiation	5	0,0483
GO:0048641~regulation of skeletal muscle tissue development	5	0,0483
GO:0007267~cell-cell signaling	39	0,0491
GO:0033189~response to vitamin A	6	0,0495
GO:0042594~response to starvation	6	0,0495

Tabelle 9.23: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie 22Rv1 hochreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0035091~phosphoinositide binding	19	0,0000

GO:0030528~transcription regulator activity	107	0,0001
GO:0005543~phospholipid binding	22	0,0002
GO:0005509~calcium ion binding	70	0,0002
GO:0008092~cytoskeletal protein binding	42	0,0010
GO:0003700~transcription factor activity	68	0,0030
GO:0043565~sequence-specific DNA binding	46	0,0037
GO:0003704~specific RNA polymerase II transcription factor activity	8	0,0046
GO:0008289~lipid binding	36	0,0048
GO:0016791~phosphatase activity	23	0,0056
GO:0005545~phosphatidylinositol binding	5	0,0065
GO:0016564~transcription repressor activity	27	0,0070
GO:0016160~amylase activity	3	0,0070
GO:0004556~alpha-amylase activity	3	0,0070
GO:0008134~transcription factor binding	39	0,0074
GO:0019198~transmembrane receptor protein phosphatase activity	5	0,0102
GO:0003712~transcription cofactor activity	29	0,0121
GO:0046979~TAP2 binding	3	0,0135
GO:0046978~TAP1 binding	3	0,0135
GO:0046977~TAP binding	3	0,0135
GO:0003702~RNA polymerase II transcription factor activity	21	0,0172
GO:0042802~identical protein binding	44	0,0222
GO:0016566~specific transcriptional repressor activity	6	0,0301
GO:0003779~actin binding	25	0,0311
GO:0019838~growth factor binding	11	0,0335
GO:0030145~manganese ion binding	14	0,0401
GO:0003705~RNA polymerase II transcription factor activity, enhancer binding	6	0,0409
GO:0004630~phospholipase D activity	3	0,0430
GO:0003677~DNA binding	132	0,0477
GO:0008484~sulfuric ester hydrolase activity	4	0,0480
GO:0032393~MHC class I receptor activity	4	0,0480
GO:0016563~transcription activator activity	29	0,0483

Tabelle 9.24: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie PC3 herunterreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0001501~skeletal system development	13	0,0000
GO:0048705~skeletal system morphogenesis	7	0,0005
GO:0042311~vasodilation	4	0,0015
GO:0051094~positive regulation of developmental process	9	0,0032
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	10	0,0032

GO:0030334~regulation of cell migration	7	0,0038
GO:0040012~regulation of locomotion	7	0,0070
GO:0051270~regulation of cell motion	7	0,0072
GO:0016481~negative regulation of transcription	11	0,0072
GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	12	0,0088
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	12	0,0105
GO:0035150~regulation of tube size	4	0,0113
GO:0050880~regulation of blood vessel size	4	0,0113
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	12	0,0121
GO:0010629~negative regulation of gene expression	11	0,0134
GO:0034330~cell junction organization	4	0,0138
GO:0003018~vascular process in circulatory system	4	0,0144
GO:0045934~negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	11	0,0148
GO:0009953~dorsal/ventral pattern formation	4	0,0158
GO:0051172~negative regulation of nitrogen compound metabolic process	11	0,0161
GO:0009954~proximal/distal pattern formation	3	0,0172
GO:0021882~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in forebrain neuron fate commitment	2	0,0175
GO:0021898~commitment of multipotent stem cells to the neuronal lineage in the forebrain	2	0,0175
GO:0021893~cerebral cortex GABAergic interneuron fate commitment	2	0,0175
GO:0045778~positive regulation of ossification	3	0,0187
GO:0046883~regulation of hormone secretion	4	0,0203
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	12	0,0215
GO:0040007~growth	6	0,0227
GO:0010811~positive regulation of cell-substrate adhesion	3	0,0250
GO:0048755~branching morphogenesis of a nerve	2	0,0262
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	12	0,0263
GO:0048511~rhythmic process	5	0,0264
GO:0001763~morphogenesis of a branching structure	4	0,0274
GO:0030500~regulation of bone mineralization	3	0,0284
GO:0003002~regionalization	6	0,0300
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	7	0,0300
GO:0007389~pattern specification process	7	0,0305
GO:0048732~gland development	5	0,0313
GO:0030278~regulation of ossification	4	0,0313
GO:0070167~regulation of biomineral formation	3	0,0321
GO:0032535~regulation of cellular component size	7	0,0325
GO:0045165~cell fate commitment	5	0,0343
GO:0006198~cAMP catabolic process	2	0,0347
GO:0060284~regulation of cell development	6	0,0347
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	8	0,0377
GO:0030182~neuron differentiation	9	0,0394
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	8	0,0407

GO:0021877~forebrain neuron fate commitment	2	0,0432
GO:0030335~positive regulation of cell migration	4	0,0437
GO:0009187~cyclic nucleotide metabolic process	3	0,0439
GO:0007155~cell adhesion	12	0,0441
GO:0022610~biological adhesion	12	0,0445
GO:0035295~tube development	6	0,0448
GO:0030900~forebrain development	5	0,0451
GO:0042475~odontogenesis of dentine-containing tooth	3	0,0460
GO:0007169~transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	6	0,0478
GO:0050796~regulation of insulin secretion	3	0,0482

Tabelle 9.25: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie PC3 herunterreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0008373~sialyltransferase activity	4	0,0008
GO:0005096~GTPase activator activity	8	0,0047
GO:0030695~GTPase regulator activity	10	0,0139
GO:0060589~nucleoside-triphosphatase regulator activity	10	0,0158
GO:0019838~growth factor binding	5	0,0171
GO:0033872~[heparan sulfate]-glucosamine 3-sulfotransferase 3 activity	2	0,0187
GO:0004714~transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	4	0,0251
GO:0008047~enzyme activator activity	8	0,0386
GO:0008081~phosphoric diester hydrolase activity	4	0,0445
GO:0005083~small GTPase regulator activity	7	0,0445
GO:0004862~cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity	2	0,0461
GO:0000149~SNARE binding	3	0,0471

Tabelle 9.26: Analyse der GO-Terme bezogen auf biologische Prozesse, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie PC3 hochreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0042127~regulation of cell proliferation	39	0,0000
GO:0030855~epithelial cell differentiation	14	0,0000
GO:0008285~negative regulation of cell proliferation	23	0,0000
GO:0007398~ectoderm development	16	0,0000

GO:0060429~epithelium development	17	0,0001
GO:0046324~regulation of glucose import	7	0,0001
GO:0010827~regulation of glucose transport	7	0,0001
GO:0030216~keratinocyte differentiation	9	0,0001
GO:0009719~response to endogenous stimulus	23	0,0001
GO:0009611~response to wounding	27	0,0002
GO:0009913~epidermal cell differentiation	9	0,0002
GO:0009612~response to mechanical stimulus	8	0,0003
GO:0009725~response to hormone stimulus	21	0,0003
GO:0030278~regulation of ossification	9	0,0004
GO:0045667~regulation of osteoblast differentiation	7	0,0004
GO:0031424~keratinization	7	0,0004
GO:0009967~positive regulation of signal transduction	18	0,0004
GO:0051240~positive regulation of multicellular organismal process	16	0,0005
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	22	0,0005
GO:0048660~regulation of smooth muscle cell proliferation	7	0,0006
GO:0002237~response to molecule of bacterial origin	9	0,0007
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	29	0,0010
GO:0048584~positive regulation of response to stimulus	15	0,0010
GO:0008544~epidermis development	13	0,0010
GO:0032891~negative regulation of organic acid transport	4	0,0012
GO:0042398~cellular amino acid derivative biosynthetic process	7	0,0013
GO:0010647~positive regulation of cell communication	18	0,0014
GO:0009991~response to extracellular stimulus	14	0,0016
GO:0016477~cell migration	16	0,0016
GO:0030334~regulation of cell migration	12	0,0017
GO:0050727~regulation of inflammatory response	8	0,0017
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	8	0,0018
GO:0009628~response to abiotic stimulus	19	0,0019
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	29	0,0019
GO:0051384~response to glucocorticoid stimulus	8	0,0019
GO:0010033~response to organic substance	30	0,0020
GO:0007167~enzyme linked receptor protein signaling pathway	18	0,0021
GO:0045669~positive regulation of osteoblast differentiation	5	0,0023
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	29	0,0024
GO:0007050~cell cycle arrest	9	0,0024
GO:0030182~neuron differentiation	21	0,0024
GO:0006928~cell motion	22	0,0028
GO:0002037~negative regulation of L-glutamate transport	3	0,0030
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	18	0,0030
GO:0006954~inflammatory response	17	0,0031
GO:0031960~response to corticosteroid stimulus	8	0,0032
GO:0032101~regulation of response to external stimulus	11	0,0034
GO:0010628~positive regulation of gene expression	25	0,0035
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	18	0,0035
GO:0060548~negative regulation of cell death	18	0,0036
GO:0001816~cytokine production	6	0,0037

GO:0051222~positive regulation of protein transport	7	0,0041
GO:0040012~regulation of locomotion	12	0,0044
GO:0048870~cell motility	16	0,0045
GO:0051674~localization of cell	16	0,0045
GO:0051270~regulation of cell motion	12	0,0046
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	18	0,0048
GO:0002036~regulation of L-glutamate transport	3	0,0049
GO:0048532~anatomical structure arrangement	3	0,0049
GO:0018101~peptidyl-citrulline biosynthetic process from peptidyl-arginine	3	0,0049
GO:0032000~positive regulation of fatty acid beta-oxidation	3	0,0049
GO:0048661~positive regulation of smooth muscle cell proliferation	5	0,0050
GO:0019221~cytokine-mediated signaling pathway	7	0,0050
GO:0008283~cell proliferation	20	0,0051
GO:0031667~response to nutrient levels	12	0,0054
GO:0031175~neuron projection development	14	0,0058
GO:0048568~embryonic organ development	11	0,0059
GO:0043043~peptide biosynthetic process	4	0,0062
GO:0032890~regulation of organic acid transport	4	0,0062
GO:0070201~regulation of establishment of protein localization	9	0,0063
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	32	0,0069
GO:0051956~negative regulation of amino acid transport	3	0,0072
GO:0044070~regulation of anion transport	3	0,0072
GO:0019240~citrulline biosynthetic process	3	0,0072
GO:0008360~regulation of cell shape	6	0,0074
GO:0007389~pattern specification process	14	0,0081
GO:0002684~positive regulation of immune system process	13	0,0082
GO:0019722~calcium-mediated signaling	5	0,0095
GO:0045941~positive regulation of transcription	23	0,0097
GO:0021546~rhombomere development	3	0,0100
GO:0000052~citrulline metabolic process	3	0,0100
GO:0007267~cell-cell signaling	24	0,0100
GO:0042325~regulation of phosphorylation	20	0,0101
GO:0045786~negative regulation of cell cycle	7	0,0102
GO:0007243~protein kinase cascade	17	0,0105
GO:0048666~neuron development	16	0,0107
GO:0044057~regulation of system process	15	0,0111
GO:0050670~regulation of lymphocyte proliferation	7	0,0114
GO:0042102~positive regulation of T cell proliferation	5	0,0115
GO:0048732~gland development	9	0,0119
GO:0032944~regulation of mononuclear cell proliferation	7	0,0120
GO:0070663~regulation of leukocyte proliferation	7	0,0120
GO:0048545~response to steroid hormone stimulus	11	0,0123
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	20	0,0127
GO:0009617~response to bacterium	11	0,0128
GO:0010828~positive regulation of glucose transport	4	0,0129

GO:0046326~positive regulation of glucose import	4	0,0129
GO:0046321~positive regulation of fatty acid oxidation	3	0,0131
GO:0051953~negative regulation of amine transport	3	0,0131
GO:0031998~regulation of fatty acid beta-oxidation	3	0,0131
GO:0042129~regulation of T cell proliferation	6	0,0131
GO:0009416~response to light stimulus	9	0,0134
GO:0032880~regulation of protein localization	9	0,0134
GO:0030879~mammary gland development	6	0,0140
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	20	0,0141
GO:0007584~response to nutrient	9	0,0145
GO:0003002~regionalization	11	0,0146
GO:0043271~negative regulation of ion transport	4	0,0146
GO:0045727~positive regulation of translation	4	0,0146
GO:0051174~regulation of phosphorus metabolic process	20	0,0149
GO:0019220~regulation of phosphate metabolic process	20	0,0149
GO:0032103~positive regulation of response to external stimulus	6	0,0149
GO:0051223~regulation of protein transport	8	0,0151
GO:0030335~positive regulation of cell migration	7	0,0157
GO:0006790~sulfur metabolic process	8	0,0158
GO:0021537~telencephalon development	6	0,0159
GO:0000902~cell morphogenesis	16	0,0161
GO:0045778~positive regulation of ossification	4	0,0165
GO:0018195~peptidyl-arginine modification	3	0,0166
GO:0046325~negative regulation of glucose import	3	0,0166
GO:0030509~BMP signaling pathway	5	0,0173
GO:0007242~intracellular signaling cascade	41	0,0176
GO:0006916~anti-apoptosis	11	0,0194
GO:0045834~positive regulation of lipid metabolic process	5	0,0201
GO:0050994~regulation of lipid catabolic process	4	0,0205
GO:0048535~lymph node development	3	0,0205
GO:0051955~regulation of amino acid transport	3	0,0205
GO:0010829~negative regulation of glucose transport	3	0,0205
GO:0033209~tumor necrosis factor-mediated signaling pathway	3	0,0205
GO:0045725~positive regulation of glycogen biosynthetic process	3	0,0205
GO:0006750~glutathione biosynthetic process	3	0,0205
GO:0030030~cell projection organization	16	0,0211
GO:0048812~neuron projection morphogenesis	11	0,0237
GO:0040007~growth	10	0,0239
GO:0016337~cell-cell adhesion	13	0,0239
GO:0051272~positive regulation of cell motion	7	0,0240
GO:0040017~positive regulation of locomotion	7	0,0240
GO:0043434~response to peptide hormone stimulus	9	0,0243
GO:0021871~forebrain regionalization	3	0,0247
GO:0021602~cranial nerve morphogenesis	3	0,0247
GO:0034101~erythrocyte homeostasis	5	0,0248
GO:0031349~positive regulation of defense response	6	0,0250
GO:0051094~positive regulation of developmental process	13	0,0251

GO:0032868~response to insulin stimulus	7	0,0262
GO:0048585~negative regulation of response to stimulus	7	0,0262
GO:0044272~sulfur compound biosynthetic process	5	0,0264
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	23	0,0273
GO:0002697~regulation of immune effector process	7	0,0274
GO:0060389~pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	3	0,0292
GO:0022604~regulation of cell morphogenesis	8	0,0298
GO:0007178~transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	7	0,0298
GO:0050729~positive regulation of inflammatory response	4	0,0299
GO:0010941~regulation of cell death	28	0,0310
GO:0051050~positive regulation of transport	11	0,0312
GO:0007169~transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	11	0,0321
GO:0043062~extracellular structure organization	9	0,0325
GO:0001666~response to hypoxia	8	0,0331
GO:0006959~humoral immune response	6	0,0336
GO:0045995~regulation of embryonic development	3	0,0340
GO:0050996~positive regulation of lipid catabolic process	3	0,0340
GO:0051051~negative regulation of transport	8	0,0343
GO:0006793~phosphorus metabolic process	32	0,0348
GO:0006796~phosphate metabolic process	32	0,0348
GO:0070664~negative regulation of leukocyte proliferation	4	0,0353
GO:0032945~negative regulation of mononuclear cell proliferation	4	0,0353
GO:0001936~regulation of endothelial cell proliferation	4	0,0353
GO:0050672~negative regulation of lymphocyte proliferation	4	0,0353
GO:0050804~regulation of synaptic transmission	8	0,0354
GO:0048534~hemopoietic or lymphoid organ development	12	0,0357
GO:0050671~positive regulation of lymphocyte proliferation	5	0,0359
GO:0010740~positive regulation of protein kinase cascade	9	0,0368
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	23	0,0370
GO:0032989~cellular component morphogenesis	16	0,0373
GO:0032946~positive regulation of mononuclear cell proliferation	5	0,0380
GO:0070665~positive regulation of leukocyte proliferation	5	0,0380
GO:0021987~cerebral cortex development	4	0,0382
GO:0032526~response to retinoic acid	4	0,0382
GO:0009314~response to radiation	10	0,0383
GO:0010862~positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	3	0,0390
GO:0005979~regulation of glycogen biosynthetic process	3	0,0390
GO:0032885~regulation of polysaccharide biosynthetic process	3	0,0390
GO:0010962~regulation of glucan biosynthetic process	3	0,0390
GO:0051726~regulation of cell cycle	14	0,0395
GO:0070482~response to oxygen levels	8	0,0418
GO:0042981~regulation of apoptosis	27	0,0437
GO:0001938~positive regulation of endothelial cell proliferation	3	0,0444
GO:0032881~regulation of polysaccharide metabolic process	3	0,0444

GO:0048747~muscle fiber development	4	0,0444
GO:0060041~retina development in camera-type eye	4	0,0444
GO:0030902~hindbrain development	5	0,0471
GO:0050778~positive regulation of immune response	8	0,0474
GO:0031331~positive regulation of cellular catabolic process	4	0,0476
GO:0006469~negative regulation of protein kinase activity	6	0,0478
GO:0043067~regulation of programmed cell death	27	0,0479
GO:0022610~biological adhesion	24	0,0481
GO:0007155~cell adhesion	24	0,0491
GO:0006468~protein amino acid phosphorylation	23	0,0499

Tabelle 9.27: Analyse der GO-Terme bezogen auf molekulare Funktionen, mit Hilfe des DAVID Annotation Tools (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Analysiert wurden die Gene im Datensatz induzierte Klone gegen nichtinduzierte Klone, die in der Zelllinie PC3 hochreguliert sind. Count: Anzahl der Gene, die in den jeweiligen GO-Term enthalten sind. Rot: GO-Terme, die nach der Korrektur durch die Benjamini-Hochberg Methode signifikant in den analysierten Genen vorkommen.

Term	Count	P-Wert
GO:0003840~gamma-glutamyltransferase activity	4	0,0004
GO:0016755~transferase activity, transferring amino-acyl groups	5	0,0007
GO:0005125~cytokine activity	13	0,0014
GO:0016813~hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amidines	4	0,0021
GO:0032813~tumor necrosis factor receptor superfamily binding	5	0,0047
GO:0004668~protein-arginine deiminase activity	3	0,0047
GO:0004857~enzyme inhibitor activity	14	0,0075
GO:0004879~ligand-dependent nuclear receptor activity	6	0,0092
GO:0003700~transcription factor activity	34	0,0105
GO:0005164~tumor necrosis factor receptor binding	4	0,0108
GO:0004714~transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	6	0,0166
GO:0004867~serine-type endopeptidase inhibitor activity	7	0,0167
GO:0003707~steroid hormone receptor activity	5	0,0233
GO:0003779~actin binding	14	0,0314
GO:0008092~cytoskeletal protein binding	19	0,0329
GO:0019904~protein domain specific binding	14	0,0343
GO:0004860~protein kinase inhibitor activity	4	0,0454
GO:0000287~magnesium ion binding	17	0,0459
GO:0005149~interleukin-1 receptor binding	3	0,0483
GO:0019210~kinase inhibitor activity	4	0,0486

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Die Dissertation ist unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Düsseldorf, 15. Mai 2014

(Jennifer Schmidt)

11 Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz für die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, für die vielen Anregungen hinsichtlich meines Projekts sowie für die freundliche Betreuung während der gesamten Zeit bedanken.

Der Urologischen Klinik, speziell Dr. med. Christian Arsov, möchte ich für die Bereitstellung dieser interessanten Fragestellung danken sowie für das fachliche und persönliche Interesse an meiner Arbeit. Der Forschungskommission der HHU danke ich für die finanzielle Unterstützung.

PD Mag. Dr. rer. nat. Marcus V. Cronauer danke ich für die Bereitstellung der Luciferase Reporterkonstrukte und für seine Hilfestellung in wissenschaftlichen Fragen. Dem BMFZ der HHU, besonders Dr. Renè Deenen, danke ich für die Durchführung und die statistische Auswertung der Microarrays.

Ich möchte mich bei allen Kollegen des Urologischen Forschungslabors bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet und mir durch ein freundschaftliches Arbeitsklima geholfen haben, den Laboralltag mit den dazugehörigen Frustrationen zu überstehen. Ein besonderer Dank geht hierbei an Dr. Michèle Hofmann und Dr. Wolfgang Göring die mir mit ihrem fachlichen Rat stets zur Seite standen. Christiane Hader danke ich außerdem für die viele Nervenschokolade. Auch Dr. Annemarie Koch und Dr. Teodora Ribarska gilt mein besonderer Dank, da sie mich auch über die Grenzen des Labors hinaus mit freundschaftlichem Rat und wissenschaftlichen Anregungen unterstützt haben.

Ein besonderer Dank richtet sich auch an Prof. Dr. Jochen D`Haese für die finanzielle Unterstützung. Auch bei dem ganzen Institut für Zellbiologie möchte ich mich für das kollegiale Arbeitsklima herzlich bedanken. Ich kehre immer wieder gerne zu Euch zurück. Hervorheben möchte ich hierbei Agnes Papala, Sinem Kanber und Falk Gestmann die sich die Mühe gemacht haben, meine Arbeit Korrektur zu lesen und denen ich die eine oder andere Formulierung und Formatierung verdanke.

An dieser Stelle soll außerdem meinem Freund und meinen Freunden gedankt werden, die immer ein offenes Ohr hatten und es immer wieder geschafft haben, mich aufzumuntern und zu motivieren.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern. Sie waren immer für mich da und haben mich während meines gesamten Studiums und der Promotion in vielerlei Hinsicht unterstützt. Auch meinen Geschwistern, Jessi und Tim, möchte ich im speziellen Danken, da sie immer an mich geglaubt haben.