

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cytopathologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert

**Klonierung und Funktionsuntersuchung der häufigsten  
TMPRSS2-ERG-Fusionsvariante T1/E4 im  
Prostatakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Kathinka Krull**

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Engers

Zweitgutachter: Prof. Dr. Schulz

**“Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:  
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit  
gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.”**

*Albert Einstein*

**“Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben.  
Der sicherste Weg zum Erfolg ist immer,  
es doch noch einmal zu versuchen.”**

*Thomas Alva Edison*

Teile dieser Arbeit wurden in Form eines Posters veröffentlicht:

*17th International AEK Cancer Congress, March 20th-22nd, 2013 Heidelberg*

*K. Krull, M. Hoffmann, H.E. Gabbert, R. Engers*

*Effects of the TMPRSS2-ERG gene fusion on transformation, proliferation, migration and invasion.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Prostatakarzinom . . . . .	1
1.2	Die TMPRSS2-ERG-Fusionen . . . . .	5
1.3	Das Ziel dieser Arbeit . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1	Material . . . . .	11
2.1.1	Laborgeräte . . . . .	11
2.1.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	12
2.1.3	Chemikalien . . . . .	13
2.1.4	Datenbanken . . . . .	13
2.1.5	Software . . . . .	13
2.1.6	Oligonukleotide . . . . .	13
2.1.7	Vektoren und Plasmidkonstrukte . . . . .	15
2.1.8	Antikörper . . . . .	15
2.1.9	Größenstandards . . . . .	17
2.1.10	Molekularbiologische Kits . . . . .	17
2.1.11	Enzyme . . . . .	17
2.1.12	Bakterienstämme . . . . .	18
2.1.13	Zelllinien . . . . .	18
2.1.14	Transfektionsreagenzien . . . . .	19
2.1.15	Medien, Puffer, Lösungen . . . . .	19
2.2	Methoden . . . . .	28
2.2.1	RNA-Isolierung . . . . .	28
2.2.2	Reverse Transkription . . . . .	28
2.2.3	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	29

2.2.4	Quantitative Real-Time-PCR	33
2.2.5	Agarosegelelektrophorese	36
2.2.6	Aufreinigung von PCR-Proben für die Sequenzierung	36
2.2.7	Sequenzierung	36
2.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	37
2.2.9	Kultivierung von Bakterienzellen	37
2.2.10	Plasmidpräparation	37
2.2.11	Qualitäts- und Quantitätskontrolle von Nukleinsäuren	38
2.2.12	Klonierung	39
2.2.13	<i>In vitro</i> Mutagenese nach Papworth et al.	43
2.2.14	Zellkultur	45
2.2.15	Transfektion von humanen BPH1-Zellen	46
2.2.16	Nukleofektion	49
2.2.17	$\beta$ -Gal-Färbung	50
2.2.18	Transfektion von HEK293-Zellen	50
2.2.19	Western Blot	51
2.2.20	MTT-Test	55
2.2.21	Scratch-Assay	56
2.2.22	Transwell-Migrations-Assay	56
2.2.23	Matrigel-Invasions-Assay	57
2.2.24	Gelatin-Zymographie	58
2.2.25	Rac-Aktivitätsassay	59
2.2.26	Immunfluoreszenz	60
2.2.27	Colony-Formation-Assay	61
2.2.28	Softagar-Assay	62
2.2.29	Statistische Datenanalyse	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
3.1	Klonierung	63
3.2	Transfektion	69
3.2.1	Transfektion humaner benigner Prostataepithelzellen (BPH1)	69
3.2.2	Transfektion von HEK293-Zellen	73
3.3	Funktionelle und analytische Assays an transfizierten HEK293-Zellen	75
3.3.1	Einfluss der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zellproliferation	75
3.3.2	Einfluss der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Migrationsverhalten	76

---

3.3.3	Beeinflussung des invasiven Verhaltens durch die $\Delta$ N-ERG-Überexpression	78
3.3.4	Untersuchung des Einflusses der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf den Tiam1-Rac-Signalweg . . . . .	81
3.3.5	Untersuchung des Einflusses der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zell-Zelladhäsion . . . . .	84
3.3.6	Transformierende Effekte der $\Delta$ N-ERG-Überexpression . . . . .	87
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
4.1	Klonierung . . . . .	89
4.2	Transfektion . . . . .	91
4.3	Funktionelle und analytische Assays an transfizierten HEK293-Zellen . . . . .	94
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>105</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
	<b>Anhang</b>	<b>114</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>115</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>118</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>120</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>122</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

Die Prostata ist eine beim geschlechtsreifen Mann 20-30g schwere exokrine Drüse am Boden des Blasengrunds und wird embryologisch und funktionell in drei Zonen bzw. Lappen gegliedert - die periurethrale bzw. Transitional-, die zentrale und die periphere Zone, die ca. 3/4 des Organs ausmacht [1]. Benigne Prostatahyperplasien entstehen vornehmlich in der Transitionalzone, Prostatakarzinome vor allem in der peripheren Zone. Dies erklärt, warum maligne Proliferationen - im Vergleich zu der benignen Prostatahyperplasie (BPH) - erst im Spätstadium zu Symptomen wie Miktionsstörungen und Harnverhalt durch Kompression der Urethra führen [2]. Histologisch besteht das Organ aus 30-50 verzweigten tubuloalveolären Drüsen-einheiten, eingebettet in fibromuskuläres Stroma [3]. Beide Kompartimente werden durch eine Basalmembran voneinander getrennt. Wichtigster Wachstumsstimulator sowohl der normalen Prostata als auch des Prostatakarzinoms ist das männliche Geschlechtshormon Testosteron, das innerhalb des Gewebes von der  $5\alpha$ -Reduktase in das potentere Dihydrotestosteron umgewandelt wird [1].

Das Prostatakarzinom ist die häufigste maligne Neoplasie des Mannes mit einem prozentualen Anteil von 26% an allen Krebslokalisationen [4]. Latente Karzinome, d.h. Karzinome die sich weder klinisch manifestieren noch zum Tode führen, sind wesentlich häufiger. Die Inzidenz des Prostatakarzinoms steigt altersabhängig linear an, mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren. Vor dem 50. Lebensjahr ist das Prostatakarzinom sehr selten. Das Lebenszeitrisiko, das Risiko während des Lebens an einem klinisch manifesten Prostatakarzinom zu erkranken, beträgt ungefähr 12,3% [4]. Aufgrund verbesserter Früherkennungsmaßnahmen zeigten die Inzidenzwerte in den letzten Jahren einen deutlichen Anstieg. Im Vergleich dazu blieb die Mortalitätsrate jedoch über die Zeit weitestgehend konstant. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit - gemittelt über alle Subgruppen des Prostatakarzinoms - zwischen 83 und 94%. Insgesamt steht das Prostatakarzinom im Vergleich an dritter Stelle der krebsbedingten Todesfälle [4]. Die Kenntnis der Tumorbilogie eines so häufigen Karzinoms ist daher für Diagnostik, The-

rapie und Prognose der Patienten entscheidend.

Das Prostatakarzinom entwickelt sich hauptsächlich aus dem Drüsenepithel. In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um ein Adenokarzinom [5]. Die Vorstufe des invasiven Prostatakarzinoms nennt man *high-grade* prostatiche intraepitheliale Neoplasie (HG-PIN). Sie muss als obligate Präkanzerose gewertet werden und entspricht einem intraduktal wachsenden, nicht-invasiven Karzinom [1]. Sie weist - wie das invasive Karzinom - erhöhte Mitoseraten auf, die Basalmembran ist jedoch noch intakt und die Basalzellschicht zumindest noch residual erhalten. In Gewebeproben eines Prostatakarzinoms finden sich in Randbereichen oft HG-PIN-Anteile, jedoch entwickelt sich nicht aus jeder HG-PIN ein invasives Karzinom.

Histologisch zeigen Prostatakarzinome häufig ein buntes Muster. Es handelt sich um sog. pluriforme Karzinome. Um bei dieser morphologischen Vielfalt eine einheitliche prognostische Einordnung vornehmen zu können, hat sich in der Klinik der Gleason Score etabliert. Dieser ordnet die unterschiedlichen Wachstumsmuster nach ihrer Differenzierung - gut (Gleason-Muster 1) bis entdifferenziert (Gleason-Muster 5) - ein. Bei Resektaten der Prostata setzt sich der Gleason Score aus der Summe der Differenzierungsgrade der beiden häufigsten histologischen Muster innerhalb eines Karzinoms zusammen (minimal 2, maximal 10) [1]. Bei der histologischen Beurteilung von Stanz-Proben der Prostata wird das häufigste und aggressivste Muster zur prognostischen Einordnung herangezogen. Vor allem schlecht differenzierte Anteile bestimmen das biologische Verhalten des Tumors und damit die Prognose [5]. Außerdem besteht eine hohe Korrelation zwischen dem Tumolvolumen und seiner Aggressivität. Die zunächst lokalisierten, häufig auch multifokal auftretenden Karzinome, breiten sich per continuitatem in das umliegende Bindegewebe, die Samenbläschen, Blase und den Beckenboden aus. Die Metastasierung erfolgt lymphogen und später hamätogen, vor allem in Knochen (osteoblastische Metastasen), aber auch in Leber oder Lunge. Die Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms erfolgt anhand der allgemeingültigen TNM-Klassifikation [3].

Spezifische Risikofaktoren für die Entstehung des Prostatakarzinoms konnten bisher nicht ermittelt werden. Man geht von einem multifaktoriellen und mehrstufigen Geschehen aus. Neben sporadisch auftretenden Neoplasien gibt es auch beim Prostatakarzinom in seltenen Fällen hereditäre Formen mit unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen [3]. Neben einer positiven Familienanamnese ist das Alter der wichtigste Risikofaktor. Zudem variiert die Inzidenz je nach ethnischer Herkunft. Afroamerikanische Männer erkranken häufiger an malignen Neoplasien der Prostata als Männer der weißen Population. Dies wird auf erhöhte Testosteronspiegel zurückgeführt, die das Tumorwachstum fördern [5]. Östrogene wirken karzinomprotektiv [1].

Wie bereits erwähnt, bleiben Prostatakarzinome lange asymptomatisch und werden in frühen

Stadien entweder inzidentuell bei der operativen Entfernung einer benignen Prostatahyperplasie diagnostiziert oder im Rahmen der Früherkennungsuntersuchungen. Diese umfassen die digital-rektale Untersuchung, ggf. eine Sonographie sowie die PSA-Wert-Bestimmung. Das prostata-spezifische Antigen (PSA) ist eine Serin-Protease, die von Prostataepithelzellen produziert und ins Lumen sezerniert wird. Sie ist für die Verflüssigung des Ejakulats zuständig. Bei veränderter Prostatastruktur im Rahmen eines Karzinoms, aber auch einer benignen Prostatahyperplasie oder Entzündung, diffundiert vermehrt PSA in das Serum und kann dort nachgewiesen werden. Es liegen altersspezifische Grenzwerte vor, wobei grob ein PSA-Wert  $< 4$  ng/ml als normal gilt. Ab 10 ng/ml handelt es sich um hochpathologische Werte, die unbedingt histologisch, durch die Entnahme von Stanzbiopsien, abgeklärt werden sollten [2].

Die kurative Therapie des Prostatakarzinoms besteht in der Regel in der vollständigen operativen Entfernung. In frühen Tumorstadien kann alternativ auch eine Strahlentherapie perkutan oder lokal als sog. Brachytherapie Anwendung finden. Bei fortgeschrittener Erkrankung oder im Falle von Fernmetastasen wird eine Hormonentzugstherapie durchgeführt. Der Androgenentzug durch die Gabe von GnRH-Analoga, GnRH-Antagonisten oder Antiandrogenen hemmt das Testosteron-vermittelte Tumorwachstum. Dieser Effekt verschwindet jedoch sobald das Karzinom in ein androgenunabhängiges Stadium übergeht. Versagen die hormonellen Maßnahmen, kommt eine palliative Chemotherapie, in der Regel mit Taxanen, zum Einsatz [3].

Zur Abgrenzung aggressiver Tumore von nicht-aggressiven Formen werden Kriterien wie eine schlechte Tumordifferenzierung (Gleason Score 8-10), eine frühe Invasion von Nachbarorganen (z.B. der Samenblase) und ein frühzeitiger biochemischer Rückfall, gemessen am PSA-Level, herangezogen [6]. Auch bei der Risikostratifizierung von Frühkarzinomen, d.h. Karzinomen, die im Rahmen der Screeninguntersuchungen entdeckt werden, werden Prognosefaktoren wie der Gleason-Score, das Tumorstadium nach der TNM-Klassifikation, der Resektionsstatus (R0 (vollständig) bis R2 (makroskopische erkennbarer Tumorrest)) und die PSA-Konzentration angewandt [7, 8]. Sie lassen jedoch keine sichere Aussage über den weiteren Verlauf des Karzinoms zu und sind damit nur bedingt geeignet das notwendige Therapier regime festzulegen. Sichere prognostische Marker zur Einordnung der Frühkarzinome fehlen derzeit noch. Umso wichtiger ist es aussagekräftige molekulare Prognosemarker zu finden, um Patienten besser und risikoadjustiert behandeln zu können [9]. Ein bereits als solcher identifizierter Prognosefaktor ist Tiam1. Tiam1 ist ein Rac-spezifischer Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor und spielt eine wichtige Rolle bei der Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Tiam1 wird signifikant in Prostatakarzinomen und *high-grade* PIN im Vergleich zu normalem Prostataepithel überexprimiert [10]. Diese starke Tiam1-Überexpression ist auch in

der kumulativen Analyse statistisch signifikant mit einem herabgesetzten krankheitsfreien Überleben assoziiert. Tiam1 wäre somit als unabhängiger Prädiktor für ein Rezidiv des Prostatakarzinoms geeignet. Nach diesen Erkenntnissen sollten Patienten, in deren Tumoren starke Tiam1-Expressionen nachgewiesen werden, zukünftig einem aggressiveren Therapieregime zugeführt werden [10].

Molekulargenetisch geht man davon aus, dass die Kanzerogenese des Prostatakarzinoms ein mehrstufiger Prozess ist mit vielzähligen chromosomalen Aberrationen. Dabei spielen vor allem genetische Veränderungen der sog. Protoonkogene und Tumorsuppressorgene eine entscheidende Rolle. Protoonkogene sind zunächst normale zelluläre Gene, die für Proteine kodieren, die an der Regulation von Proliferation, Mobilität und Differenzierung der Zelle beteiligt sind. Infolge von Mutationen eines Protoonkogens entsteht ein sog. Onkoprotein, das aufgrund der Funktionsänderung durch die Mutation nun konstitutiv aktiviert wird, d.h. völlig unabhängig von den normalen zellulären Regulationsmechanismen. Man spricht auch vom sog. *gain of function* [1]. Neben der konstitutiven Aktivierung kann es außerdem durch die Mutation des Onkogens zur Überexpression des entsprechenden Onkoproteins kommen. Zu der Gruppe der Protoonkogene gehören neben Wachstumsfaktoren und Faktoren der Signaltransduktion auch Transkriptionsfaktoren, wie z.B. die Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren. Verschiedene Mutationen sind an der Aktivierung beteiligt, wie z.B. Amplifikation, d.h. die Vermehrung der Genkopieanzahl, Punktmutationen, z.B. Basenverlust oder -austausch, oder die chromosomale Translokation. Darunter versteht man die Verlagerung von ganzen Chromosomen oder Chromosomabschnitten innerhalb des Genoms [11]. Dabei können Chromosomenabschnitte an einer anderen Stelle des selben Chromosoms wieder eingebaut werden oder auf ein anderes homologes oder nicht-homologes Chromosom übertragen werden. Kommt es dabei zum gegenseitigen Austausch von DNA-Sequenzen zwischen zwei nicht-homologen Chromosomen spricht man auch von einer sog. reziproken Translokation [12]. Chromosomale Translokationen können entweder zur Überexpression des strukturell intakten Onkoproteins oder bei veränderter Chromosomenstruktur zu Fusionsgenen führen.

Tumorsuppressorgene sind ebenfalls normale zelluläre Gene, die für die Regulation des Zellwachstums, des Zellzyklus und des transkriptionalen Profils der Zelle verantwortlich sind. Sie haben dabei unterdrückende (supprimierende) Funktionen. Bei Verlust dieser Funktionen, dem sog. *loss of function*, durch z.B. Punktmutationen oder Deletion (Verlust von Chromosomenabschnitten und den darauf codierten Genen) kommt es zur Deregulation des Zellwachstums. Während Mutationen bereits eines Allels eines Protoonkogens Auswirkungen haben, müssen bei Tumorsuppressorgenen beide Allele mutiert sein, um zu einer Tumorprogression zu führen.

Ein wichtiger Vertreter der Tumorsuppressorgene ist das Gen p53, der sog. Hüter des Genoms [1, 13].

Zusammenfassend verändern Mutationen innerhalb der Protoonko- und Tumorsuppressorgene deren Funktion und führen schließlich zur Entartung der Zelle (sog. maligne Transformation), zu monoklonaler Expansion und Tumorprogression.

Neben diesen genetischen Veränderungen sind auch epigenetische Veränderungen, wie z.B. Hypo- oder Hypermethylierungen, im Prostatakarzinom bekannt. So führt beispielsweise eine Hypomethylierung des gesamten Genoms zu genetischer Instabilität. Diese Hypomethylierung ist mit einem aggressiven Tumorverhalten assoziiert [14].

Das Prostatakarzinom ist hinsichtlich seiner molekularen Veränderungen, seinem klinischen Verlauf und der Prognose ein sehr heterogener Tumor, was eine eindeutige Risikostratifizierung von Patienten und damit eine adäquate, auf die Biologie des Tumors abgestimmte Therapie erschwert. Der Erforschung der Tumorgenese des Prostatakarzinoms sowie den damit einhergehenden molekulargenetischen Veränderungen gilt deshalb seit langem große Aufmerksamkeit.

## 1.2 Die TMPRSS2-ERG-Fusionen

Im Zusammenhang mit der Erforschung der Tumorgenese des Prostatakarzinoms wurde eine Überexpression von ETS-Transkriptionsfaktoren in der Mehrzahl aller Prostatakarzinomfälle beobachtet [15]. Als Grund für diese Überexpression fand die Arbeitsgruppe um Tomlins et al. Genfusionen zwischen dem TMPRSS2-Gen und Mitgliedern der ETS-Transkriptionsfaktorfamilie [15]. Bisher kannte man klinisch und pathologisch relevante chromosomale Translokationen der ETS-Transkriptionsfaktoren nur in hämatopoietischen Erkrankungen oder Sarkomen, wie dem Ewing Sarkom, nicht aber in Karzinomen [16]. Es handelte sich um eine völlig neue Entdeckung in der Karzinogenese. Tomlins et al. fanden diese Fusionen in mehr als der Hälfte aller Prostatakarzinomfälle [15]. Die Häufigkeit der Fusion hat sich in weiteren Studien bestätigt, wobei die Prozentzahlen je nach Studie und angewandter Detektionsmethode zwischen 40 und 60% schwanken. Am häufigsten war das *ETS-Related-Gene* ERG an der TMPRSS2-ETS-Fusion beteiligt [15].

Bei dem TMPRSS2-Gen (NCBI-Datenbank NM\_005656) handelt es sich um die codierende Sequenz für eine prostataspezifische transmembrane Serin-Protease, die konstitutiv sowohl in normalem als auch in neoplastisch verändertem Prostatagewebe androgenabhängig exprimiert wird [15, 16]. Das ERG-Gen, *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (avian)* oder *ETS-Related-Gene* (NCBI-Datenbank NM\_004449), ist ein Protoonkogen beste-

hend aus 11 Exonen. Die funktionellen Domänen, wie die pointed (PNT) - bzw. die ETS-DNA-Bindungs-Domäne, finden sich in den Exonen 5/6 und 11 [17]. ERG als Mitglied der ETS-Transkriptionsfaktoren ist an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung, Stressantwort und Tumorgenese beteiligt. Es beeinflusst die Zellmitose und besitzt transformierende Eigenschaften [6]. Die Signaltransduktion verläuft über den MAPK-Signalweg. TMPRSS2 und ERG liegen in gleicher transkriptionaler Richtung auf Chromosom 21, ungefähr 3 Mb voneinander entfernt (TMPRSS2: 21q22.3 / ERG: 21q22.2) [17].

Es sind zahlreiche verschiedene Varianten der TMPRSS2-ERG-Fusion bekannt. Eine Übersicht zeigt Tab. 1.1.

Die meisten Fusionen schließen keine translationsrelevanten Bereiche des TMPRSS2-Gens ein. Somit kommt es in der Regel nicht zur Entstehung von Fusionsproteinen mit Ausnahme der Varianten, die das Exon 2 des TMPRSS2-Gens miteinbeziehen (vgl. Tab. 1.1, Fusionsvarianten Nr.11-14) [16]. Die unterschiedlichen Fusionsprodukte resultieren zum Einen aus verschiedenen genomischen Fusionen. Zum Anderen sind sie aber auch das Resultat von alternativem Spleißen, denn in vielen Tumoren wird mehr als ein Fusionsprodukt exprimiert [18].

Die weitaus häufigste Fusionsvariante mit ca. 88% ist die Fusion zwischen Exon 1 des TMPRSS2-Gens und Exon 4 des ERG-Gens (Fusionsvariante Nr.8, T1/E4), wobei die Bruchstellen innerhalb Intron 2 des TMPRSS2- und Intron 3 des ERG-Gens liegen [21]. Bei der chromosomalen Rekombination fusioniert der Promotor bzw. die Enhancer-Region des TMPRSS2-Gens am 5'-Ende mit Teilen des ERG-Gens. Es resultiert ein N-terminal trunkiertes ERG-Protein ( $\Delta$ N-ERG), das aus 462 Aminosäuren besteht (NP\_004440.1) und die entscheidenden funktionellen Domänen beinhaltet [16]. In Prostatakarzinomproben treten die Varianten T1/E4 und T1/E5 oftmals gemeinsam auf. Möglicherweise entstammen beide der gleichen genomischen Fusion und die Variabilität ist ein Resultat alternativen Spleißens [16, 19].

Der Zusammenhang zwischen den verschiedenen Fusionsvarianten und dem biologischen Verhalten des fusionsaufweisenden Karzinoms wurde in der Literatur wiederholt diskutiert. Besonders die Fusion zwischen Exon 2 des TMPRSS2-Gens und Exon 4 des ERG-Gens (T2/E4) ist mit einem aggressiven Verlauf assoziiert [18, 20]. Bei dieser Fusion beginnt die Translation am nativen Startcodon des TMPRSS2-Gens, das *in-frame* mit dem ERG-Gen fusioniert. Es entsteht ein Fusionsprotein. Die Fusionsvarianten T1/E2 bzw. T1/E3, die das native ERG-Translations-Initiationscodon - in Exon 3 lokalisiert - beinhalten, sind ebenfalls mit aggressivem Verhalten assoziiert, gemessen an erhöhtem Vorkommen von Samenblaseninvasionen und schlechterem Outcome nach radikaler Prostatektomie [18]. Wang et al. beobachteten, dass das Vorhandensein des nativen ERG-Startcodons in Exon 3 für die Aggressivität des

Tabelle 1.1: TMPRSS2-ERG-Fusionsvarianten (in Anlehnung an Tu et al. Tab.2 [16])

Nr.	TMPRSS2	ERG	Variante	Bemerkung
1	Exon 1	Exon 2	T1/E2	<i>full length</i> ERG Protein; aggressives Tumorverhalten [18]
2		Exon 2,3,4 & 6	T1/E234-6	<i>in-frame stop</i> durch <i>frame-shift</i> [19]
3		Exon 3	T1/E3	aggressives Tumorverhalten [18]
4		Exon 3 & 5	T1/E3-5	<i>in-frame stop</i> durch <i>frame-shift</i> [19]
5		Intron 3a	T1/E-int3a	
6	- Intron 1	Intron 3b	T1-int1/E-int3b	
7		Intron 3c	T1/E-int3c	
8		Exon 4	T1/E4	häufigste Fusionsvariante; $\Delta$ N-ERG (N-terminal trunkiertes ERG-Protein)
9		Exon 5	T1/E5	
10		Exon 6	T1/E6	
11	Exon 2	Exon 2	T2/E2	<i>in-frame stop</i> durch <i>frame-shift</i> [19]
12		Exon 3	T2/E3	
13		Exon 4	T2/E4	Fusionsprotein; aggressives Tumorverhalten [18, 20]
14		Exon 5	T2/E5	<i>in-frame stop</i> durch <i>frame-shift</i> [19]
15	Exon 3	Exon 4	T3/E4	<i>in-frame stop</i> durch <i>frame-shift</i> [19]
16	Exon 4	Exon 4	T4/E4	<i>in-frame stop</i> durch <i>frame-shift</i> [19]
17		Exon 5	T4/E5	<i>in-frame stop</i> durch <i>frame-shift</i> [19]
18	Exon 1 & 4	Exon 4	T1-4/E4	Verlust von Exon 2 und 3 im TMPRSS2-Gen durch alternatives Spleißen [16]
19		Exon 5	T1-4/E5	Verlust von Exon 2 und 3 im TMPRSS2-Gen durch alternatives Spleißen [16]
20	Exon 5	Exon 4	T5/E4	<i>in-frame stop</i> durch <i>frame-shift</i> [19]

Tumors verantwortlich sein muss. Zudem scheint nicht nur die Fusionsvariante, sondern auch das Expressionslevel Auswirkungen auf die Tumorprogression zu haben. Bei sehr starker Expression der T1/E4-Fusionsvariante ist diese ebenfalls mit aggressivem Tumorverhalten assoziiert, allerdings nie in dem Maße wie die Variante T2/E4 [18]. Die verstärkte Expression des Steroidrezeptor-Koaktivators1 unter Androgenstimulation führt zu höherer Tumoraggressivität, möglicherweise über die durch TMPRSS2 vermittelte ERG-Überexpression [18]. Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen Histopathologie und der chromosomalen Aberration disku-

tiert, denn in fusionstragenden Karzinomen fanden sich signifikant häufiger fokale intraluminale Mucinablagerungen [16]. Es besteht jedoch kein Zusammenhang mit dem Tumorstadium oder Gleason Score [16, 22, 23]. Auch die Arbeitsgruppe um Nam et al. untersuchte die prognostische Relevanz der TMPRSS2-ERG-Fusion in Prostatakarzinomen. Patienten mit Karzinomen in denen die Fusion nachweisbar war, wiesen ein signifikant erhöhtes Rezidivrisiko nach radikaler Prostatektomie auf. Sie stellten die Fusion als stärksten und signifikantesten Prognosefaktor für ein Rezidiv heraus, der eine bessere Risikobewertung von Patienten leisten könnte [7].

Zusammenfassend ist die Korrelation zwischen Aggressivität des Tumors und seiner Prognose und der Fusion bzw. den verschiedenen Varianten aufgrund der zum Teil sehr unterschiedlichen Beobachtungen der einzelnen Arbeitsgruppen noch nicht abschließend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen [16].

Durch die TMPRSS2-ERG-Fusion gelangt das ERG-Gen unter die Regulation des androgenregulierten Promotors des TMPRSS2-Gens. Dies führt zur androgenabhängigen Überexpression von ERG in fusionspositiven Prostatakarzinomen. Es handelt sich bei ERG um das am häufigsten überexprimierte Protoonkogen in malignem Prostatagewebe [6]. In nahezu allen Tumorproben, die eine ERG-Überexpression aufweisen, findet sich eine TMPRSS2-ERG-Fusionsvariante [15, 22]. Das für die Überexpression verantwortliche Enhancer-Element ist ein *'noncanonical androgenreceptor responsive element'* (ARE) und liegt 13,5 kb strangaufwärts des TMPRSS2-Startcodons. Es steht unter Androgenkontrolle und interagiert mit dem TMPRSS2-Promotor über chromosomale Schleifenbildung [24]. Im Prostatakarzinom existiert ein hierarchisch gegliedertes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren. GATA2 und Oct1 beispielsweise spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Transkription von TMPRSS2 bzw. des Fusionsprodukts und damit der androgenabhängigen Zellzyklusregulation im Prostatakarzinom [24].

Vor allem in androgenabhängigen Prostatakarzinomen scheint die TMPRSS2-ERG-Fusion von Bedeutung zu sein. Bei androgenunabhängigen Tumoren, Tumoren im Endstadium, kann eine Überexpression trotz vorhandener Fusion nicht detektiert werden. ERG scheint zu diesem Zeitpunkt keine Rolle mehr in der Tumorprogression zu spielen. Seine Funktion der Transkriptionsregulation geht auf Wildtyp-ETS-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. ETV4 oder FLI1, über, die in androgenunabhängigen Tumoren verstärkt exprimiert werden [21]. Yu et al. beschrieben im Verlauf eine mögliche Beteiligung von ERG selbst am Übergang zum androgenunabhängigen Tumorstadium. ERG stört an den Androgenrezeptor gebundene Signalwege über Hemmung der Androgenrezeptorexpression [25].

Als Fusionsmechanismen sind die Deletion und chromosomale Translokation beschrieben.

Die Fusion durch Deletion ist die weitaus häufigste Variante. Sowohl homozygote als auch hemizygoten Fusionen sind beschrieben [23]. Es sind verschiedene Bruchstellen innerhalb der Introns des TMPRSS2- und ERG-Gens bekannt, so dass das Ausmaß der Deletion variabel ist [16, 22, 23]. In den jeweiligen Introns wurden untereinander sowie mit Alu-Sequenzen übereinstimmende DNA-Abschnitte gefunden [23]. Alu-Sequenzen sind repetitive Sequenzen innerhalb des menschlichen Genoms. Es wurde bereits für andere repetitive Sequenzen, wie beispielweise LINE-1, beschrieben, dass sie durch Demethylierung eine genetische Instabilität mit vermehrt auftretenden Chromosomenbrüchen, Deletionen oder Amplifikationen hervorrufen [14]. Das Vorkommen von Alu- und anderen repetitiven Sequenzen innerhalb der Introns von TMPRSS2 und ERG könnte demnach mit dem Auftreten der TMPRSS2-ERG-Fusion innerhalb des jeweiligen Genoms zusammenhängen [23]. Es wird außerdem ein insuffizientes DNA-Reparatur-System als Ursache der TMPRSS2-ETS-Fusionen diskutiert. Im Prostatakarzinom wurden Defekte im POLI- und ESCO1-Gen gefunden, die zum Austausch von Aminosäuren in der Proteinsequenz führen. Ein Funktionsverlust dieser Proteine führt zu vermehrt auftretenden Chromosomenbrüchen bzw. fehlerhaft reparierten Chromosomen und dadurch zu einer erhöhten Rate an chromosomalen Aberrationen [26]. Der Arbeitsgruppe um Bastus et al. gelang über Androgenexposition von malignen und benignen fusionsnegativen Prostataepithelzellen die Induktion der TMPRSS2-ERG-Fusion [27]. Dies wirft die Frage nach erhöhten Androgenspiegeln als Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms auf. In zahlreichen Studien wurden die Auswirkungen der Deletion im Rahmen der Genfusion untersucht. Perner et al. beobachteten, dass die Fusion durch Deletion mit höherem Tumorstadium, Tumorprogression und Metastasierung assoziiert ist [22]. Durch die Mikrodeletion auf dem Chromosom 21 kommt es möglicherweise zum Verlust von DNA-Material. Dies resultiert in einer Haploinsuffizienz der Gene, die innerhalb der 3 Mb zwischen dem TMPRSS2- und ERG-Gen liegen. Ein Beispiel für die Gen-Haploinsuffizienz ist das HMGN1-Gen. Es ist unter anderem für den Zellzusammenhalt und Zell-Zell-Kontakte wichtig [17]. HMGN1-knockout-Mäuse zeigen eine gesteigerte N-Cadherin-Expression auf, was ein Charakteristikum für ein *high-grade* Prostatakarzinom ist. Andererseits fanden Liu et al. in ihrer Arbeit keinen Genverlust, mit Ausnahme von MX1. Möglicherweise gehen die innerhalb der Deletionsregion liegenden Gene nicht verloren, sondern werden transloziert, so dass sie bezogen auf das gesamte Genom erhalten bleiben [23].

Die TMPRSS2-ERG-Fusion findet frühzeitig während der Übergangsphase der HG-PIN in ein invasives Karzinom statt. Sie findet sich nahezu ausschließlich in invasiven Karzinomzellen und dann durchweg in allen Zellen. In HG-PIN-Zellen kann sie wesentlich seltener detektiert

werden und dann nur benachbart zu Karzinomarealen, die die Fusion aufweisen. Möglicherweise initiiert die TMPRSS2-ERG-Fusion den Übergang in ein invasives Wachstum oder aber sie beschleunigt den Wandel der molekulargenetisch sehr vielfältigen HG-PIN hin zum invasiven Karzinom [28]. In ein und demselben Karzinom können sich an unterschiedlichen Stellen unterschiedliche Fusionstypen entwickeln [19]. Die Fusionen scheinen demnach unabhängig voneinander während der klonalen Tumorexpansion zu entstehen [17].

Hinsichtlich der Risikostratifizierung der Patienten bleiben eindeutige Zusammenhänge zwischen dem Fusionsstatus und bisher angewandten Klassifikationskriterien unklar. In neueren Studien zeigte sich in Prostatakarzinomen, die die TMPRSS2-ERG-Fusion trugen, ein niedriger Gleason Score ohne Hinweise für *high-grade* Morphologien. Wohingegen eine erhöhte Anzahl an Genkopien der TMPRSS2-ERG-Region mit oder ohne chromosomales Rearrangement mit einem hohen Gleason Score assoziiert war [29].

Unter Berücksichtigung der hohen Inzidenz des Prostatakarzinoms ist die Fusion des TMPRSS2-Gens mit Mitgliedern der ETS-Transkriptionsfaktorfamilie, v.a. mit dem ERG-Gen, die häufigste molekulare Veränderung in humanen malignen Neoplasien der Prostata [15]. Ein besseres Verständnis dieser Fusion und ihrer Auswirkungen könnte das Verständnis der Biologie des Prostatakarzinoms deutlich verbessern.

Die während der Entstehung der vorliegenden Arbeit publizierten Ergebnisse zu den Auswirkungen der TMPRSS2-ERG-Fusion und der daraus resultierenden Überexpression von ERG im Prostatakarzinom, die in engerem Zusammenhang zu den Ergebnissen dieser Arbeit stehen, werden in Kap. 4 ausführlich dargestellt und diskutiert.

### 1.3 Das Ziel dieser Arbeit

Die eigentliche Rolle des  $\Delta$ N-ERG-Proteins - resultierend aus der häufigsten Fusionsvariante T1/E4 - in Bezug auf onkogene Transformation, Invasion, Migration oder Proliferation bzw. Tumorprogression war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit noch völlig unklar. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Auswirkungen der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Verhalten transfizierter Zellen im *in-vitro*-Modell anhand verschiedener funktioneller und analytischer Assays. Hierfür sollte zunächst die T1/E4-Fusionsvariante in einen Expressionsvektor kloniert und anschließend transfiziert werden. Anhand der transfizierten Zelllinien sollten dann die Funktionsuntersuchungen zu Invasions- und Migrationsverhalten, Zellproliferation sowie onkogener Transformation durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius AG	Göttingen
Autoklav	Systec	Wettenberg
Brutschrank	Heraeus Instruments	Osterode
Feinwaage	Sartorius AG	Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Leitz/Leica	Wetzlar
Gelelektrophoresekammer	PEQLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Inkubationsroller RM5	CAT Zipperer GmbH	Staufen
Inkubationsschüttler 3033	GFL	Burgwedel
Inkubationsschüttler innova 2000	New Brunswick Scientific	Wesseling-Berzdorf
LightCycler	Roche	Mannheim
Magnetrührer MR 3001	Heidolph	Schwabach
Microplate Reader Model 680	Biorad	München
Mikroskop Labovert FS	Leitz/Leica	Wetzlar
Mikrowelle Micromat	AEG	Nürnberg
Mixing Block MB-102	BIOER	Hangzhou, China
Nucleofector®	Lonza Cologne AG	Köln
Odyssey Infrared Imaging System	LICOR Biosciences	Bad Homburg
PCR-Gerät FlexCycler	Analytik Jena AG	Jena
pH-Meter	HANNA instruments	Padova, Italien
Photometer	Eppendorf	Hamburg
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Pipettboy	Integra Biosciences GmbH	Fernwald
Stericycle CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Electron Corporation	Karlsruhe

Tischautoklav Typ 26	Melag	Berlin
Ultraschallgerät Sonifier	Bandelin electronics	Berlin
UV-Crosslinker	Spectronics Corporation	Lincoln, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia N.Y., USA
Wasserbad	Fisher & Rintelen GmbH	Essen
Western Blot Anlage	Hoefer	Holliston, USA
Western Blot Kammer	Biorad	München
Zentrifuge Megafuge 1,0R	Heraeus Sepatech	Osterode
Zentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Agarplatten	TPP	Trasadingen, Schweiz
Amicon Ultra 10000	Milipore	Bedford, USA
Deckgläser	Engelbrecht	Edermünde
Reaktionsgefäße (0,5-2,0 ml)	Sarstedt	Nümbrecht
Falcon Tubes	Greiner	Frickenhausen
Glaspipetten	Roth	Karlsruhe
Halbmikroküvetten UVette	Eppendorf	Hamburg
LightCycler Kapillaren	Biobudget	Krefeld
Nitrozellulosemembran	Whatman GmbH	Dassel
Objektträger	Metzel Gläser	Braunschweig
Parafilm	American National Can TM	Chicago, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym	Oldendorf
Pipettenspitzen	Biozym	Oldendorf
	Starlab	Ahrensburg
Plastikküvetten	Sarstedt	Nümbrecht
Plastikpipetten	Corning	New York, USA
Sterilfilter	Sartorius/vivascience AG	Hannover
Transwellmembranen	Greiner	Frickenhausen
well-Platten	TPP	Trasadingen, Schweiz
Whatman Papier	Whatman GmbH	Dassel

---

Zellkulturflaschen	Greiner Bio One GmbH	Frickenhausen
Zellkulturschalen	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellsiebe	Falcon	Heidelberg

### 2.1.3 Chemikalien

Sofern in dieser Arbeit nicht gesondert vermerkt, wurden die Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Gibco BRL / Invitrogen (Darmstadt) und BD Biosciences (Heidelberg) verwendet.

### 2.1.4 Datenbanken

- [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)
- [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)
- [www.ecoliwiki.net](http://www.ecoliwiki.net)
- [www.restrictionmapper.org](http://www.restrictionmapper.org)

### 2.1.5 Software

- Chromas Lite (Sequenzierungsauswertung)
- Leica Application Suite (Mikroskop-Fotos)
- MTT-Software: Microplate
- SPSS Version 20

### 2.1.6 Oligonukleotide

Die in der Tab. 2.1 aufgeführten Oligonukleotide wurden in den Experimenten dieser Arbeit eingesetzt.

Tabelle 2.1: Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Konz.	Tm	Sequenz 5'→3'
205	GAPDH qPCR fwd	100 $\mu$ M	51 °C	CATGTTCCAATATGATTCCACC
206	GAPDH qPCR rev	100 $\mu$ M	50 °C	GATGGGATTTCCATTGATGAC
207	pLZRS MCS fwd	100 $\mu$ M	54 °C	TGGACCATCCTCTAGACTGC
208	pLZRS MCS rev	100 $\mu$ M	50 °C	ACCGGCCTTATTCCAAGC
471	myc-ERGa fwd EcoR V	100 $\mu$ M	>75 °C	ATCGATATCATGGAGCAGAAGCTGATC TCCGAGGAGGACCTGATGACCGCGT CCTCCTCCA
472	ERGa rev Xho I	100 $\mu$ M	70,7 °C	CCGCTCGAGTTAGTAGTAAGTGCCCA GATGAGAA
477	ERGa fwd Sal I	100 $\mu$ M	55 °C	ATCTGTGACCATGACCGCGTCC TCCT- CCA
498	GAPDH-qPCR fwd 2	100 $\mu$ M	56 °C	AGGTGAAGGTCGGAGTCA
499	GAPDH-qPCR rev 2	100 $\mu$ M	51,4 °C	GGTCATTGATGGCAACAA
540	ERG	100 $\mu$ M	64,2 °C	GCTAAGACAGAGATGACCGCGTC
541	ERG	100 $\mu$ M	58,4 °C	TAGTAGTAAGTGCCAGATGAG
556	ERGa fwd B	100 $\mu$ M	57,6 °C	AGATGACCGCGTCTCTCC
557	ERGa rev B	100 $\mu$ M	58,9 °C	TTAGTAGTAAGTGCCAGATGAG
558	ERGa fwd C Sal I	100 $\mu$ M	71 °C	ATCGTCGACGATGACCGCGTCTCTCTC
559	ERGa rev C Not I	100 $\mu$ M	72 °C	ATGCGGCCGCTTAGTAGTAAGTGCCC AGATGAG
575	HA-ERG RT fwd	100 $\mu$ M	58,4 °C	CATACGATGTTCCAGATTACGC
576	HA-ERG RT rev	100 $\mu$ M	61,8 °C	GTCAGTCCATAGTCGCTGGAG
577	ERG RT fwd	100 $\mu$ M	59,4 °C	CTAGCCAGGTGAATGGCTCA
578	ERG RT rev	100 $\mu$ M	58,2 °C	GGCACGATAACTCTGCGC
584	ERGQuickA fwd	100 $\mu$ M	69,5 °C	GTTCTAGAAAGATGCTACACAGAGATG ACCGCG
585	ERGQuickA rev	100 $\mu$ M	69,5 °C	CGCGGTCATCTCTGTGTAGCATCTTTC TAGAAC
588	ERGQuickA II fwd Lwe I	100 $\mu$ M	71,7 °C	CTAGTTCTAGAAAGGTGCTACAC AGA- GATGACCGCG
589	ERGQuickA II rev Lwe I	100 $\mu$ M	71,7 °C	CGCGGTCATCTCTGTGTAGCACC TTTC- TAGAACTAG

### 2.1.7 Vektoren und Plasmidkonstrukte

Die in Tab. 2.2 und Tab. 2.3 aufgeführten Vektoren und Plasmidkonstrukte wurden in dieser Arbeit eingesetzt.

Tabelle 2.2: Vektoren

Nr.	Bezeichnung	Herkunft
1327	pMV0	John Collard, Amsterdam (NL)
2025	pLZRS-IRES-zeo	John Collard, Amsterdam (NL)
3068	pLZRS bsd	John Collard, Amsterdam (NL)
3129	pCDNA3.1 zeo	John Collard, Amsterdam (NL)
	pJet1.2	CloneJET <sup>TM</sup> PCR Cloning Kit, Fermentas

Tabelle 2.3: Plasmidkonstrukte

Nr.	Bezeichnung	Herkunft / Bemerkung
1386	beta-Gal in pCMV	John Collard, Amsterdam / Einsatz in der $\beta$ -Gal-Färbung
2016	beta-Gal pLZRS-Neo	John Collard, Amsterdam / Einsatz in der $\beta$ -Gal-Färbung
2254	GST-PAKpGex	John Collard, Amsterdam / Einsatz im Rac-Aktivitätsassay
3134	$\Delta$ N-ERGa in pJet1.2	Resultat der Klonierung von $\Delta$ N-ERG in den pJet1.2-Vektor des CloneJET <sup>TM</sup> PCR Cloning Kit, Fermentas
3135	$\Delta$ N-ERGa in pMax	zur Verfügung gestellt von Klezovitch et al. [30]
3136	$\Delta$ N-ERGa in pMV0	Resultat der Umklonierung des Plasmids Nr.3134
3137	$\Delta$ N-ERG in pCDNA3.1 zeo	Resultat der Umklonierung des Plasmids Nr.3136
3142	$\Delta$ N-ERG in pCDNA3.1 zeo	Resultat der <i>in-vitro</i> Mutagenese des Konstrukts Nr.3137 mit intaktem HA-Tag
	pMax-GFP	Amaya <sup>®</sup> Cell Line Nucleofector <sup>®</sup> Kit R, Lonza Cologne GmbH

### 2.1.8 Antikörper

#### Primärantikörper

Die Primärantikörper, die für die Western Blots eingesetzt wurden (vgl. Tab. 2.4), wurden jeweils in Blockingpuffer (TBST mit 3 % Magermilchpulver und 1 % BSA) verdünnt, mit Ausnahme des Erg-Antikörpers. Dieser wurde in 5%iger Milch verdünnt. Für die Immunfluoreszenz wurde der  $\beta$ -Catenin-Antikörper in sterilem PBS verdünnt.

Tabelle 2.4: Primärantikörper

Name	Beschreibung	Firma	Konz.
<b>Westernblot:</b>			
anti- $\alpha$ -Tubulin	monoklonal, anti-mouse	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	1:4000 - 1:8000
Erg - 1/2/3 (C-20) sc-353	polyklonal, anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidel- berg	1:500
anti-TIMP-1 BP858	anti-rabbit	Acris GmbH, Herford	1:500
anti-TIMP-2 (3A4) sc21735	monoklonal, anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology, Heidel- berg	1:200
anti-E-Cadherin	anti-mouse	Novacastra, Wetzlar	1:300
anti-beta-Catenin	anti-rabbit	BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:1000
anti-Tiam1 (C-16) sc-872	polyklonal, anti-rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidel- berg	1:200
anti-rac1 Mab	monoklonal, anti-mouse	BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:1000
<b>Immunfluoreszenz:</b>			
anti-beta-Catenin	anti-rabbit	BD Transduction Laboratories, Heidelberg	1:50

### Sekundärantikörper

Für die Western Blots wurden die in Tab. 2.5 aufgeführten Sekundärantikörper in Blockingpuffer (TBST mit 3 % Magermilchpulver und 1 % BSA) verdünnt.

Tabelle 2.5: Sekundärantikörper

Name		Firma	Konz.
IRDye® anti-mouse-AK 680nm	polyklonal, Ziege	LI-COR® Biotechnology GmbH, Bad Homburg	1:10000
IRDye® anti-mouse-AK 800nm	polyklonal, Ziege	LI-COR® Biotechnology GmbH, Bad Homburg	1:10000
IRDye® anti-rabbit-AK 680nm	polyklonal, Ziege	LI-COR® Biotechnology GmbH, Bad Homburg	1:10000
IRDye® anti-rabbit-AK 800nm	polyklonal, Ziege	LI-COR® Biotechnology GmbH, Bad Homburg	1:10000

### 2.1.9 Größenstandards

#### DNA-Längenstandard:

100bp DNA Ladder plus (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot)

#### Protein-Molekulargewichtsstandard:

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

### 2.1.10 Molekularbiologische Kits

Amaya <sup>®</sup> Cell Line Nucleofector <sup>®</sup> Kit R	Lonza Cologne GmbH	Köln
CloneJET <sup>TM</sup> PCR Cloning Kit	Fermentas	St.Leon-Rot
DNA Clean & Concentrate <sup>TM</sup> 5 -Kit	Zymo Research	Kalifornien, USA
Omniscript Reverse Transcription Kit	Qiagen	Hilden
Platinum <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden

### 2.1.11 Enzyme

DNase I	Qiagen	Hilden
Dream-Taq-Polymerase	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Pfu-Polymerase	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
PhusionTaq	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main
RNase	Qiagen	Hilden
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main
	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	Qiagen	Hilden
SAP Enzym	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
SYBR Green Polymerase	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Qiagen	Hilden

Die zugehörigen Puffer wurden von den jeweiligen Firmen bezogen.

### 2.1.12 Bakterienstämme

#### DH5 $\alpha$

Es wurde der kompetente E.coli-Stamm DH5 $\alpha$  mit dem chromosomalen Genotyp *fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44*  $\Phi$ 80 $\Delta$ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* eingesetzt.

### 2.1.13 Zelllinien

Mithilfe folgender Zelllinien wurden die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Assays durchgeführt:

- **BPH1**: humane benigne Prostatahyperplasie; Prostataepithelzellen eines 68jährigen Mannes mit benigner Prostatahyperplasie; Immortalisierung der Zellen mit SV-40 T-Antigen. Expression der Zytokine 8, 18, und 19 sind beschrieben, außerdem die Metabolisierung von prostatistischen Androgenen. (Referenz: Hayward et al. [31])
- **HEK293**: humane embryonale durch das Adenovirus Typ 5 transformierte Nierenzellen (Referenz: Graham et al. [32])
- **NCI-H660**: humanes extrapulmonales kleinzelliges Karzinom; isoliert aus einer Lymphknoten-Metastase; Androgenrezeptor negativ; trägt biallelisch *TMPRSS2-ERG*-Fusion (Referenz: Mertz et al. [33])
- **LNCaP**: humanes Prostatakarzinom; 1977 aus einer linksseitigen supraklavikulären Lymphknoten-Metastase eines 50jährigen Mannes mit einem Prostatakarzinom isoliert. LNCaP-Zellen sind androgensensibel. (Referenz: Horoszewicz et al. [34])
- **PC3**: humanes Prostatakarzinom; isoliert postmortem aus einer Knochenmark-Metastase eines 62jährigen Kaukasiers mit Prostatakarzinom Grade IV nach Androgensuppressionstherapie (Kaighn et al. [35])

### 2.1.14 Transfektionsreagenzien

Für die Transfektion von humanen BPH1-Zellen wurden die im Folgenden aufgelisteten Transfektionsreagenzien verwendet.

FuGENE® 6 <i>Transfection Reagent</i>	Roche	Mannheim
GeneJuice® <i>Transfection Reagent</i>	Novagen® Merck KGaA	Darmstadt
TurboFect™ Reagenz	Fermentas	St.Leon-Rot
SuperFect® <i>Transfection Reagent</i>	Qiagen	Hilden
Lipofectamin™ Reagenz	Invitrogen	Darmstadt

### 2.1.15 Medien, Puffer, Lösungen

#### Zellkultur:

Die Grundmedien RPMI, DMEM sowie Optimem wurden von der Firma Gibco BRL / Invitrogen (Darmstadt) bezogen. PBS stammte von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen).

Die Zusammensetzungen der spezifischen Medien für humane BPH1- sowie für HEK293-Zellen sind Tab. 2.6 und Tab. 2.7 zu entnehmen. Für die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen wurde dem BPH1- bzw. dem HEK293-Medium jeweils Zeocin hinzugefügt, in einer Endkonzentration von 250 µg/ml.

*Tabelle 2.6: Medium für humane BPH1-Zellen*

Komponente	Endkonzentration
foetales Kälberserum (FCS)	5 %
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
L-Glutamin	2 mM
RPMI	ad 500 ml

*Tabelle 2.7: Medium für HEK293-Zellen*

Komponente	Endkonzentration
hitzeinaktiviertes FCS	10 %
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
L-Glutamin	2 mM
Hepes	1 M
DMEM	ad 500 ml

In Tab. 2.8 ist die Zusammensetzung des 2 x HEBS-Puffer (pH 7,05) für die Transfektion von HEK293-Zellen dargestellt.

*Tabelle 2.8: 2 x HEBS-Puffer (pH 7,05)*

Komponente	Endkonzentration
NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
Dextrose	12 mM
Hepes	50 mM

### **Bakterienmedien:**

Als Bakterienmedien wurden in dieser Arbeit das LB-Medium bzw. der LB-Agar wie unten dargestellt verwendet. Das LB-Medium und der LB-Agar wurden zur Sterilisation autoklaviert. Je nach Bedarf wurde das Antibiotikum Ampicillin in das abgekühlte Medium bzw. den abgekühlten Agar in einer Konzentration von 1:1000 gegeben.

**LB-Medium:** 20 g LB Broth (Sigma-Aldrich) ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

**LB-Agar:** 35 g Luria Agar Base (Sigma-Aldrich) ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

### **Agarosegelelektrophorese:**

Der 6 x Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese wurde von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

Tab. 2.9 zeigt die Zusammensetzung des verwendeten 50 x TAE-Puffers. Als Gebrauchslösung wurde der Puffer einfach (Verdünnung 1:50) eingesetzt.

*Tabelle 2.9: 50 x TAE-Puffer*

Komponente	Mengenangabe
Tris	252 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

**Western Blot:**

Tab. 2.10 zeigt die Zusammensetzung des Ripa-Lysepuffers (pH 7,4). Die Proteaseinhibitor-Lösung complete der Firma Roche (Mannheim) wurde vor Gebrauch des Lysepuffers frisch hinzugefügt. Zur Herstellung der Proteaseinhibitor-Lösung wurde eine Tablette complete EASY-packs in 1,5 ml dH<sub>2</sub>O aufgelöst. Die Lagerung des Lysepuffers erfolgte bei 4 °C, die der angesetzten Proteaseinhibitor-Lösung bei -20 °C.

Der Ripa-Lysepuffer wurde standardmäßig zur Herstellung von Proteinlysaten verwendet. Zum Nachweis der  $\beta$ -Catenin-Expression mittels Western Blot wurde der in Tab. 2.11 dargestellte Lysepuffer eingesetzt.

*Tabelle 2.10: Ripa-Lysepuffer (pH 7,4)*

Komponente	Endkonzentration
Tris-Base	50 mM
NaCl	150 mM
Na-Desoxycolat	0,5 %
SDS	0,1 %
Triton X-100	1 %
Proteaseinhibitor complete	1:25

*Tabelle 2.11: Lysepuffer für  $\beta$ -Catenin-Proteinlysate*

Komponente	Endkonzentration
SDS 10 %	1 %
Tris 1 M pH 7,5	10 mM
EDTA 0,5 M	2 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

Den Tabellen 2.12 und 2.13 sind die Zusammensetzungen der für die Western Blots verwendeten Sammel- und Trenngelge zu entnehmen. Tab. 2.14 zeigt den verwendeten Ladepuffer.

*Tabelle 2.12: Sammelgel*

Komponente	Volumen
dH <sub>2</sub> O	3,4 ml
PAA 30 %	0,83 ml
Tris 1,5 M pH 6,8	0,63 ml
SDS 10 %	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
APS 10 %	50 $\mu$ l
gesamt	5 ml

*Tabelle 2.13: Trenngel*

Komponente	6%iges Gel	8%iges Gel	12%iges Gel
dH <sub>2</sub> O	5,3 ml	4,6 ml	3,3 ml
PAA 30 %	2,0 ml	2,7 ml	4,0 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10 %	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
APS 10 %	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
gesamt	10 ml	10 ml	10 ml

*Tabelle 2.14: 6 x SDS-Ladepuffer*

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Glycerol	6 ml	60 %
1 M Tris pH 6,8	3 ml	300 mM
0,5 M EDTA	240 $\mu$ l	12 mM
SDS	1,2 g	12 %
2-Mercaptoethanol	600 $\mu$ l	864 mM
Bromphenolblau	Spatelspitze	0,05 %
gesamt	10 ml	

In den Tabellen 2.15 - 2.18 sind die Elektrophorese-, Transfer- und Waschpuffer dargestellt. Als Blockingpuffer wurde dem TBST-Waschpuffer 3 % Magermilchpulver und 1 % BSA zugesetzt.

*Tabelle 2.15: Elektrophoresepuffer*

Komponente	Menge
Tris Base	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

*Tabelle 2.16: Transferpuffer*

Komponente	Menge
Tris Base	6,06 g
Glycin	28,8 g
Methanol	400 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 2 l

*Tabelle 2.17: Waschpuffer TBS*

Komponente	Volumen
1 M Tris pH 7,5	10 ml
5 M NaCl	30 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

*Tabelle 2.18: Waschpuffer TBST*

Komponente	Volumen
1 M Tris pH 7,5	10 ml
5 M NaCl	30 ml
Tween 20	1 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 1 l

**Zymographie:**

Im Folgenden sind die benötigten Puffer und Lösungen für die Zymographie dargestellt.

Tab. 2.19 zeigt die Zusammensetzung des 2 x Ladepuffers, Tab. 2.20 die des 8%igen Trenngels.

*Tabelle 2.19: 2 x Ladepuffer für die Zymographie*

Komponente	Volumen
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,5 ml
SDS 10 %	4,0 ml
Glycerol	2,0 ml
Bromphenolblau	einige Körnchen
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

*Tabelle 2.20: 8%iges Trenngel für die Zymographie*

Komponente	Volumen
Gelatine 1 %	2 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 ml
PAA 30 %	2,7 ml
SDS 10 %	100 $\mu$ l
APS 10 %	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 10 ml

In den Tabellen 2.21 - 2.23 sind die Zusammensetzungen des Reaktionspuffers, der Färb- und Entfärbelösung dargestellt.

*Tabelle 2.21: Zymographie-Reaktionspuffer*

Komponente	Endkonzentration
Tris-HCl pH 7,5	0,05 M
NaCl	0,02 M
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
Brij-35	0,02 %

Tabelle 2.22: Zymographie-Färbelösung

Komponente	Endkonzentration
Methanol	30 %
Eisessig	10 %
Coomassie Blue R 250 (gefiltrert)	0,25 %
dH <sub>2</sub> O	59,75 %

Tabelle 2.23: Zymographie-Entfärbelösung

Komponente	Endkonzentration
Methanol	30 %
Eisessig	10 %
dH <sub>2</sub> O	60 %

 **$\beta$ -Gal-Färbung:**

Die Zusammensetzungen der für die  $\beta$ -Gal-Färbung verwendeten Fixier- und Färbelösungen sind der Tab. 2.24 sowie der Tab. 2.25 zu entnehmen.

Tabelle 2.24: Fixierlösung  $\beta$ -Gal-Färbung

Komponente	Endkonzentration
Formaldehyd 37 %	2 %
Glutaraldehyd 25 %	0,2 %
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Tabelle 2.25: Färbelösung  $\beta$ -Gal-Färbung

Komponente	Volumen	Endkonzentration
X-Gal 1 mg/ml	1,22 ml	0,061 mg/ml
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 5 mM	1 ml	0,25 mM
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 5 mM	1 ml	0,25 mM
MgCl <sub>2</sub> 2 mM	0,04 ml	0,004 mM
dH <sub>2</sub> O	ad 20 ml	

**Migrations- und Matrigel-Invasions-Assay:**

Für die Herstellung von konditioniertem Medium wurden 80 % konfluente COS-7 Zellen mit je 25 ml Optimem-Medium für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurde das Medium abgenommen und bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Die Lagerung erfolgte aliquotiert bei -20 °C.

**Rac-Aktivitätsassay:**

Für den Rac-Aktivitätsassay wurde der in Tab. 2.26 dargestellte Bakterienlysepuffer verwendet. Die Proteaseinhibitor-Lösung complete der Firma Roche (Mannheim) wurde vor Gebrauch des Lysepuffers frisch hinzugefügt. Zur Herstellung der Proteaseinhibitor-Lösung wurde eine Tablette complete EASYpacks in 1,5 ml dH<sub>2</sub>O aufgelöst. Die Lagerung des Lysepuffers erfolgte bei 4 °C, die der angesetzten Proteaseinhibitor-Lösung bei -20 °C.

*Tabelle 2.26: Bakterienlysepuffer*

Komponente	Volumen
1 M Tris pH 8,0	10 ml
1 M Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	40 µl
1 M MgCl <sub>2</sub>	400 µl
1 M DTT	400 µl
Sucrose	40 g
Glycerol 87 %	23 g
Proteaseinhibitor complete	1:25
dH <sub>2</sub> O	ad 200 ml

Tab. 2.27 zeigt die Zusammensetzung des GST-Fish-Puffers. Vor Gebrauch des Puffers erfolgte die Zugabe von Proteaseinhibitor complete [1:25] und PMSF.

*Tabelle 2.27: GST-Fish-Puffer*

Komponente	Endkonzentration
Tris pH 7,5	50 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	150 mM
Triton X-100	1 %
SDS	0,1 %

**Softagar-Assay:**

Für die Durchführung des Softagar-Assays wurden der *baselayer* sowie der *toplayer* wie in den Tabellen 2.28 und 2.29 aufgeführt hergestellt. Tab. 2.30 zeigt die Zusammensetzung des 2 x konzentrierten Mediums.

*Tabelle 2.28: baselayer (Volumen ausreichend für sechs 6-wells)*

Komponente	Volumen
2 x konz. Medium	9,5 ml
Agarose 1,25 %	8 ml
FCS hia 5 %	1 ml
steriles dH <sub>2</sub> O	ad 20 ml

*Tabelle 2.29: toplayer (Volumen pro 6-well)*

Komponente	Volumen
2 x konz. Medium	280 $\mu$ l
Agarose 1,25 %	280 $\mu$ l
FCS hia 5 %	43 $\mu$ l
Zellsuspension	257 $\mu$ l
gesamt	869 $\mu$ l

*Tabelle 2.30: 2 x konzentriertes Medium*

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 x RPMI	20 ml	2 x
L- Glutamin	2 ml	4 mM
Pen/Strep	2 ml	2 %
NaHCO	2 ml	2 g/l
steriles dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 RNA-Isolierung

#### RNA-Isolierung aus Prostatagewebe

Die RNA wurde aus Kryogewebe verschiedener Prostatatumore (T724, T727, T745, T772 und T21005) isoliert und für die vorliegende Arbeit vom Labor zur Verfügung gestellt. Die Probe T21005 war Ausgangspunkt der Amplifikation des TMPRSS2-ERG-Fusionsprodukts, welches für die Klonierung und die anschließenden Transfektionen eingesetzt wurde.

#### RNA-Isolierung aus transfizierten Zellen

Totale RNA aus Grundzelllinien und transfizierten humanen Zellen wurde mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben und Empfehlungen des Herstellers mit den im Kit enthaltenen Puffern und Enzymen. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen zur RNA-Präparation durch Zugabe von dem im Kit enthaltenen RLT-Puffer lysiert. Das Lysat wurde mithilfe des QIAshredders homogenisiert. Dieser führte außerdem zum vollständigen Aufschluss aller Zellwände und Plasmamembranen, so dass alle in den Zellen und ihren Kompartimenten enthaltenen RNA-Moleküle freigesetzt wurden. Das Funktionsprinzip der Säule beruht auf den spezifischen Bindungseigenschaften einer Silika-Membran, die selektiv Nukleinsäuren bindet und sich diese somit aus dem eingesetzten Zelllysate isolieren lassen [36]. Zusätzlich wurde ein *on-column*-DNA-Verdau mithilfe des RNase-free DNase Set nach den Herstellerangaben durchgeführt. Abschließend erfolgte die Elution mit 30  $\mu$ l RNase freiem Wasser. Die Reinheit und Konzentration der RNA wurde mithilfe des Photometers bestimmt und die präparierte RNA bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2 Reverse Transkription

Zur weiteren Verwendung der RNA wurde eine Reverse Transkription durchgeführt. Bei dem dabei eingesetzten Enzym, der Reversen Transkriptase, handelt es sich um eine RNA-abhängige-DNA-Polymerase, die ursprünglich in Viren entdeckt wurde. Durch ihren Einsatz lässt sich die aus verschiedenen Geweben oder Zellen isolierte RNA in sog. komplementäre DNA (cDNA) umschreiben (= Reverse Transkription). cDNA ist häufige Ausgangssubstanz vieler Reaktionen, wie z.B. der qualitativen oder quantitativen Polymerase-Kettenreaktion [37]. Die RNA wurde mithilfe des Omniscript Reverse Transcription Kits (Qiagen, Hilden) mithilfe der beigefügten Reagenzien und Enzyme transkribiert. Der Reaktionsansatz wurde wie in

Tab. 2.31 aufgeführt zusammengesetzt [38]. Grundsätzlich wurden 1,5  $\mu\text{g}$  RNA in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  für die Reverse Transkription eingesetzt. In Einzelfällen, bei geringen RNA-Konzentrationen der Proben, wurde das Gesamtvolumen auf 30  $\mu\text{l}$  erhöht und die Einzelkomponenten dementsprechend hoch-skaliert. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei 37 °C, die anschließende Lagerung der hergestellten cDNA bei -20 °C.

Tabelle 2.31: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription [38]

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10 x Puffer RT	2 $\mu\text{l}$	1 x
dNTP Mix	2 $\mu\text{l}$	jeweils 0,5 mM
Oligo-dT Primer	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
RNase Inhibitor	0,25 $\mu\text{l}$	10 U (pro 20 $\mu\text{l}$ )
Reverse Transkriptase	1 $\mu\text{l}$	4 U (pro 20 $\mu\text{l}$ )
RNA	...	1,5 $\mu\text{g}$
RNase freies H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu\text{l}$	

### 2.2.3 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen. Sie wurde in dieser Arbeit zur Vervielfältigung der  $\Delta\text{N-ERG}$ -Sequenz mit anschließender Klonierung des aufgereinigten Amplifikats eingesetzt.

Das Prinzip beruht auf der sich wiederholenden Abfolge von Denaturierung, Primeranlagerung (sog. *Annealing*) und Elongation. Dies führt nach jedem Zyklus zu einer Verdopplung der ausgewählten spezifischen Nukleinsäureabschnitte. Bei den Primern (Oligonukleotiden) handelt es sich um kurze DNA-Fragmente mit Längen von ca. 15 bis 25 Nukleotiden. Sie lagern sich mit ihrer spezifischen Nukleotidabfolge an die komplementäre Sequenz der DNA an (Hybridisierung). Durch die gezielte Auswahl der Primer (*forward* und *reverse*) kann der zu amplifizierende DNA-Abschnitt exakt eingegrenzt werden. Entscheidend für die Hybridisierung der Primer ist deren Schmelztemperatur ( $T_m$ ). Sie gibt die Temperatur an, bei der 50 % der Primer nicht mehr an das Template binden [37]. Für jedes Primerpaar müssen die optimalen Anlagerungstemperaturen während der Feinabstimmung der PCR-Bedingungen näherungsweise getestet werden. Sie liegt in der Regel 0-5 °C unterhalb der Schmelztemperatur. Das für die Amplifikation eingesetzte Enzym ist eine hitzestabile DNA-Polymerase mit einem Temperaturoptimum von 72 °C. In dieser Arbeit wurden die Taq- und die Pfu-DNA-Polymerase eingesetzt. Die Taq-DNA-Polymerase stammt aus dem thermostabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus*.

Sie besitzt sowohl eine 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität für die DNA-Strang-Synthese, als auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Die Pfu-DNA-Polymerase, isoliert aus *Pyrococcus furiosus*, besitzt eine größere Thermostabilität. Sie weist neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität und 5'-3'-Exonukleaseaktivität wie die Taq-DNA-Polymerase, auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität auf. Diese befähigt die Polymerase zu einer sog. Korrekturlesefunktion (*proofreading*). Daraus ergibt sich eine geringere Fehlerhäufigkeit, jedoch auf Kosten der Prozessivität. [37] Die Pfu-DNA-Polymerase wurde aufgrund der geringeren Fehlerhäufigkeit im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase für die endgültige Amplifikation des TMPRSS2-ERG-Fusionsprodukts eingesetzt, um Mutationen möglichst zu vermeiden.

Das Ergebnis der Amplifikation wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wiederholt zur Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz mithilfe verschiedener Primerkombinationen (vgl. Tab. 2.1) eingesetzt. Das entstandene PCR-Produkt  $\Delta$ N-ERG wurde über ein 1%iges Agarosegel analysiert. Das amplifizierte  $\Delta$ N-ERG hat eine Größe von ca. 1300 kb.

Details zu den in dieser Arbeit durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen im Rahmen der Klonierungen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen (vgl. Kap. 3.1). Im Folgenden sind tabellarisch die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze für die  $\Delta$ N-ERG-PCR mittels Taq- und Pfu-DNA-Polymerase sowie die verwendeten PCR-Programme aufgeführt.

Die Tabellen 2.32 und 2.33 zeigen den Reaktionsansatz und das PCR-Programm, welche für die initiale Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz mittels Dream Taq Polymerase der Firma Fermentas (St.Leon-Rot) verwendet wurden. Es wurden zunächst die Primer Nr.471 und Nr.472 eingesetzt (vgl. Tab. 2.1).

*Tabelle 2.32: Initialer Reaktionsansatz für die  $\Delta$ N-ERG-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase*

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 x Dream Taq Puffer	2,5 $\mu$ l	1 x
Primer fwd	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
Primer rev	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
dNTP's	1 $\mu$ l	jeweils 400 $\mu$ M
Dream Taq Polymerase	1,5 $\mu$ l	7,5 U
cDNA	1 $\mu$ l	75 ng
dH <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l	

Tabelle 2.33: Initial verwendetes  $\Delta$ N-ERG-PCR-Programm

95 °C	5 Min	
95 °C	30 Sek	
47 °C	30 Sek	5 Zyklen
72 °C	2 Min	
95 °C	30 Sek	
52 °C	30 Sek	30 Zyklen
72 °C	2 Min	
72 °C	5 Min	
4 °C	$\infty$	

Im Verlauf der Arbeit erfolgte eine schrittweise Optimierung der PCR-Bedingungen. Die zu Beginn stets verwendeten Primer Nr.471 und Nr.472 (vgl. Tab. 2.1) weisen beide eine Schmelztemperatur von  $T_m = 55$  °C auf. Anhand dieser wurde die Annealingtemperatur stufenweise adjustiert. Auch die Menge an cDNA wurde variiert und Taq-Polymerasen von verschiedenen Firmen wie Qiagen (Hilden), Fermentas (St.Leon-Rot) und Biozym (Oldendorf) verwendet. Zusätzlich wurden chemische Zusätze wie Formamid oder DMSO getestet. Das aus den Optimierungsschritten resultierende endgültige PCR-Protokoll für die Taq-DNA-Polymerase ist den Tabellen 2.34 und 2.35 zu entnehmen.

Tabelle 2.34: Endgültiger Reaktionsansatz für die  $\Delta$ N-ERG-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10 x Dream taq Puffer	5 $\mu$ l	1 x
Primer fwd	2,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Primer rev	2,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
dNTP's	1 $\mu$ l	jeweils 200 $\mu$ M
Dream Taq Polymerase	0,25 $\mu$ l	1,25 U
cDNA	2 $\mu$ l	150 ng
dH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l	

Tabelle 2.35: Endgültiges  $\Delta$ N-ERG-PCR-Programm

95 °C	7 Min
95 °C	1 Min
57 °C	1 Min 35 Zyklen
72 °C	3 Min
72 °C	5 Min
4 °C	$\infty$

Das oben dargestellte etablierte PCR-Protokoll wurde im Folgenden auf die Pfu-DNA-Polymerase übertragen. Diese weist, wie oben beschrieben, eine Korrekturlesefunktion auf und kann die Sequenz-Amplifikation dadurch wesentlich exakter, mit einer geringeren Spontanmutationsrate durchführen. Zur Reaktionsoptimierung wurde der dazugehörige mit  $\text{MgSO}_4$ -versetzte Puffer verwendet. Der Reaktionsansatz ist Tab. 2.36 zu entnehmen.

Tabelle 2.36: Reaktionsansatz für die  $\Delta$ N-ERG-PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10 x Puffer + $\text{MgSO}_4$	5 $\mu\text{l}$	1 x
Primer fwd	2,5 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
Primer rev	2,5 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{M}$
dNTP's	2 $\mu\text{l}$	jeweils 400 $\mu\text{M}$
Pfu-DNA-Polymerase	0,6 $\mu\text{l}$	1,5 U
cDNA	2 $\mu\text{l}$	150 ng
dH <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu\text{l}$	

Zur Überprüfung der cDNA-Qualität wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt. Bei der Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) handelt es sich um ein sog. Haushaltsgen, das als Referenzgen bei verschiedenen experimentellen Methoden dient. GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und ist folglich in allen Zellen enthalten. Für die GAPDH-PCR wurde der in Tab. 2.37 angegebene Ansatz und das in Tab. 2.38 gezeigte PCR-Programm verwendet. Das zu erwartende Produkt bei der Verwendung des Primerpaars Nr.205 und Nr.206 (vgl. Tab. 2.1) ist 149 bp groß.

Tabelle 2.37: Reaktionsansatz für die GAPDH-PCR

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 x Qiagen Puffer	2 $\mu$ l	1 x
Primer Nr.205	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Primer Nr.206	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
dNTP's	1 $\mu$ l	jeweils 500 $\mu$ M
Dream Taq Polymerase	0,5 $\mu$ l	2,5 U
Template cDNA	1 $\mu$ l	75 ng
dH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l	

Tabelle 2.38: GAPDH-PCR-Programm

95 °C	5 Min	
95 °C	30 Sek	
45 °C	30 Sek	5 Zyklen
72 °C	2 Min	
95 °C	30 Sek	
48 °C	30 Sek	30 Zyklen
72 °C	2 Min	
72 °C	5 Min	
4 °C	$\infty$	

#### 2.2.4 Quantitative Real-Time-PCR

Die in dieser Arbeit transfizierten Zelllinien wurden anhand der quantitative Real-Time-PCR (QRT-PCR) hinsichtlich der erfolgreichen Expression der transfizierten Konstrukte untersucht. Außerdem wurde diese Methode zur vergleichenden Analyse des Expressionsniveaus von  $\Delta$ N-ERG in verschiedenen Zelllinien eingesetzt. Im Gegensatz zur qualitativen PCR, die ausschließlich eine Endpunktmessung erlaubt, bietet die quantitative Real-Time-PCR die Möglichkeit nach jedem Zyklus die Menge des jeweils neu entstandenen PCR-Produkts zu bestimmen. Die Kinetik der Reaktion kann somit Zyklus für Zyklus verfolgt werden. Hierdurch ist die Auswertung der PCR wesentlich genauer und leichter quantifizierbar. Zur Detektion der neu entstandenen dsDNA-Moleküle wurde der Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I eingesetzt. Dieser Cyanin-Farbstoff bindet direkt an DNA-Doppelstränge, die auf diese Weise detektier- und auch quantifizierbar sind, da sich das Fluoreszenzsignal proportional zur DNA-Konzentration verhält. Der entscheidende Parameter bei der Auswertung der QRT-PCR ist der sog. *threshold cycle*

(CT-Wert). Dieser beschreibt den Zeitpunkt, d.h. die Zykluszahl, an dem sich das Fluoreszenzsignal erstmalig erkennbar vom Hintergrund abhebt [37].

Zur Quantifizierung der Genexpression wurden neben den zu messenden Proben weitere Proben einer Standardverdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen analysiert. Auf diese Weise ist eine absolute Quantifizierung der Expression des analysierten Gens möglich. Dies wurde sowohl für das Gen  $\Delta N$ -ERG als auch für das Haushaltsgen (*Housekeeping-Gen*, HKG) GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt. Die ERG-Expression konnte somit zusätzlich auf die Expression des HKG normalisiert werden. Eventuelle Expressionsunterschiede durch Konzentrationsunterschiede oder kleine Pipettierungenauigkeiten in den verschiedenen Verdünnungen konnten somit ausgeglichen werden.

Um die Spezifität der Reaktion zu ermitteln, d.h. um zwischen korrekten PCR-Produkten und Artefakten in Form von Primerdimern zu unterscheiden, wurde am Ende der eigentlichen Amplifikation eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Für diese Analyse wurde der Reaktionsansatz, ausgehend von einer Temperatur von 5 °C oberhalb der Primerannealingtemperatur, in Temperaturschritten von 1 °C bis auf 99 °C erhitzt und währenddessen kontinuierlich das Fluoreszenzsignal gemessen. Der Abfall der Fluoreszenz kennzeichnet den Zeitpunkt, bei dem das PCR-Produkt schmilzt und der Farbstoff aufgrund der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs von diesem dissoziiert. Dieses Ereignis stellt sich in der Ableitung einer optimal eingestellten PCR als einzelner spitz zulaufender *peak* dar. Dieser *peak* entspricht dem spezifischen Produkt. Produkte anderer Größe oder Sequenz sind durch unterschiedliche Schmelzpunkte (*peaks*) charakterisiert.

Zur Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR wurde das Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Der eingesetzte SuperMix beinhaltet alle benötigten PCR-Komponenten, darunter auch die Platinum<sup>®</sup> Taq-DNA-Polymerase, mit Ausnahme der für die eingesetzte cDNA spezifischen Primer. Die Zusammensetzung der Komponenten lässt sich der Tab. 2.39 entnehmen. Diesem wurden 75 ng der aus der Reversen Transkription entstandenen cDNA hinzugefügt. Das verwendete PCR-Programm für die Analyse der ERG-Expression zeigt Tab. 2.40. Die Durchführung der Analyse des Haushaltsgens GAPDH ist der Tab. 2.41 zu entnehmen.

Tabelle 2.39: Master Mix QRT-PCR

Komponenten	Volumen
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (2 x)	12 $\mu$ l
Primer fwd (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Primer rev (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
BSA (1 mg/ml)	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Tabelle 2.40: QRT-PCR-Programm für  $\Delta$ N-ERG

Denaturierung	50 °C	120 Sek	
	95 °C	120 Sek	
Amplifikation	94 °C	10 Sek	40 Zyklen
	54 °C	10 Sek	
	72 °C	15 Sek	
Schmelzkurvenbestimmung	54 °C		
	:		
	99 °C		
Kühlung	40 °C	30 Sek	

Tabelle 2.41: QRT-PCR-Programm für GAPDH

Denaturierung	50 °C	120 Sek	
	95 °C	120 Sek	
Amplifikation	94 °C	5 Sek	40 Zyklen
	54 °C	10 Sek	
	72 °C	10 Sek	
Schmelzkurvenbestimmung	55 °C		
	:		
	99 °C		
Kühlung	40 °C	30 Sek	

### 2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von Nukleinsäure-Fragmenten, wie z.B. von Produkten aus einer PCR oder einem Restriktionsverdau, wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Die Gelelektrophorese nutzt ein elektrisches Feld zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Länge. Je kleiner ein Fragment, desto schneller kann es sich im Vergleich zu größeren durch die Gelmatrix bewegen. [37] Die Gelmatrix fungiert hierbei als molekulares Sieb. Je höher die Konzentration des Gels ist, desto kleiner sind die Poren der Gelmatrix, desto besser werden kleine DNA-Fragmente aufgetrennt. Zur Identifikation der Fragmentgrößen in den Proben werden diese mit Nukleinsäure-Fragmenten bekannter Größe (sog. Größenstandards bzw. DNA-Leitern) verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Herstellung des Gels Agarose in 1 x TAE-Puffer unter Erwärmung gelöst und in vorbereitete Gelkammern gegossen. Es wurden 1-2%ige Gele eingesetzt. Anschließend wurden die Elektrophoresekammern mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, die mit Ladepuffer versetzten Proben (Endkonzentration 1 x) sowie 1  $\mu\text{g}$  des 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas) auf das Gel aufgetragen und eine Spannung von 70-100 mV angelegt. Nach erfolgter Probenauftrennung wurden die Banden in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 5-10 Minuten angefärbt und mithilfe von ultraviolettem Licht das Ergebnis dokumentiert. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um ein mutagenes Reagenz, das in dsDNA interkaliert und unter UV-Licht-Exposition fluoresziert [37].

### 2.2.6 Aufreinigung von PCR-Proben für die Sequenzierung

Für die Aufreinigung von PCR-Proben für die Sequenzierung wurde das DNA Clean & Concentrate-5<sup>TM</sup>- Kit (Zymo Research, Kalifornien USA) verwendet. Die eingesetzte Säule enthält eine Silika-Membran. Die Durchführung erfolgte nach Empfehlungen und Angaben des Herstellers, wobei das PCR-Produkt mit 10  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O eluiert wurde. Die Konzentration und Reinheit wurde am Photometer bestimmt.

### 2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von der Firma GATC, Konstanz Deutschland, durchgeführt.

### 2.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um die amplifizierte  $\Delta$ N-ERG-Sequenz für die weitere Verwendung aus den PCR-Proben zu isolieren, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Es bietet die Möglichkeit Fragmente einer Größe von 70 bp bis 10 kb mithilfe einer Silika-Membran aus Agarosegelen zu extrahieren, wobei die maximale Kapazität der Säule für Agarose 400 mg beträgt. Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurden die Proben zunächst mithilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, so dass die gewünschten Nukleinsäurefragmente in Form von Banden selektiv aus dem Gel ausgeschnitten werden konnten. Die ausgeschnittene Agarose wurde anschließend durch Zugabe des im Kit enthaltenen Puffers QG und Erwärmung des Ansatzes auf 50 °C aufgelöst. Nach der Bindung der DNA an die Säule erfolgte die weitere Durchführung nach Angaben des Herstellers. Die gewaschene DNA wurde mit 30  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O eluiert. Quantität und Qualität des Eluats wurden photometrisch ermittelt.

### 2.2.9 Kultivierung von Bakterienzellen

Die Anzucht von E.coli-Bakterienstämmen erfolgte in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) für 16-18 Stunden (sog. Über-Nacht-Kultur). Zur Selektion von Plasmid-transformierten Bakterien wurde das LB-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin (LB<sub>Amp</sub>-Medium) versetzt.

Für die vorübergehende Sicherung oder die Wiederanzucht von Gefrierkulturen wurden die Bakterien auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten (50  $\mu$ g Ampicillin pro ml LB-Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone konnten anschließend selektiv in LB-Medium angezüchtet werden.

Zur Herstellung von Gefrierkulturen (sog. Kryostocks) wurden ca. 850  $\mu$ l der Bakterienkultur mit ca. 170  $\mu$ l 85%igem Glycerin versetzt, 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die dauerhafte Lagerung als Glycerinstock erfolgte bei -70 °C.

### 2.2.10 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation im Maxi-Format wurde eine 100 ml-Kultur (vgl. Kap.2.2.9) über Nacht inkubiert und die Bakterienzellen anschließend durch Zentrifugation vom LB-Medium getrennt. Zur weiteren Präparation wurde das QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Angaben des Herstellers beinhalteten die alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe des im Kit enthaltenen Puffers P2 sowie die Fällung des resultierenden Zelldetritus. Der die Plasmid-DNA

enthaltende Überstand wurde durch Filtration von den ebenfalls enthaltenen Proteinen getrennt und auf die Säule gegeben. Bei großen Plasmiden, wie z.B. dem pLZRS-Vektor mit einer Größe von ca. 13 kb, war der Einsatz der Filterspritze nicht möglich. Das ausgefallene Zellmaterial wurde hier abzentrifugiert und der klare Überstand auf die Säule überführt. Das Funktionsprinzip der Säule beruht auf dem Anionenaustauscher-Prinzip. Das letztendlich resultierende Pellet wurde je nach Größe in 100-200  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  gelöst.

Für die Plasmidpräparation im Mini-Format wurde eine 4 ml-Über-Nacht-Kultur (vgl. Kap.2.2.9) angesetzt und zur weiteren Präparation das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Bakterienzellen wurden alkalisch lysiert und die Plasmid-DNA basierend auf einem Anionenaustausch an die Säule gebunden. Die Elution erfolgte mithilfe von 50  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

Die Konzentration der Plasmid-DNA sowie die Reinheit der Präparation wurden photometrisch ermittelt.

### 2.2.11 Qualitäts- und Quantitätskontrolle von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe von UV-Licht. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, das von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm. Durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) lässt sich die Konzentration an Nukleinsäuren in der Lösung bestimmen. Dabei muss der lineare Bereich zwischen 0,1 und 1 OD eingehalten werden. Die Konzentration in  $\text{ng}/\mu\text{l}$  lässt sich anhand folgender Formel berechnen:

$$\text{ng}/\mu\text{l} = OD_{260} \cdot \text{Verduennungsfaktor} \cdot r \quad (2.1)$$

In der oben genannten Formel 2.1 bezeichnet  $r$  den für DNA und RNA jeweils spezifischen Faktor. Für DNA gilt ein spezifischer Faktor von  $r = 50$ , für RNA ist  $r = 40$ . Daraus folgt, dass eine OD von 1 einer DNA-Konzentration von 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  und einer RNA-Konzentration von 40  $\text{ng}/\mu\text{l}$  entspricht. In der Regel wurden 2  $\mu\text{l}$  der Probe in 50  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  gemessen. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:25.

Die Reinheit der Probe ergibt sich aus dem Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$ . Die optimale Reinheit liegt bei einem  $OD_{260}/OD_{280}$ -Quotient von 1,8-2,0. [37]

### 2.2.12 Klonierung

Das folgende Kapitel zeigt die Grundzüge sowie die allgemeingültigen Arbeitsschritte einer Klonierung auf. Detaillierte Informationen zu den in dieser Arbeit angewandten Klonierungsstrategien sind dem Ergebnisteil (Kap. 3.1) zu entnehmen.

Entscheidene Instrumente der Klonierung sind die Restriktionsendonukleasen, auch Restriktionsenzyme genannt. Sie erkennen bestimmte Zielsequenzen innerhalb eines DNA-Strangs, an denen sie diesen zerschneiden. Auf diese Weise entstehen glatte (*blunt ends*) oder auch überhängende Enden (*sticky ends*). Bei den Zielsequenzen handelt es sich um symmetrisch aufgebaute DNA-Abschnitte, sog. Palindrome.

#### Restriktionsverdau

Ein allgemeingültiges Rezept für den Restriktionsverdau zeigt Tab. 2.42. In der Regel wurden 5  $\mu\text{g}$  des Vektors verdaut. Für den Insert-Verdau wurde das gesamte Eluat der Gelextraktion eingesetzt (vgl. Kap. 2.2.8). Der Verdau, wie in Tab. 2.42 aufgezeigt, erfolgte eine Stunde bei 37 °C. Je nach eingesetztem Enzym schloss sich an diese Inkubation eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C an. Erfolgte ein Doppelverdau, so wurden zusätzlich 10 U des Enzyms 2 eingesetzt und der für die gewählte Enzymkombination geeignete Reaktionspuffer ausgewählt.

Tabelle 2.42: Allgemeingültiges Rezept für den Restriktionsverdau

Komponente	Endkonzentration
DNA	5 $\mu\text{g}$
10 x Puffer	1 x
Enzym	10 U
optional: BSA	50 ng/ $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu\text{l}$

#### Vektor-Dephosphorylierung

Um eine Religation des Vektors ohne Insertaufnahme zu verhindern wurde dem Restriktionsverdau eine Vektor-Dephosphorylierung angeschlossen. Die Gesamtmenge des Restriktionsverdau mit 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurde dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz - wie in Tab. 2.43 beschrieben - wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 75 °C hitzeinaktiviert. Die Lagerung erfolgte auf Eis.

Tabelle 2.43: Vektor-Dephosphorylierung

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Plasmid DNA	20 $\mu$ l	5 $\mu$ g
10 x SAP Puffer	3 $\mu$ l	1 x
SAP Enzym	3 $\mu$ l	3 Units
dH <sub>2</sub> O	ad 30 $\mu$ l	

### Ligation

Für die Ligation der Vektor- und Insert-DNA wurde die T4-DNA-Ligase der Firma Fermentas (St.Leon-Rot) eingesetzt. Sie besitzt die Eigenschaft freie komplementäre 3'- und 5'-OH-Gruppen doppelsträngiger DNA-Enden über kovalente Phosphodiesterbindungen zu verbinden. Für die Komponenten des Ligationsansatzes gilt die in Tab. 2.44 aufgeführte Zusammensetzung.

Tabelle 2.44: Ligationsansatz

Komponente	Endkonzentration
Vektor	100-200 ng
Insert	<i>vgl. Formel 2.2</i>
10 x T4 Ligase Puffer	1 x
T4 Ligase	5 U
dH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Die Menge an Insert bei Einsatz von 100-200 ng Vektor wurde mithilfe der Gleichung 2.2 bestimmt. Das Verhältnis Insert : Vektor sollte 3 bzw. 5 betragen.

$$ng_{\text{Insert}} = \frac{ng_{\text{Vektor}} \cdot kb_{\text{Insert}}}{kb_{\text{Vektor}}} \cdot \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \quad (2.2)$$

Die Ligationsproben wurden über Nacht bei 22 °C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert. Es wurde außerdem jeweils eine Negativkontrolle ohne Zugabe des Inserts zugefügt, um spontane Religationen des Vektors ohne die Aufnahme des Inserts beurteilen zu können.

## Transformation

Transformation bedeutet die Übertragung genetischer Information mittels freier DNA, wie beispielsweise das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien [11]. In dieser Arbeit wurde dafür der chemisch-kompetente *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  eingesetzt. Die kompetenten Bakterienzellen wurden bei -80 °C gelagert und mussten für die Transformation langsam auf Eis aufgetaut werden. 10  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurden mittels vorsichtigem Resuspendieren 100  $\mu$ l der kompetenten Zellen zugefügt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Für die Aufnahme des DNA-Plasmids in die kompetenten Zellen wurde ein Hitzeschock von maximal 90 Sekunden bei 42 °C durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 Minuten wurde den transformierten Zellen 900  $\mu$ l raumtemperiertes LB-Medium ohne Antibiotikumzusatz hinzugefügt und 60 Minuten schüttelnd (400 rpm) bei 37 °C inkubiert. Der Inkubation folgte eine 2-minütige Zentrifugation bei 5500 rpm. 900  $\mu$ l des Mediums wurden verworfen und das Zell-Pellet im restlichen Volumen durch Vortexen gelöst. Die Zellsuspension wurde auf vorgewärmten trockenen LB-Agarplatten mithilfe eines Drigalski-Spatels gleichmäßig ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Durch die Zugabe des Antibiotikums Ampicillin zu den LB-Agarplatten wurde das Bakterienwachstum selektiert. Das transformierte Plasmid enthält das Gen für die Ampicillin-Resistenz. Nur erfolgreich transformierte Bakterien, die das ringförmig geschlossenen Plasmid tragen, überleben auf den LB<sub>Amp</sub>-Platten und bilden Kolonien aus.

Die Negativkontrolle diente zur Bestimmung des Hintergrunds. Zu diesem Ligationsansatz wurde, wie oben beschrieben, allein der Vektor und kein Insert hinzugefügt. Kommt es zur spontanen Religation des Vektors ohne Inserteinbau, so entstehen auf der Kontrollplatte ebenfalls Kolonien. Dies lässt Rückschlüsse auf die insertlose Religation des Vektors auch in den Testansätzen zu und damit auf die Effizienz des Inserteinbaus.

## Klonierung mithilfe des CloneJET<sup>TM</sup> PCR Clone Kit

Mithilfe des CloneJET<sup>TM</sup> PCR Clone Kits gelang schließlich die Klonierung der amplifizierten  $\Delta$ N-ERG-Sequenz in den pJet1.2-Vektor. Das resultierende Plasmid war Ausgangspunkt der Umklonierung in einen Expressionsvektor mit nachfolgender Transfektion.

Die Klonierung mithilfe des CloneJET<sup>TM</sup> PCR Clone Kits (Fermentas, St.Leon-Rot) erfolgte nach Empfehlungen und Angaben des Herstellers. Hierbei handelt es sich um das Prinzip der *blunt*-Klonierung von PCR-Produkten. Der pJet1.2-Vektor ist ein linearisierter Vektor, der an den offenen Enden jeweils einen T-Überhang aufweist. Es können Inserts einer Größe von

6 bp bis 10 kb integriert werden.

Die Pfu-DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion generiert blunt-end-PCR-Produkte. Diese konnten direkt der Ligation zugeführt werden. PCR-Produkte, die durch die Dream-Taq-DNA-Polymerase generiert wurden, weisen 3'-Überhänge auf, sog. sticky-ends. Diese mussten zunächst in einer zusätzlichen 'blunting'-Reaktion entfernt werden, bevor auch sie der Ligation mit dem CloneJET-Vektor zugeführt werden konnten. Das im Kit enthaltene 'blunting'-Enzym ist eine thermostabile DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion. Es entfernt 3'-Überhänge und füllt 5'-Überhänge auf [39]. 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurden für die Transformation von 100  $\mu$ l kompetenter DH5 $\alpha$ - Zellen eingesetzt.

### Erfolgskontrolle der Klonierungen

Für die Erfolgskontrolle der Klonierungen wurden die im Folgenden beschriebenen Methoden der Kolonie-PCR und des Kontrollverdaus angewandt.

Für die Kolonie-PCR wurde zunächst der Master Mix - wie in Tab. 2.45 aufgeführt - hergestellt, wobei die Taq-Polymerase erst kurz vor Beginn der Reaktion zum Master Mix hinzugefügt wurde.

Tabelle 2.45: Master Mix für die Kolonie-PCR

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x Dream taq Puffer	2,5 $\mu$ l	1 x
Primer fwd	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
Primer rev	1 $\mu$ l	0,4 $\mu$ M
dNTP's	0,5 $\mu$ l	jeweils 200 $\mu$ M
Dream Taq-Polymerase	0,2 $\mu$ l	1 U
dH <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l	

Die Primer binden an Vektorsequenzen ober- und unterhalb der *multiple cloning site*, schließen folglich das eingebrachte Insert ein. Die Fragmentgröße ergibt sich demnach aus der Größe des eingebrachten DNA-Fragments und der Primerabstände im Vektor. Die verwendeten Primer sind der Tab. 2.1 zu entnehmen.

Es wurden repräsentative Kolonien mithilfe einer Pipettenspitze von den Agarplatten gepickt und in ein 0,2 ml Tube überführt. Jeweils 25  $\mu$ l des Master Mix wurden zu jeder Probe hinzugefügt. Zusätzlich wurden eine Negativkontrolle mit 25  $\mu$ l Master Mix sowie eine Positivkontrolle angefertigt. Für die Positivkontrolle diente entweder der Leervektor, sofern die Abstände zwischen den Primern groß genug waren, um das Amplifikat auf dem Agarosegel erkennen zu

können, oder aber ein anderes bereits kloniertes Konstrukt mit demselben Expressionsvektor. Das PCR-Programm ist in Tab. 2.46 beschrieben. Anschließend wurde das Ergebnis mithilfe eines Agarosegels ausgewertet.

Die zum Picken verwendeten Spitzen wurden bei 4 °C gelagert. Bei Detektion positiver Kolonien in der Kolonie-PCR konnten diese zur Anzucht einer Über-Nacht-Kultur für die Plasmidpräparation verwendet werden.

Die Erfolgskontrolle der CloneJET<sup>TM</sup>-Klonierung erfolgte ebenfalls mittels Kolonie-PCR. Die Durchführung dieser PCR erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

Tabelle 2.46: PCR-Programm für die Kolonie-PCR

95 °C	5 Min	
95 °C	30 Sek	
52 °C	30 Sek	30 Zyklen
72 °C	1 Min	
72 °C	7 Min	
4 °C	∞	

Für den Kontrollverdau wurden repräsentative Kolonien mithilfe einer Pipettenspitze von den jeweiligen Agarplatten gepickt und eine Maxi- bzw. Miniprep - wie in Kap. 2.2.10 beschrieben - angefertigt. Anschließend wurde das Konstrukt mithilfe der für die Klonierung eingesetzten Restriktionsenzyme verdaut und das Ergebnis anhand der durchgeführten Agarosegelelektrophorese ausgewertet.

### 2.2.13 *In vitro* Mutagenese nach Papworth et al.

Mithilfe der zielgerichteten Mutagenese nach Papworth et al. [40] lassen sich ein Basenaustausch, Deletionen oder Insertionen von wenigen Nukleotiden in Plasmiden durchführen. Dabei muss das Ausgangsplasmid aus einem methylierenden (dam+) E.coli-Stamm stammen, wie beispielsweise aus den DH5 $\alpha$ -Zellen. Die Mutation und Amplifikation des Plasmids erfolgte in einer PCR-Reaktion. Hierfür wurden zwei zueinander komplementäre *mismatch*-Primer, die die gewünschte Mutation in das Plasmid einführen, sowie die thermostabile Pfu-DNA-Polymerase, die glatte Enden (sog. *blunt ends*) generiert und eine Korrekturlesefunktion besitzt, eingesetzt. Während der PCR verliert das neu synthetisierte, mutierte DNA-Plasmid seine Methylierung. Auf diese Weise wurde unmutiertes Ausgangsplasmid durch die Zugabe des methylierungs-

sensitiven Restriktionsenzym Dpn I aus dem PCR-Ansatz entfernt. Dpn I schneidet ausschließlich methylierte Plasmid-DNA, also nur das Ausgangsplasmid. Die unmethylierte, neu synthetisierte DNA bleibt intakt und kann anschließend für eine Transformation verwendet werden.

Zur Korrektur der Punktmutation des ERG-pCDNA3.1 zeo-Plasmids (Konstrukt-Nr.3137) war ein Basenaustausch notwendig. Hierfür wurden der in Tab. 2.47 beschriebene Reaktionsansatz und das in Tab. 2.48 dargestellte PCR-Programm verwendet.

Tabelle 2.47: Reaktionsansatz für die *in vitro* Mutagenese nach Papworth et al.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 x Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	5 µl	1 x
dNTPs	1 µl	jeweils 200 µM
Primer fwd	1,5 µl	0,3 µM
Primer rev	1,5 µl	0,3 µM
Pfu Polymerase	1 µl	2,5 U
DMSO	4 µl	8 %
Plasmid DNA	...	50 ng
dH <sub>2</sub> O	ad 50 µl	

Tabelle 2.48: PCR-Programm für die *in vitro* Mutagenese

95 °C	2 Min
95 °C	1 Min
60 °C	50 Sek
68 °C	10 Min
68 °C	7 Min
4 °C	∞

Der Erfolg der Reaktion wurde mithilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft. Bei deutlich erkennbarer Bande wurde das Ausgangsplasmid wie oben beschrieben mithilfe des Restriktionsenzym Dpn I aus dem PCR-Ansatz entfernt. Hierfür wurde der PCR-Ansatz mit 1 x Puffer Tango und 1 µl Dpn I (10 Units) versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Abschließend wurde der Erfolg der *in vitro* Mutagenese durch den Restriktionsverdau mit dem Enzym Lwe I kontrolliert (vgl. Kap. 2.2.12). Durch den Basenaustausch geht die Lwe I-Schnittstelle verloren, das erfolgreich mutierte Plasmid kann nicht geschnitten werden. Die

Agarosegelelektrophorese der gelungenen Mutagenese zeigt ausschließlich eine Bande des ungeschnittenen Plasmids. Zusätzlich erfolgte zur Verifizierung des Erfolgs die Sequenzierung des mutierten Plasmids.

Für die Transformation des durch die *in vitro* Mutagenese veränderten Plasmids wurden 5  $\mu$ l des Ansatzes verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.2.12 dargestellt.

### 2.2.14 Zellkultur

#### Kultivierung von humanen Zellen

Es wurden sowohl humane BPH1- als auch humane HEK293-Zellen kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche versorgt, d.h. vitaler Zustand und Wachstum wurden unter dem Mikroskop beurteilt sowie frisches Nährmedium (12 ml pro 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche) zugegeben. Ab einer Dichte des Zellrasens von ca. 80 % der Wachstumsfläche, wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das verbrauchte Medium verworfen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Mithilfe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung [0,2 %/ 0,05 %] (pro 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche) wurden die Zellen von ihrer Wachstumsunterlage gelöst. Der Ablösungsprozess wurde unter dem Mikroskop beobachtet, um bei vollständiger Lösung das Trypsin durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium zu neutralisieren. Die abgelösten Zellen wurden im Nährmedium gut resuspendiert und anschließend je nach ursprünglicher Zelldichte 1:2 bzw. 1:3 passagiert, d.h. die resuspendierten Zellen auf 2 bzw. 3 Kulturflaschen aufgeteilt. War keine Expansion der Zellen erforderlich, wurde eine Tochterflasche angelegt und die nicht benötigten Zellen verworfen. Während der Anzucht von transfizierten Zellen aus 6- bzw. 24-wells wurden diese bei ausreichender Dichte jeweils in nächstgrößere Kulturflaschen überführt.

Die humanen BPH1-Zellen wurden in RPMI Medium mit 5 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ l/ml Streptomycin (= 1 % Pen/Strep) sowie 1 x L-Glutamin bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert (vgl. Tab. 2.6). Das Nährmedium DMEM der humanen HEK293-Zellen beinhaltete zusätzlich 10 % hitzeinaktiviertes FCS, 1 % Pen/Strep, 1 x L-Glutamin, sowie 1 M HEPES (vgl. Tab. 2.7).

Dem Medium von transfizierten Zellen wurde das entsprechende Antibiotikum, in dieser Arbeit Zeocin, hinzugefügt, um das selektive Wachstum erfolgreich transfizierter Zellen zu gewährleisten. 100 ml Medium wurden mit 250  $\mu$ l Zeocin-Stocklösung versetzt (Endkonzentration 250  $\mu$ g/ml).

### Bestimmung der Zellzahl

Für Experimente mit verschiedenen Zelllinien ist es essentiell die Zahl der eingesetzten Zellen genau zu kennen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Sie besteht aus insgesamt neun großen Quadraten, die jeweils eine Fläche von  $1 \text{ mm}^2$  aufweisen. Die Tiefe beträgt  $0,1 \text{ mm}$ , so dass sich ein Volumen von  $0,1 \mu\text{l}$  ergibt. So kann aus der Anzahl der gezählten Zellen auf die Zellzahl pro ml geschlossen werden [41].

Für die Zellzahlbestimmung wurde zusätzlich eine Trypanblau-Färbung durchgeführt, die eine Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen erlaubt. Es handelt sich bei dieser Färbemethode um eine Ausschlussfärbung, da Trypanblau ausschließlich in tote Zellen eindringt und die intrazellulär lokalisierten Proteine anfärbt. Die toten Zellen erscheinen somit unter dem Mikroskop tief blau. Intakte Plasmamembranen vitaler Zellen können von diesem Farbstoff nicht überwunden werden. Auf diese Weise kann die Zahl lebender Zellen exakter ermittelt werden [41].

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine 1:2 Verdünnung aus gleichen Teilen Zellsuspension und Trypanblau-Lösung hergestellt und  $10 \mu\text{l}$  dieser Verdünnung in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Kapillarkräfte sorgen dafür, dass sich die Suspension blasenfrei zwischen Deckglas und Kammer verteilt. Es wurden 4 Großquadrate ausgezählt, der Mittelwert  $\bar{x}$  gebildet und die Zellzahl anschließend durch folgende Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \bar{x} \cdot 10^4 \cdot V \quad (2.3)$$

Bei der eingesetzten 1:2 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau ergab sich ein Verdünnungsfaktor von  $V = 2$ .

#### 2.2.15 Transfektion von humanen BPH1-Zellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von fremdem genetischen Material, z.B. Plasmiden, in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet die transiente, d.h. vorübergehende, von der stabilen, d.h. dauerhaften, Transfektion. Bei der stabilen Transfektion erfolgt die Selektion der positiven Zellklone über die Zugabe eines Selektionsreagenz, in dieser Arbeit Zeocin. Hierfür weisen die transfizierten Plasmide neben dem eigentlichen Insert, der  $\Delta\text{N-ERG}$ -Sequenz, zusätzlich das Resistenzgen für Zeocin auf.

Eine Möglichkeit der Transfektion humaner BPH1-Zellen ist die Lipofektion. Dabei wird die Fremd-DNA mithilfe von Liposomen in die Wirtszelle eingebracht. Im Folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Transfektionsreagenzien dargestellt. Im Vorfeld der eigentlichen Transfektion des  $\Delta\text{N-ERG}$ -Konstrukts in humane BPH1-Zellen wurden verschiede-

ne Transfektionsreagenzien und -bedingungen vergleichend getestet, um am Ende möglichst hohe Transfektionseffizienzen mit dem  $\Delta$ N-ERG-Konstrukt zu erzielen.

### **FuGENE<sup>®</sup> 6 Transfection Reagent**

Einen Tag vor der Transfektion wurden 150.000-200.000 Zellen in 6-wells ausgesät. Das verwendete Nährmedium enthielt keinen Antibiotikumzusatz (wie beispielsweise Penicillin/ Streptomycin). Für die Transfektion von humanen BPH1-Zellen eignet sich ein FuGENE<sup>®</sup>:DNA-Verhältnis von 3:1, wobei die eingesetzte DNA idealerweise eine Reinheit von  $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$  aufweisen sollte, um gute Transfektionsergebnisse zu erzielen. Am Tag der Transfektion wurden zunächst 4,5  $\mu$ l des FuGENE<sup>®</sup> Reagenz in 100  $\mu$ l Optimem-Medium (reduzierter FCS-Anteil von 3 %) verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das FuGENE<sup>®</sup> Reagenz hat eine große Affinität zu Plastikoberflächen, so dass sie möglichst in die Mitte des Optimem-Mediums pipettiert werden sollte. Anschließend wurden 1,5  $\mu$ g der zu transfizierenden DNA hinzugegeben. Während der Inkubationszeit von 15 Minuten bilden sich Mizellen als wichtige Voraussetzung für die Verschmelzung mit der Zellmembran und damit für den Transfektionserfolg. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben. Auch hierbei ist die hohe Affinität des FuGENE<sup>®</sup> Reagenz zu Plastikoberflächen zu beachten. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Nach 3-8 Stunden wurde die FCS-Endkonzentration wieder auf 5 % erhöht. Die Selektion begann 72 Stunden nach der Transfektion mit Zeocin (250  $\mu$ l pro 100 ml Medium, Endkonzentration 250  $\mu$ g/ml).

### **GeneJuice<sup>®</sup> Transfection Reagent**

Für die Transfektion in 6-wells wurden 100  $\mu$ l Optimem und 3  $\mu$ l GeneJuice<sup>®</sup> zusammengegeben, kurz gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1  $\mu$ g Plasmid-DNA durch vorsichtiges Pipettieren mit dem Ansatz vermischt. Es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Der Transfektionsansatz wurde schließlich tropfenweise auf die Zellen gegeben (150.00-200.000 Zellen pro 6-well) und nach 2-8 Stunden durch einen Mediumwechsel wieder entfernt.

### **TurboFect<sup>TM</sup> Reagenz**

Zunächst wurde die zu transfizierende DNA (4  $\mu$ g) in 400  $\mu$ l Optimem gelöst, 6  $\mu$ l des TurboFect<sup>TM</sup> Reagenz durch vorsichtiges Pipettieren hinzugefügt und der Ansatz für etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz tropfenweise auf die

Zellen (150.000-200.000 Zellen pro 6-well) gegeben.

### **SuperFect® Transfection Reagent**

Für diese Transfektion wurden 2  $\mu\text{g}$  DNA und 100  $\mu\text{l}$  Optimem vermischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  des SuperFect Transfektionsreagenz hinzugefügt und der Ansatz für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vorsichtig vermischt mit 1 ml Wachstumsmedium wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen (200.000 Zellen pro 6-well) gegeben. Nach 2-3 Stunden wurde abschließend ein Mediumwechsel durchgeführt.

### **Lipofectamin<sup>TM</sup> Reagenz**

Für die Transfektion mit Lipofectamin<sup>TM</sup> sollten die Zellen eine Zelldichte von 50-80 % aufweisen. Die Durchführung erfolgte in 24-wells nach den Angaben und Empfehlungen des Herstellers. Dieser gibt in seinem Protokoll große Spannbreiten für die Menge an eingesetzter DNA und Lipofectamin<sup>TM</sup> Reagenz an. Für die Transfektion in 24-wells schlägt er DNA-Mengen von 0,2-0,4  $\mu\text{g}$  sowie 0,5-5  $\mu\text{l}$  Lipofectamin<sup>TM</sup> pro 25  $\mu\text{l}$  Medium vor.

Um die optimalen Bedingungen für die Transfektion von humanen BPH1-Zellen herauszufinden, wurden diese in 24-wells mit verschiedenen DNA-Lipofectamin<sup>TM</sup>-Verhältnissen transfiziert (vgl. Tab. 2.49).

Für die Transfektion wurden zunächst pro 24-well 60.000 humane BPH1-Zellen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde die zu transfizierende DNA in 25  $\mu\text{l}$  Optimem verdünnt und der Ansatz gut gemischt. Das Lipofectamin<sup>TM</sup>-Reagenz wurde ebenfalls in 25  $\mu\text{l}$  Optimem gut gelöst und anschließend beide Verdünnungen zusammengegeben. Während der 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur bilden sich die lipophilen Komplexe, mithilfe derer die DNA in die Zellen gelangt. 150  $\mu\text{l}$  Optimem wurden schließlich dem Transfektionsansatz hinzugefügt. Zu den zu transfizierenden Zellen wurden zunächst 200  $\mu\text{l}$  frisches Medium ohne FCS und Pen/Strep gegeben und anschließend der Transfektionsansatz von jeweils 200  $\mu\text{l}$  gleichmäßig im 24-well verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Das Medium wurde nach 5 Stunden durch frisches Vollmedium ersetzt, um ein Absterben zu großer Zellmengen aufgrund der möglichen Toxizität des Transfektionsreagenz zu vermeiden.

Es wurden die  $\beta$ -Galaktosidase-Gen-tragenden Plasmide Nr.1386 und Nr.2016 (vgl. Tab. 2.3) verwendet, so dass der Transfektionserfolg anhand einer  $\beta$ -Gal-Färbung dokumentiert und die Effizienzen auf diese Weise untereinander verglichen werden konnten. Hierbei zeigten die Ansätze Nr.4 und Nr.5 die höchsten Transfektionseffizienzen.

Tabelle 2.49: Optimierung der Transfektion von humanen BPH1-Zellen

Nr.	DNA [ $\mu\text{g}$ ] pro 25 $\mu\text{l}$ Medium	Lipofectamin <sup>TM</sup> [ $\mu\text{l}$ ] pro 25 $\mu\text{l}$ Medium
1	0,2	0,5
2	0,2	5
3	0,4	0,5
4	0,4	5
5	0,3	2,5

### 2.2.16 Nukleofektion

Als weitere Methode der Transfektion fand die Nukleofektion in dieser Arbeit Anwendung. Hierbei handelt es sich um eine Art der Elektroporation. Ein elektrischer Impuls stört kurzfristig das Membranpotential der zu transfizierenden Zellen, wodurch die einzubringende Fremd-DNA in die Zelle gelangen kann [37].

Für die Transfektion humaner BPH1-Zellen mittels Nukleofektion wurde das Amaxa<sup>®</sup> Cell Line Nucleofector<sup>®</sup> Kit R (Lonza Cologne GmbH, Köln) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mithilfe der enthaltenen Lösungen nach den Angaben und Empfehlungen des Herstellers. Das Programm T-009 und die Lösung R wurden vom Hersteller als die beste Kombination für die Transfektion humaner BPH1-Zellen angegeben. Für eine gute Transfektionseffizienz sollten die Zellen eine Konfluenz von 70-85 % aufweisen.

Zunächst wurde die Nukleofektionslösung aus 0,2 ml Supplement und 0,9 ml Nucleofector-Lösung hergestellt und vorgewärmt. 1,5 ml des BPH1-Mediums wurden in 6-wells gegeben und im Brutschrank bei 37 °C vorinkubiert. Die zu transfizierenden BPH1-Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert und pro Versuch  $2 \times 10^6$  Zellen in 15 ml Medium bei 90 g und Raumtemperatur 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in Nukleofektionslösung resuspendiert, so dass eine Suspension von  $2 \times 10^6$  Zellen pro 100  $\mu\text{l}$  entstand. Zu beachten war die maximale Inkubationszeit der Zellen in dieser Lösung von 15 Minuten. Für die Transfektion wurden jeweils 2  $\mu\text{g}$  DNA pro 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension eingesetzt. Als Negativkontrollen fungierten Suspensionslösungen ohne Zugabe von DNA. Für die Positivkontrolle wurde das pMaxGFP-Konstrukt verwendet. Dieses enthält die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein (GFP). Dieses Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* fluoresziert grün nach Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht [37]. Auf diese Weise wurde der Transfektionserfolg 24 Stunden nach der Nukleofektion kontrolliert. Die zu transfizierende DNA wurde mit 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension vermischt, ohne Luftblasen in eine Küvette überführt und in

den Nucleofector® gesetzt. Nach Beendigung des Nukleofektionsprogramms wurde der Suspension 500  $\mu$ l warmes Medium zugefügt und der Ansatz mithilfe einer Plastikpipette in die vorgewärmten 6-wells überführt. Abschließend erfolgte die weitere Inkubation bei 37 °C im Brutschrank.

### 2.2.17 $\beta$ -Gal-Färbung

Die  $\beta$ -Gal-Färbung dient der Beurteilung der Effizienz einer Transfektion. Hierfür wurden humane BPH1-Zellen mit einem pLZRS-neo- (Konstrukt-Nr.1386) bzw. einem pCMV-Vektor (Konstrukt-Nr.2016) transfiziert. Diese Konstrukte tragen jeweils das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase. Die Expression dieses Enzyms in erfolgreich transfizierten Zellen führt im Rahmen der Färbereaktion zu einer Blaufärbung der Zellen. Auf diese Weise lässt sich die prozentuale Transfektionseffizienz bestimmen.

Humanen BPH1-Zellen wurden zunächst mithilfe der unterschiedlichen Transfektionsreagenzien, wie oben beschrieben, transfiziert und 48 Stunden später der Transfektionserfolg anhand der  $\beta$ -Gal-Färbung überprüft. Hierfür wurden zunächst die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe einer Formaldehyd/Glutaraldehydlösung [2 %/0,2 %] 3 Minuten bei Raumtemperatur fixiert (vgl. Tab. 2.24). Die Färbung erfolgte nach erneutem Waschen mit PBS durch Zugabe der Färbelösung - wie in Tab. 2.25 angegeben - und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Der Transfektionserfolg wurde unter dem Mikroskop beurteilt und mithilfe von Fotos dokumentiert.

### 2.2.18 Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode nach Jordan et al. [42]. Zugrundeliegendes Prinzip ist die Bindung der zu transfizierenden Plasmid-DNA an ausgefallene Calciumphosphatkristalle. Diese Kristalle werden nach Zugabe zu den Zellen von diesen durch Endozytose aufgenommen [37].

Für die Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  HEK293-Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und mit insgesamt 5  $\mu$ g Plasmid-DNA transfiziert. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde dem HEK-Medium zusätzlich Chloroquin [25  $\mu$ M] zugefügt und die ausgesäten Zellen darin für 30 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz - wie in Tab. 2.50 angegeben - vorbereitet. Der HEBS-Puffer (vgl. Tab. 2.8) wurde tropfenweise hinzugefügt und nach jedem Tropfen der Ansatz kurz gevortext. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 20 Minuten, in der sich die Calcium-Phosphat-Präzipitate bilden, wurden 1 ml des Transfektions-

ansatzes tropfenweise in die vorbereiteten 10 cm-Schalen gegeben und nach 6-9 Stunden das Medium durch herkömmliches ersetzt.

Für die stabile Transfektion begann die Selektion mit Zeocin-versetztem HEK293-Medium 48 Stunden nach der Transfektion.

*Tabelle 2.50:* Transfektionsansatz für die Transfektion von  $1 \times 10^6$  HEK293-Zellen

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNA in dH <sub>2</sub> O	438 $\mu$ l	5 $\mu$ g
CaCl <sub>2</sub>	62 $\mu$ l	2 M
HEBS-Puffer	2 ml	2 x
gesamt	2,5 ml	

### 2.2.19 Western Blot

#### Präparation von Proteinlysaten

Zur Herstellung eines Proteinlysats wurden die Zellen zunächst mithilfe von Trypsin/EDTA [0,2 %/ 0,05 %] von ihrer Wachstumsunterlage gelöst und anschließend bei 1000 rpm und 4 °C 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit sterilem PBS gewaschen und die Zellen schließlich durch die Zugabe des Lysepuffers aufgeschlossen. Standardmäßig wurde der Ripa-Lysepuffer (vgl. Tab. 2.10) verwendet. Zum Nachweis der  $\beta$ -Catenin-Expression mittels Western Blot wurde ein spezieller Lysepuffer (vgl. Tab. 2.11) eingesetzt. Der Zugabe des Lysepuffers zu dem Zellpellet folgte eine ca. 20-minütige Inkubation auf Eis. Mithilfe eines Sonifikators wurden die Zellmembranen vollständig aufgeschlossen. In einer 5-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C wurden die Zelltrümmer pelletiert und der die Proteine enthaltende Überstand in ein sauberes 1,5 ml Eppi überführt. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgte bei -80 °C.

#### Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe erfolgte nach der Bradford-Methode. Diese beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums durch Bindung von *Coomassie brillinat blue* an Proteine von einer Wellenlänge von 465 nm hin zu 595 nm. Die Absorptionzunahme bei 595 nm korreliert mit der Proteinkonzentration der Probe [43].

Die Messung erfolgte in einem 1 ml Ansatz, wobei die Proben in einer Endkonzentration von 1:200 jeweils mit 200  $\mu$ l Bradford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) versetzt

wurden. Dem *blank* wurde statt der Menge Probe die entsprechende Menge an Lysepuffer zugegeben. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe eingesetzt, je eine 20  $\mu\text{g/ml}$ -, 10  $\mu\text{g/ml}$ - und 5  $\mu\text{g/ml}$ -BSA-Probe.

Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen wurden zunächst die Standard-Rohdaten der BSA-Verdünnungsreihe jeweils auf 1  $\mu\text{g/ml}$  umgerechnet und aus diesen Werten der Mittelwert  $\bar{x}$  ermittelt. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben in  $\mu\text{l/ml}$  ließ sich anschließend anhand der unten angegebenen Formel 2.4 berechnen. Der Verdünnungsfaktor  $V$  entsprach einem Wert von  $V = 200$ .

$$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = \frac{\text{Messwert}}{\bar{x}} \cdot V \quad (2.4)$$

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung eines Proteingemisches in seine Einzelbestandteile innerhalb eines elektrischen Felds nach dem jeweiligen Molekulargewicht durch eine poröse Polyacrylamidmatrix. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein Detergenz, das die meisten Proteine mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis bindet (1,4 g SDS pro 1 g Protein). Auf diese Weise entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe. Ein SDS-Polyacrylamid-Gel besteht in der Regel aus einem Sammelgel zur Fokussierung der Proteinprobe in einer scharfen Bande und einem Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung der Probe erfolgt. Man spricht auch von der sog. diskontinuierlichen SDS-PAGE. [43] Die Zusammensetzung des Sammelgels ist für jeden Western Blot gleich und der Tab. 2.12 zu entnehmen. Das Trenngel lässt sich je nach eingesetzter Menge an Polyacrylamid in verschiedenen Prozentigkeiten herstellen, je nach zu untersuchendem Protein und dessen Größe. Eine Übersicht der unterschiedlichen Gelzusammensetzungen in Bezug zur Proteingröße, sowie der jeweils verwendeten Primärantikörper zeigt Tab. 2.51. Die exakte Zusammensetzung der verschiedenen Trenngel ist der Tab. 2.13 zu entnehmen. Bei APS und TEMED handelt es sich um die Starter der Polymerisation des Polyacrylamids. Sie wurden erst zum Schluss hinzugefügt. Es wurde eine Polymerisationszeit von 30 Minuten für das Trenngel und 15 Minuten für das Sammelgel abgewartet.

Für die Gelelektrophorese wurden die aufgetauten Proteinlysate mit 1 x SDS-Ladepuffer versetzt. Durch das enthaltende SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol wurden die Proteine linearisiert. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben zusätzlich 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Neben den Proben wurde ein Protein-Größenstandard auf das Gel aufgetragen, anhand dessen die jeweiligen Proteingrößen schließlich identifiziert werden konnten. Für die Vergleichbarkeit der Proben untereinander wurden je nach Blot 20 bzw. 40  $\mu\text{g}$  Protein pro Probe aufgetragen. Die

Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und für die Elektrophorese pro Gel eine Stromstärke von 20 mA angelegt.

*Tabelle 2.51: Übersicht über die durchgeführten Western Blots*

Gel	Protein	Größe	Primärantikörper	AK-Verdünnung
6 %	Tiam1	200 kD	anti-Tiam1 (C-16) sc-872	1:200
8 %	$\Delta$ N-ERG	55 kD	Erg - 1/2/3 (C-20) sc-353	1:500
	$\beta$ -Catenin	94 kD	anti- $\beta$ -Catenin	1:1000
12 %	TIMP1	28 kD	anti-TIMP-1 BP858	1:500
	TIMP2	21 kD	anti-TIMP-2 (3A4)	1:200
12-15 %	Rac	21 kD	anti-rac1 Mab	1:1000

### Protein-Blot

Der SDS-PAGE folgte das Blotten der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran, d.h. die elektrophoretische Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran. Die Bindung an die Membran findet auf der Grundlage von hydrophoben Wechselwirkungen statt. Um die Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu aktivieren wurde dem Transfer-Puffer Methanol [20 %] zugesetzt. Geblottet wurde aufgrund der negativen Ladung der Proteine in Richtung der Anode. Je größer das Molekulargewicht des Proteins, desto länger muss geblottet werden, da die Übertragung bei großen Proteinen wesentlich schlechter abläuft [43]. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Westerblots wurde jeweils 90 Minuten bei 90 V geblottet.

Im Anschluss an das Blotten wurde die erfolgreiche Auftrennung der Proteine während der Elektrophorese in Form von Banden mithilfe der Ponceau-Färbung dokumentiert. Ponceaurot färbt Proteine auf Nitrocellulosemembranen reversibel an und eignet sich besonders bei Proteinmengen von mehr als 50 ng pro Bande. Die enthaltene Trichloressigsäure fixiert die Proteine auf der Membran. Ponceaurot ist UV-sensibel. [43] Für die Ponceaufärbung wurde die Membran vollständig mit der Färbelösung benetzt und durch mehrmaliges Waschen mit dH<sub>2</sub>O die Proteinbanden kontrastiert. Vor der Immundetektion wurde das Ponceaurot durch mehrmaliges Waschen mit dH<sub>2</sub>O bzw. TBST-Waschpuffer vollständig entfernt.

## Immundetektion

Die Darstellung spezifischer Proteinbanden innerhalb des geblotteten Proteinmusters gelang über Antigen-Antikörper-Interaktionen. Bei dem Primärantikörper handelt es sich um einen Anti-Antigen-Antikörper, der spezifisch an das Zielprotein bindet. Der Sekundärantikörper, ein Anti-Antikörper-Antikörper, ist fluoreszenzmarkiert und bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Das Zielprotein konnte somit über indirekte Immunfluoreszenz am LiCor Odyssey nachgewiesen werden. [43]

Vor der eigentlichen Antikörperinkubation wurde die Blockierung der Membran mithilfe eines Blockingpuffers aus TBST mit 3 % Magermilchpulver und 1 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Roller durchgeführt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die freien Proteinbindungsstellen wurden so gesättigt und unspezifische Reaktionen zwischen Antikörper und Membran auf diese Weise verhindert. Der Blockierung folgten drei Waschschritte à 5 Minuten mit TBST-Waschpuffer auf dem Roller.

Die Primärantikörper wurden jeweils in Blockingpuffer (TBST mit 3 % Magermilchpulver und 1 % BSA) verdünnt, mit Ausnahme des ERG-Antikörpers. Dieser wurde in 5%iger Milch verdünnt. Die verwendeten Primärantikörper und deren eingesetzte Verdünnung sind der Tab. 2.51 zu entnehmen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Roller. Dieser folgten wiederum drei Waschschritte à 5 Minuten mit TBST-Waschpuffer auf dem Roller, um unspezifisch gebundene Antikörper-Moleküle zu eliminieren, die sonst in falsch positiven Banden resultieren würden. Als Sekundärantikörper wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper zur Detektion am LiCor Odyssey mit Fluoreszenzmaxima von 680 bzw. 800 nm in einer Verdünnung in Blockingpuffer von 1:10.000 verwendet. Dabei ist die Spezies des Primärantikörpers - Hase bzw. Maus - zu beachten, damit der Sekundärantikörper den Fc-Teil des Primärantikörpers erkennen kann. Während der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Roller musste die Antikörperlösung vor Licht geschützt werden, um die Fluoreszenz zu erhalten. Der Antikörperinkubation folgten zwei Waschschritte mit TBST à 5 Minuten auf dem Roller bei Raumtemperatur. Der letzte Waschschritt à 5 Minuten erfolgte mit TBS, um das Tween herauszuwaschen, das die Detektion mithilfe des LiCor Odyssey stört. Abschließend wurden die Ergebnisse der Proteindetektion mithilfe des LiCor Odyssey über die Bestimmung des Fluoreszenzsignals visualisiert.

Um die Proteinexpressionlevel in verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können und eventuelle Auftragsfehler und damit verbundene Quantitätsunterschiede in den unterschiedlichen Laufbahnen detektieren zu können, wurde zusätzlich zu jedem Zielprotein die Expression des  $\alpha$ -Tubulins als Referenzprotein analysiert.  $\alpha$ -Tubulin ist Bestandteil der Mikro-

tubuli jeder eukaryotischen Zelle [13]. Es wird somit in allen Zellen gleichermaßen exprimiert und eignet sich gut als Referenzprobe. Auf diese Weise können untereinander abweichende Proteinmengen als Grund für die unterschiedlichen Expressionslevel der verschiedenen Zelllinien ausgeschlossen und diese Expressionsunterschiede exakt auf die Unterschiede der untersuchten Zelllinien selbst bezogen werden.

### 2.2.20 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Proliferationsassay, d.h. er misst das Wachstum humaner Zellen. Zudem ermöglicht er die Beurteilung des Vitalitätsstatus der Zellen. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein gelbliches, wasserlösliches Reagenz. Es wird in vitalen Zellen zum blau-violetten, alkohollöslichen Formazan reduziert. Diese Reaktion ist abhängig von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH. Die Menge des gemessenen Farbstoffs ist folglich abhängig von der Glykolyserate der Zellen. Aus der ermittelten Formazankonzentration im Ansatz lässt sich auf die Zahl vitaler Zellen rückschließen. [44, 45]

Für den MTT-Test wurden am Tag 0 5.000 Zellen pro transfizierter Zelllinie in 96-wells ausgesät. Für jeden Messtag (Tag 1-5) wurde eine 96-well-Platte mit insgesamt 12 wells pro Zelllinie vorbereitet. Eine genaue Bestimmung der Zellzahl war hier besonders wichtig, da jeder Ansatz mit demselben Ausgangswert beginnen sollte, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Als Referenzprobe wurden für jeden Messtag 6 wells mit Nährmedium angesetzt.

Durchführung (jeweils an den Tagen 1- 5):

1. Zugabe von 25  $\mu$ l MTT pro well (25  $\mu$ l auf 100  $\mu$ l Ansatz). Inkubation für 2- 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank.

Während dieser Inkubationszeit wird in den vitalen Zellen das MTT zu wasserunlöslichen Formazan-Kristallen reduziert. Dieser Vorgang wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert, um ein vermehrtes Zugrundegehen der Zellen bei zu großer intrazellulärer Formazan-Konzentration frühstmöglich zu erkennen und die Inkubation zu beenden.

2. Das Medium wurde entfernt, durch 100  $\mu$ l DMSO ersetzt und 10-20 Minuten schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert.

DMSO lysiert die Zellen, so dass die gebildeten Formazan-Kristalle freigesetzt werden. Die freigesetzten Kristalle lösen sich in der alkoholischen Lösung auf.

3. Die Formazan-Konzentration wurde photometrisch mithilfe eines ELISA-Messgeräts bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 655 nm ermittelt. Aus

den Rohdaten ließ sich anschließend anhand der Referenzprobe durch Subtraktion der Absorptionsgrad ermitteln.

### **2.2.21 Scratch-Assay**

Zur orientierenden Beurteilung des Einflusses der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Migrationsverhalten der transfizierten Zellen wurde zunächst ein Scratch-Assay durchgeführt. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  stabil transfizierte HEK293-Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät. Sobald die Zellen einen konfluenten Monolayer bildeten, wurde mithilfe einer feinen Pipettenspitze ein Spalt in den Zellrasen gerissen. Die Abnahme der Spaltbreite, d.h. das Migrationsverhalten, wurde in regelmäßigen Abständen unter dem Mikroskop kontrolliert und anhand von Fotos dokumentiert.

### **2.2.22 Transwell-Migrations-Assay**

Mithilfe des Transwell-Migrations-Assays wurde die Fähigkeit zur fibronectinabhängigen Migration der mit  $\Delta$ N-ERG transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie untersucht. Die Durchführung erfolgte wie von Engers et al. beschrieben [46]. Es wurden zunächst Transwells mit einem Porendurchmesser von  $8 \mu\text{m}$  mit Fibronectin beschichtet. Fibronectin ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das unter anderem eine wichtige Rolle im Rahmen der Regulation von Zellmigration und -differenzierung einnimmt. [13, 41] Für die Beschichtung wurden zunächst die jeweiligen Transwells in 24-wells gesetzt.  $150 \mu\text{l}$  der Fibronectinlösung [ $10 \mu\text{g/ml}$ ] wurden in jedes Transwell sowie  $950 \mu\text{l}$  dieser Lösung in das darunterliegende 24-well gegeben. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Während dieser Inkubationszeit wurden die zu untersuchenden Zellsuspensionen vorbereitet. Es sollten jeweils 50.000 Zellen in  $150 \mu\text{l}$  pro Transwell ausgesät werden. Für einen sechsfachen Ansatz wurden demnach 350.000 Zellen in  $1050 \mu\text{l}$  Optimem gelöst. Die Zellen wurden mithilfe von Trypsin/EDTA von ihrer Wachstumsunterlage gelöst und die Zellzahl bestimmt. 350.000 Zellen wurden anschließend in ein  $1,5 \text{ ml}$  Eppi überführt und 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abpipettiert und das entstandene Zellpellet in  $1050 \mu\text{l}$  Optimem-Medium gelöst.

Nach der einstündigen Inkubation wurden die Transwells zunächst von der Fibronectinlösung befreit und anschließend in sterilem Wasser gespült. Hierfür wurden 24-wells mit  $500 \mu\text{l}$  sterilem Wasser gefüllt, die beschichteten Transwells hineingesetzt und  $150 \mu\text{l}$  steriles Wasser in die Transwells gegeben. Abschließend wurde in eine weitere 24-well-Platte  $500 \mu\text{l}$  konditioniertes Medium vorgelegt, das sterile Wasser aus den Transwells entfernt und die gespülten

Transwells in die vorbereiteten 24-wells platziert. 150  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in die jeweiligen Transwells gegeben und der Ansatz für zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wandern die migrationsfähigen Zellen entlang der Fibronectinmoleküle in Richtung des konditionierten Mediums, welches in diesem Versuch als Chemoattractant fungiert.

Für die Fixierung und Färbung der migrierten Zellen wurden die Transwells zunächst mithilfe eines Wattestäbchens von nicht migrierten Zellen befreit. Es folgte die Fixierung für 5 Minuten in eiskaltem Methanol mit anschließender Spülung in dH<sub>2</sub>O. Anschließend wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) der Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Transwells zunächst 5 Minuten in Hämalaun inkubiert und anschließend 5 Minuten in dH<sub>2</sub>O gebläut. Hämalaun färbt die Zellkerne blau an. Die Rotfärbung des Zytoplasmas erfolgte durch eine 5-minütige Inkubation in Eosin. Die gefärbten Membranen wurden erneut in dH<sub>2</sub>O gespült. Nach jedem Schritt wurden die Transwells mithilfe eines Wattestäbchens gereinigt. Abschließend folgte die Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 50, 70, 96 und 100%igem Ethanol. Die Membranen der Transwells wurden letztlich mit einem Skalpell herausgeschnitten, in Xylol getaucht und mit den migrierten Zellen nach oben auf einen Objektträger gelegt. Zum Eindeckeln wurde ein Tropfen Eukitt auf jede Membran gegeben und das Deckglas blasenfrei darauf gelegt.

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der migrierten Zellen am Mikroskop.

### **2.2.23 Matrigel-Invasions-Assay**

Mithilfe des Matrigel-Invasions-Assays lässt sich die Fähigkeit der Zellen zu aktiver Invasion untersuchen. Die mit Matrigel beschichteten Transwells stellen ein Modell für natürliche Basalmembranen dar, die nur durch aktive Invasion der Zellen überwunden werden können. Es handelt sich dabei um eine Abfolge aus Adhäsion der Zellen an die Basalmembran, Abbau der Matrix durch Sekretion von Enzymen und Migration durch die entstandenen Poren in Richtung eines Chemoattractants [47]. Die Durchführung erfolgte wie von Engers et al. beschrieben [46].

Für diesen Assay wurden Transwells verwendet, deren Membranen Poren mit einem Durchmesser von 8  $\mu$ m aufweisen. Sie wurden in 24-wells platziert und zweimalig mit 12,5  $\mu$ l einer Matrigellösung [250  $\mu$ g/ml] beschichtet. Jeder Beschichtung folgte eine 30-minütige Inkubation der Transwells bei 37 °C, in der die Matrigelschicht aushärten konnte. Als Chemoattractant wurden 500  $\mu$ l konditioniertes Medium in jedes well pipettiert. Aus den zu untersuchenden Zellen wurde eine Zellsuspension von 50.000 Zellen/ 50  $\mu$ l Optimem-Medium hergestellt. Hierfür

wurden die Zellen von ihrer Wachstumsunterlage mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Für den sechsfachen Ansatz wurden 350.000 Zellen in ein 1,5 ml Eppi gegeben und 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und das entstandene Pellet mit Optimem-Medium gewaschen. Abschließend wurde zur Endeinstellung der Konzentration 350  $\mu$ l Optimem-Medium hinzugefügt und das Pellet gut resuspendiert. Jeweils 50  $\mu$ l der hergestellten Zellsuspension, d.h. 50.000 Zellen, wurden in jedes Transwell auf das ausgehärtete Matrigel ausgesät. Der Invasions-Assay wurde anschließend 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit sollten die Zellen die Matrigelschicht in Richtung des konditionierten Mediums aktiv durchdringen. Der Inkubation folgte die Fixierung und Färbung der invadierten Zellen auf den Transwellmembranen. Diese erfolgte analog zur Fixierung und Färbung des Migrations-Assays (vgl. Kap.2.2.22).

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der invadierten Zellen am Mikroskop.

#### 2.2.24 Gelatin-Zymographie

Mithilfe der Gelatin-Zymographie wurden Expressionslevel und Aktivität von den invasionsrelevanten Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 semiquantitativ bestimmt. Matrix-Metalloproteasen werden von den Zellen in das Nährmedium sezerniert und sind somit in den Überständen detektierbar.

Die Durchführung der Gelatin-Zymographie erfolgte wie bei Engers et al. beschrieben [46]. Es wurden zunächst je  $7,5 \times 10^6$   $\Delta$ N-ERG transfizierte HEK293-Zellen sowie Kontrollzellen in Schalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. 24 Stunden nach Ersatz des Nährmediums durch 10 ml serumfreies Optimem wurden die Überstände abgenommen und zunächst für 3 Minuten bei 100 g und 4 °C zentrifugiert, um die toten Zellen zu entfernen. Die sauberen Überstände wurden anschließend auf das jeweilige Amicon gegeben und bei 4000 rpm für 45-60 Minuten zentrifugiert, um die von den Zellen sezernierten Proteine aufzukonzentrieren. Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Proteinproben erfolgte nach der Bradford-Methode (vgl. Kap. 2.2.19).

Für die anschließende Zymographie wurde ein 8%iges Agarose-Trenngel, wie in Tab. 2.20 beschrieben, vorbereitet. Die Zusammensetzung gleicht den herkömmlichen SDS-Polyacrylamid-Trenngelen, enthält zusätzlich allerdings 0,2 % Gelatine. Das Sammelgel entspricht dem Sammelgel des Western Blots (Zusammensetzung vgl. Tab. 2.12).

Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Protein aus den Überständen 1:1 mit 2 x Ladebuffer (vgl. Tab. 2.19) versetzt, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Dies dient der Denaturierung der Proteine und ist wichtige Voraussetzung für die Protein-

auftrennung nach ihrer molekularen Größe. Anschließend wurden die Proben auf das polymerisierte Polyacrylamidgel aufgetragen und eine Stromstärke von 18 mA pro Gel angeschlossen. Nach vollständiger Auftrennung der Proteine wurde das Gel in eine Schale gelegt und in 2,5%iger Triton X-100 Lösung für 1 Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Triton X-100 Lösung wurde nach 30 Minuten erneuert. Dieser Inkubationsschritt entfernt das SDS aus dem Gel. Anschließend folgte die 36-stündige Inkubation bei 37 °C auf dem Schüttler in Reaktionspuffer, wobei der Puffer nach der ersten Stunde erneuert wurde. In dieser Phase renaturieren die Proteine, sie kehren in ihre funktionsfähige Struktur zurück. Auf diese Weise sind die in den Proben enthaltenen Matrix-Metalloproteasen (MMP) in der Lage die Gelatine abzubauen.

Für die Färbung wurde das Gel 3-4 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler in Färbelösung inkubiert. Das darin enthaltene Coomassie-Blau R 250 färbt die im Gel enthaltene Gelatine. In den Größenbereichen, in denen sich die jeweiligen aktiven MMP's befinden, wurde die Gelatine abgebaut, so dass hier weiße, ungefärbte Banden nachweisbar wurden. Abschließend wurde das Gel bei 37 °C auf dem Schüttler in Entfärbelösung inkubiert, um die MMP-Banden zu kontrastieren. Es folgte die Fotodokumentation und Trocknung des Gels.

### 2.2.25 Rac-Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der Aktivität der Rho-ähnlichen GTPase Rac in den  $\Delta$ N-ERG-transfizierten HEK293-Zellen wurde ein Rac-Aktivitätsassay nach der Methode von Sander et al. durchgeführt [48]. Hierbei wird aktiviertes Rac zunächst durch die Bindung an GST-Fusionsprotein-*beads* aus dem Zelllysate herausgefischt und anschließend mithilfe eines Western Blots analysiert.

Für die Herstellung des GST-Fusionsproteins wurden 5 ml  $LB_{Amp}$ -Medium mit dem GST-PAK-CD-Konstrukt beimpft und über Nacht inkubiert. Das GST-PAK-CD-Konstrukt enthält die Bindungsdomänen von Rac. Am nächsten Tag wurde dieser Ansatz in 50 ml  $LB_{Amp}$ -Medium 1:10 verdünnt und die optische Dichte bei 600 nm am Photometer bestimmt. Bei einer optischen Dichte von  $OD = 0,3$  wurde Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt und 2 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Während dieser Zeit wird die Produktion des GST-Fusionsproteins durch die Aktivierung des Laktose-Operons induziert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien bei 4000 g und 4 °C 10 Minuten lang abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml Bakterienlysepuffer (incl. 400  $\mu$ l Proteaseinhibitor) lysiert und der Ansatz 2 Minuten lang unter ständigem Kühlen sonifiziert um alle Zellmembranen vollständig aufzuschließen und die darin enthaltenen Proteine herauszulösen. Anschließend wurde das Lysat

45-60 Minuten bei fullspeed und 4 °C zentrifugiert und somit die Zelltrümmer pelletiert. Der saubere Überstand mit den GST-Fusionsproteinen wurde in ein 50 ml Falcon überführt.

Für die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden Glutathion Sepharose<sup>TM</sup> 4B-Suspensionen, sog. *beads* der Firma GEHealthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Schweden) verwendet. Diese wurden zunächst dreimal in 1 ml Bakterienlysepuffer mit anschließender Abzentrifugation des Pellets bei fullspeed für 20 Minuten gewaschen. Mithilfe des Bakterienlysepuffers wurde abschließend eine 50%ige Suspension der beads hergestellt. 1 ml dieser Suspension wurde zu den oben im Überstand konzentrierten Fusionsproteinen gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C auf dem Roller wurde der Ansatz dreimal mit jeweils 10 ml Bakterienlysepuffer gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift eine 1-2-minütige Zentrifugation bei 1000 rcf und 4 °C durchgeführt wurde. Das entstandene Pellet wurde zwischen den jeweiligen Waschschriften nicht resuspendiert. Abschließend wurde das Pellet in 1 ml GST-Puffer gelöst.

Für die Herstellung der Zelllysate wurden  $5-10 \times 10^6$   $\Delta$ N-ERG-transfizierte HEK293-Zellen zunächst in sterilem, kaltem PBS gewaschen und nach einer 10-minütigen Inkubation in GST-Puffer 5 Minuten bei 13000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstands wurde mithilfe der Methode nach Bradford (vgl. Kap. 2.2.19) bestimmt.

Für die Präzipitation, das sog. *Fischen* des aktiven Racs aus den Proteinlysaten, wurden dem Zelllysate die Glutathion-Sepharose<sup>TM</sup> 4B-GST-Fusionsprotein-*beads* hinzugefügt und 1-2 Stunden auf dem Roller bei 4 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit binden die *beads* das aktive Rac, so dass dieses selektiv aus dem totalen Zelllysate isoliert werden kann. Anschließend wurde der Ansatz dreimal in GST-Puffer gewaschen, wobei die Zentrifugationen 30 Sekunden bei 3000 g durchgeführt wurden. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Puffer mithilfe einer Pipette vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 2 x SDS resuspendiert und bei 95 °C im Schüttler aufgekocht. Anschließend wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt, 90 Sekunden lang bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Eppi überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die entstandenen Immunpräzipitate (IP) wurden auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel im Vergleich zum totalen Zelllysate mittels Western Blot analysiert (vgl. Kap. 2.2.19)

### 2.2.26 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde für den morphologischen Nachweis von  $\beta$ -Catenin und seine Lokalisation in den Zellen bzw. an den Zell-Zell-Kontakten eingesetzt.

Hierfür wurden zunächst die verwendeten Deckgläser unter sterilen Bedingungen in die einzel-

nen 6-wells gelegt und mit 5%igem BSA beschichtet, um eine bessere Haftgrundlage für die Zellen herzustellen. Das BSA wurde in sterilem PBS verdünnt. Je 2,5 ml der Lösung wurde auf die Deckgläser getropft und die 6-well-Platte mit Parafilm verschlossen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden pro 6-well 300.000 stabil transfizierte HEK293-Zellen auf die Deckgläser ausgesät und nach 48 Stunden die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Alle Waschschriffe wurden mit PBS durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst in 37%igem Formaldehyd für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und nach einem kurzen Waschschriff 3 Minuten in 0,5%iges Triton-X100 gelegt. Zum Blocken von unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen wurden die zellbesetzten Deckgläser 45-60 Minuten in einer 1%igen BSA-Lösung inkubiert. Als Erstantikörper wurde der  $\beta$ -Catenin-AK in einer 1:50-Verdünnung (in BSA-Lösung) eingesetzt. 50  $\mu$ l der AK-Verdünnung wurden auf eine mit Parafilm bedeckte Unterlage getropft, das Deckglas darauf gelegt und für 60-90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS erfolgte die 60-minütige Inkubation mit einem Sekundärantikörper bei 37 °C (anti-rabbit, Verdünnung 1:1000 in BSA-Lösung). Zur Färbung des Zytoskeletts der Zellen enthielt die Sekundärantikörperlösung 0,1 % Tritc-Phalloidin. Aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften des Sekundärantikörpers erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Der Inkubation folgte ein weiterer Waschschriff. Für die Färbung des Zellkerns wurde DAPI in einer 1:1000-Verdünnung für 10 Minuten auf die Zellen gegeben. Nach abschließendem Waschen wurden die zellbesetzten Deckgläser mit einem Tropfen Vectashield eingedeckelt und die Ränder mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die Auswertung erfolgte am konfokalen Mikroskop.

### 2.2.27 Colony-Formation-Assay

Anhand des Colony-Formation-Assays wurden die transformierenden Effekte der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen untersucht. Es wurde untersucht, inwieweit das Zellwachstum der transfizierten Zellen noch über den Mechanismus der Kontaktinhibition reguliert wird. Nicht transformierte Zellen werden durch die sich ausbildenden Zell-Zell-Kontakte in ihrem Wachstum gehemmt, sie bilden einen konfluenten *Monolayer*. Transformierte kanzeröse Zellen hingegen wachsen weiter und bilden auf diese Weise sog. Kolonien [49]. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie von Engers et al. beschrieben [50]. Für die Beurteilung der Koloniebildung von stabil mit dem  $\Delta$ N-ERG-Konstrukt transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie wurden jeweils  $7,5 \times 10^6$  Zellen in Schalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Diese wurden anschließend bei 37 °C inkubiert und die Koloniebildung in regelmäßigen Abständen kontrolliert und mithilfe von Fotos dokumentiert.

### 2.2.28 Softagar-Assay

Zur weiteren Beurteilung der transformierenden Effekte der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen wurde die Fähigkeit zu adhäsionsunabhängigem Wachstum anhand des in der Forschung weit verbreiteten Softagar-Assays untersucht. Grundlegendes Prinzip des Assays ist es, die zu untersuchenden Zellen in einem sog. *toplayer*, einem modifizierten Agarosegel, zu vereinzeln, um sowohl Zell-Zell-Kontakte als auch die Adhäsion der Zellen am Boden der Zellkulturschale zu verhindern. Nur transformierte Zellen sind in einer solchen Umgebung in der Lage adhäsionsunabhängig zu wachsen und Kolonien zu bilden [51].

Zunächst wurden 6-wells mit einem sog. *baselayer* beschichtet. Die Zusammensetzung ist in Tab. 2.28 gezeigt. Alle Komponenten sollten eine Temperatur von 37 °C aufweisen. Es wurde zunächst eine 1,25%ige Agaroselösung hergestellt und autoklaviert. Die UV-Sterilisation erfolgte in flüssigem Zustand für 15-30 Minuten. Das doppelkonzentrierte RPMI-Medium wurde wie in Tab. 2.30 aufgezeigt hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,2-7,4 erfolgte mithilfe von 2 M NaOH. Jeweils 3 ml dieses Ansatzes wurden in ein 6-well gegeben und der *baselayer* bei 4 °C über Nacht ausgehärtet. Am folgenden Tag wurde der *toplayer* angesetzt (vgl. Tab. 2.29) und auf den ausgehärteten *baselayer* gegeben, 15 Minuten bei 4 °C und anschließend bei 37 °C inkubiert. Insgesamt wurden 2.500 Zellen pro well ausgesät. Zur Herstellung der Zellsuspension wurden die zu untersuchenden Zellen trypsiniert, 2.500 Zellen/ Ansatz pelletiert und in jeweils 257  $\mu$ l resuspendiert. Jede eingesetzte Zelllinie wurde in einem dreifachen Ansatz untersucht. Die Inkubation der 6-well-Platten erfolgte für die nächsten 2-3 Wochen im Brutschrank bei 37 °C. Um ein Austrocknen des Ansatzes zu vermeiden, wurde der *toplayer* zweimal pro Woche tropfenweise mit Nährmedium beschichtet.

Nach 24 Stunden wurden zunächst Referenzbilder aufgenommen, die zeigten, dass die Zellen vereinzelt im *toplayer* ausgesät wurden. Im Verlauf wurde dann das Koloniewachstum immer wieder unter dem Mikroskop beurteilt und anhand von Fotos dokumentiert.

### 2.2.29 Statistische Datenanalyse

Die Statistischen Berechnungen erfolgten mithilfe der SPSS-Software Version 20. Für den Signifikanztest zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test angewendet. Als Signifikanzniveau wurde ein  $p$ -Wert von  $p \leq 0,05$  festgelegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der funktionellen Relevanz der TMPRSS2-ERG-Fusion für die Entstehung und das Verhalten des Prostatakarzinoms am *in-vitro*-Modell. Hierfür wurde zunächst die häufigste Fusionsvariante T1/E4 in einen Expressionsvektor kloniert, um dieses Konstrukt anschließend in benigne humane Prostataepithelzellen (BPH1) zu transfizieren. Aufgrund wiederholt auftretender Probleme während der Klonierung des  $\Delta$ N-ERG-Konstrukts bedurfte es im Verlauf dieser Arbeit mehrerer Strategiewechsel und Optimierungsschritte. Die initiale Strategie sah die Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz mittels PCR aus der NCI-H660-Zelllinie und die anschließende Integration dieser Sequenz in einen Expressionsvektor mit eukaryotischer Antibiotikaresistenz für die spätere Selektion stabil transfizierter Zelllinien vor. Bei der NCI-H660-Zelllinie handelt es sich um Zellen, die die TMPRSS2-ERG-Fusion homozygot aufweisen. Durch die Homozygotie der Fusion können die Auswirkungen der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression resultierend aus der Fusion gut untersucht werden, da kein Wildtyp-ERG exprimiert wird [33]. Als Expressionsvektoren wurden die pLZRS-Vektoren verwendet, die Standardvektoren des Labors, die für mögliche spätere Ko-Transfektionen und somit für den Vergleich mit bereits etablierten Konstrukten geeignet waren. Bei den eingesetzten Vektoren handelt es sich um dsDNA-Plasmide, die neben der *multiple cloning site* (MCS) mit ihren zahlreichen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen auch Selektionsgene, in der Regel Gene für Antibiotikaresistenzen, enthalten. Auf diese Weise lassen sich positive Zellklone durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums selektionieren. Die in der PCR verwendeten Primer Nr.471 und Nr.472 (vgl. Tab. 2.1) enthalten neben den Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen EcoR V (Primer Nr.471) und Xho I (Primer Nr.472) eine Myc-Tag-Sequenz. Das Myc-Tag wurde integriert, um das  $\Delta$ N-ERG-Protein später in den transfizierten Zellen detektieren zu können, da bis dato ein ERG-Antikörper kommerziell noch nicht erhältlich war.

Für die Klonierung wurde die RNA aus der Zelllinie NCI-H660 mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert und anschließend durch Reverse Transkription in cDNA umgewandelt.

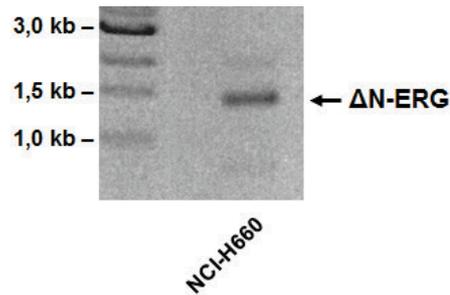


Abbildung 3.1: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus cDNA der NCI-H660-Zelllinie.

Die Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz erfolgte wie in Tab. 2.32 und Tab. 2.33 dargestellt unter Einsatz der Primer Nr.471 und Nr.472 (vgl. Tab. 2.1) sowie unter Verwendung der Dream Taq Polymerase (Fermentas, St.Leon-Rot). Pro Ansatz wurden 75ng cDNA eingesetzt. Die Erfolgskontrolle erfolgte mithilfe der Agarosegelelektrophorese.

Wie in Abb. 3.1 dargestellt, zeigte sich eine deutliche Bande in der erwarteten Höhe von 1300bp, die der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz zugeordnet werden konnte. Nach durchgeführter Gelextraktion war die resultierende Konzentration der Probe allerdings zu gering, um den notwendigen Restriktionsverdau und die anschließende Ligation durchzuführen.

Auch nach mehrfachen Wiederholungen ließ sich die  $\Delta$ N-ERG-Sequenz nicht in ausreichender Menge amplifizieren. Möglicherweise war die  $\Delta$ N-ERG-Expression in der NCI-H660-Zelllinie nicht stark genug, um die Sequenz mittels PCR und Gelextraktion erfolgreich zu isolieren.

Im Folgenden wurden daher verschiedene Gewebeproben der Prostata auf ihre  $\Delta$ N-ERG-Expression untersucht. In den nicht-kancerösen Prostatagewebeproben zeigte sich keine mittels Agarosegelelektrophorese detektierbare  $\Delta$ N-ERG-Expression.

Daraufhin wurden Tumorproben der Prostata sowie die Zelllinien LNCaP, PC-3 und BPH1 untersucht. Die NCI-H660-Zelllinie wurde in den Reaktionen als Vergleichsprobe eingesetzt. Die isolierten RNA-Proben wurden in einer Reversen Transkription in cDNA umgewandelt und die PCR, wie in Tab. 2.32 und Tab. 2.33 aufgezeigt, durchgeführt.

Abb. 3.2 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese nach erfolgter PCR. Die untersuchten PC-3- und BPH1-Zellen wiesen keine detektierbare  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf, die LNCaP-Zelllinie nur eine sehr schwache Expression. Ausschließlich aus der NCI-H660-Zelllinie und der Tumorprobe 727T ließ sich  $\Delta$ N-ERG gut amplifizieren, was sich in einer deutlich fluoreszierenden Bande bei 1300bp zeigte. Dennoch gelang es nicht, ausreichend Material dieser Ansätze aus dem Agarosegel zu extrahieren, um die Klonierung fortzuführen.

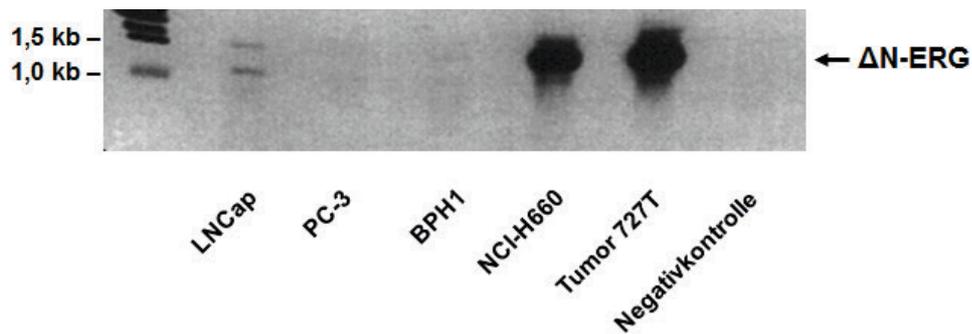


Abbildung 3.2: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus cDNA verschiedener Zelllinien und der Tumorprobe 727T.

Auf Grundlage der oben gezeigten Ergebnisse wurden weitere Tumorgewebebeurproben ausgewählt und mittels PCR untersucht. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.3. Die  $\Delta$ N-ERG-Expression zeigte sich je nach Tumorprobe in der durchgeführten Agarosegelelektrophorese in ausgeprägten Banden in Höhe von 1300bp, allerdings traten in einzelnen Proben zusätzliche Banden verschiedener Größen auf.

Zur Optimierung der Amplifikationsreaktion, um damit eine scharfe  $\Delta$ N-ERG-Expressionsbande zu erzielen, wurden die PCR-Bedingungen schrittweise verändert. Details hierzu sind im Kap. 2.2.3 dargestellt. Das aus den Optimierungsschritten resultierende PCR-Protokoll für die Taq-DNA-Polymerase ist den Tabellen Tab. 2.34 und Tab. 2.35 zu entnehmen. Das Problem der zum Teil geringen Extraktionskonzentration konnte durch die durchgeführten Optimierungsschritte nicht gelöst werden, unspezifische Banden jedoch verschwanden. Durch längere Laufzeiten in der Agarosegelelektrophorese konnten die PCR-Produkte genauer aufgetrennt wer-

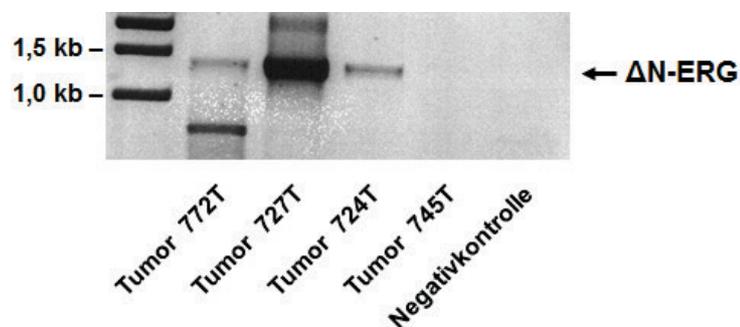


Abbildung 3.3: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus verschiedenen Tumorproben sowie zum Vergleich der Expressionslevel untereinander.

den und es fanden sich im Verlauf immer wieder Doppelbanden in der Höhe von 1300bp sowie zusätzliche Banden, die bis dahin keiner bekannten Sequenz zugeordnet werden konnten. Um eine mögliche Degradation der cDNA als Fehlerquelle auszuschließen wurde eine erneute Reverse Transkription der RNA aus Tumorgewebe durchgeführt und die Qualität der neuen cDNA anhand einer GAPDH-PCR überprüft (vgl. Kap. 2.2.3). Diese ergab Hinweise auf eine schlechte Qualität der Ausgangs-RNA, woraufhin frische RNA aus Prostatakarzinomgewebe (Probe T21005) isoliert und revers transkribiert wurde. Die neu gewonnene cDNA der Probe T21005 wurde für weitere Optimierungen eingesetzt.

Der Primer Nr.471 enthält, wie oben beschrieben, ein Myc-Tag. Es handelt sich dabei um eine relativ lange Sequenz aus 33 Basen, die als 5'-Überhang möglicherweise die Bindungseigenschaften des Primers beeinflusst. Aus dieser Überlegung heraus wurde der Primer Nr.471 durch den Tag-losen Primer Nr.477 ersetzt (vgl. Tab. 2.1). Dieser enthält neben derselben  $\Delta$ N-ERG-Bindungssequenz eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease Sma I. Zusätzlich wurde das anhand der Taq-DNA-Polymerase etablierte PCR-Protokoll nun auf die Pfu-DNA-Polymerase übertragen, die aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion die Sequenz-Amplifikation wesentlich exakter durchführen kann. Der endgültige Reaktionsansatz ist Tab. 2.36 zu entnehmen.

Trotz der oben beschriebenen Optimierungsmaßnahmen waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend. Die Doppelbande blieb und auch die Gelextraktion erbrachte schlechte Konzentrationen des in der Ligation einzusetzenden Inserts. Die vielfach frustrierten Gelextraktionen mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) stellten ein arbeitsgruppenübergreifendes Problem dar, welches abschließend nicht geklärt werden konnte. Die Ligation und Transformation erbrachten zwar zum Teil viele Kolonien auf den LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten, in der durchgeführten Kolonie-PCR ließen sich allerdings keine positiven Klone nachweisen.

Es wurden schließlich neue Primer für eine Klonierung mit glatten Enden ausgewählt. Diese sog. *match*-Primer Nr.540 und Nr.557 (vgl. Tab. 2.1) ohne integrierte Schnittstelle sind 100%ig komplementär zu der zu amplifizierenden  $\Delta$ N-ERG-Sequenz ohne Überhänge. Das amplifizierte Insert sollte nach einem Restriktionsverdau mit Sma I in den pMV-Vektor inkloniert werden. Allerdings blieb auch diese Klonierung erfolglos.

Klezovitch et al. publizierten zu der Zeit eine Arbeit in der ein  $\Delta$ N-ERG-Konstrukt verwendet wurde [30]. Dieses Plasmid wurde uns auf Anfrage freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die N-terminal trunke ERG-Sequenz war im pMAX-Vektor enthalten (Konstrukt-Nr.3135, vgl. Tab. 2.3). Da der pMAX-Vektor allerdings nur für transiente Transfektionen geeignet ist, musste die  $\Delta$ N-ERG-Sequenz in einen Vektor für stabile Transfektionen mit eukaryotischem

Selektionsmarker umklont werden. Hierfür wurde der  $\Delta$ N-ERG-Klon zunächst sowohl in Vorwärts- als auch in Rückwärtsrichtung sequenziert und eine entsprechende Vektorkarte erstellt. Die anschließende Umklonierung wurde zunächst über Pst/Xba I in den pMV0-Vektor und anschließend über Pst/Not I, Pst/Xho I bzw. blunt über EcoR V in den pCND3.1zeo-Vektor versucht. Alle Ansätze der Umklonierung waren wiederholt erfolglos.

Da verschiedenste Klonierungsstrategien und Optimierungsversuche sowie die Umklonierung des pMAX-Vektors, wie zuvor beschrieben, erfolglos blieben, wurde abschließend das Klonierungskit CloneJET<sup>TM</sup> PCR Clone Kit der Firma Fermentas (St.Leon-Rot) eingesetzt. Das Kit basiert auf dem Prinzip der *blunt*-Klonierung von PCR-Produkten in den linearisierten pJet1.2-Vektor. Ein Restriktionsverdau sowohl des Inserts als auch des Vektors war daher nicht notwendig. Die  $\Delta$ N-ERG-Amplifikation wurde, wie in den Tabellen 2.34 - 2.36 dargestellt, parallel mithilfe der Pfu- sowie der Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Die verwendete cDNA entstammte der aus frischem Prostatatumorgewebe isolierten RNA (T21005). Als Primer wurden die Oligonukleotide Nr.540 (fwd) und Nr.557 (rev) (vgl. Tab. 2.1) verwendet.

Wie in Abb. 3.4 dargestellt, zeigte sich sowohl im Pfu- als auch im Taq-Ansatz jeweils eine deutliche Bande in Höhe von 1300bp, die der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz zugeordnet werden konnte. Die Banden der  $\Delta$ N-ERG-Amplifikation wurden mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden), wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben, aus dem Gel extrahiert. Die Ligation erfolgte anschließend mithilfe des CloneJET<sup>TM</sup> PCR Clone Kits nach Herstellerangaben (vgl. Kap. 2.2.12). 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurden für die Transformation von 100  $\mu$ l kompetenter DH5 $\alpha$ -Zellen eingesetzt. Nach der Inkubation der LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten über Nacht bei 37 °C wuchsen ausschließlich auf der Platte der Pfu-Reaktion zahlreiche Kolonien. Sowohl die Agar-

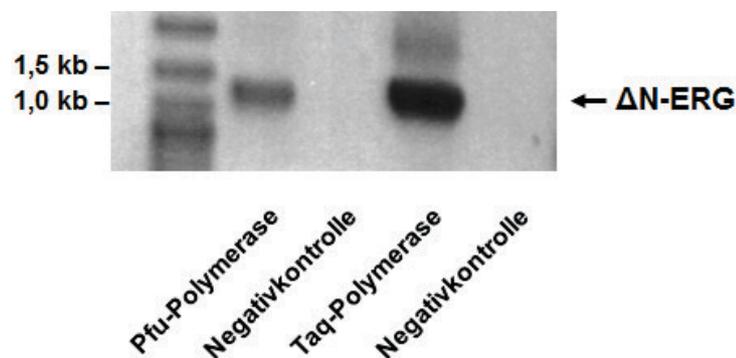


Abbildung 3.4: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus frischem Prostatatumorgewebe (T21005); Pfu- und Taq-DNA-Polymerase im Vergleich.

platte der Taq-Reaktion als auch die Negativkontrollen waren frei von Bewuchs. Eine repräsentative Auswahl der Pfu-Kolonien wurde mittels Kolonie-PCR nach Herstellerangaben überprüft. Die positiven Klone wurden zunächst in einer Plasmidpräparation im Maxi-Format aufbereitet und anschließend zur weiteren Kontrolle sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass die  $\Delta$ N-ERG-Sequenz erfolgreich in den pJet1.2-Vektor (Konstrukt-Nr.3134, vgl. Tab. 2.3) kloniert wurde, allerdings in ungünstiger 3'-5'-Orientierung. Eine Mutation der Sequenz aufgrund der Herkunft der Ursprungs-RNA aus Tumorgewebe bzw. infolge fehlerhafter Amplifikation während der Klonierung konnte ausgeschlossen werden.

Die direkte Umklonierung der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus dem pJet1.2- in den pLZRS.zeo- bzw. pLZRS.bsd-Vektor erbrachte keine positiven Klone, so dass  $\Delta$ N-ERG zunächst über Xba I und Not I in den Zwischenvektor pMV0 umkloniert wurde (Konstrukt-Nr.3136, vgl. Tab. 2.3). pMV0 ist für stabile Transfektionen nicht geeignet, weist für den Restriktionsverdau aber günstige Schnittstellen auf. Zudem trägt er ein HA-Tag, das durch günstig gewählte Restriktionsenzyme mit in den endgültigen Expressionsvektor transferiert wurde. Die abschließende Klonierung der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz incl. HA-Tag aus dem pMV0-Vektor in den 13 kb großen pLZRS-Vektor war ein weiteres Mal problematisch. Die versuchsweise durchgeführte Insertion in den Expressionsvektor pCDNA3.1zeo-Vektor mithilfe von Kpn I und Not I hingegen war erfolgreich. Die Klone wurden mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) präpariert und anschließend durch eine Sequenzierung verifiziert. Eine Mutation innerhalb der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden. Zwischen HA-Tag- und der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz zeigte sich allerdings ein Stopp-Codon, wodurch kein Fusionsprotein aus HA-Tag und ERG exprimiert werden konnte.

Um ein Konstrukt mit intaktem HA-Tag zu generieren und damit eine zusätzliche Detektionsmethode zu schaffen, wurde die *in vitro* Mutagenese nach Papworth et al. am Konstrukt Nr.3137 durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.13). Zur Elimination des Stopp-Codons war ein Basenaustausch notwendig. Der Erfolg wurde mithilfe von Sequenzierung und Vergleich der Sequenz mit der NCBI-Datenbank bestätigt.

Das  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo-Konstrukt Nr.3137 sowie das willentlich mutierte  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1 zeo-Konstrukt Nr.3142 wurden im Folgenden für die Transfektionen verwendet.

## 3.2 Transfektion

### 3.2.1 Transfektion humaner benigner Prostataepithelzellen (BPH1)

Der im ersten Teil dieser Arbeit durchgeführten Klonierung sollte nun die Transfektion humaner benigner Prostataepithelzellen (BPH1) mittels Lipofektion folgen. Hierfür wurden sowohl die  $\Delta$ N-ERG-Konstrukte  $\Delta$ N-ERG-pMAX Nr.3135,  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo Nr.3137 und Nr.3142 als auch das Kontrollkonstrukt, der pCDNA3.1zeo-Leervektor Nr.3129, eingesetzt (vgl. Tab. 2.3).

Um das optimale Reagenz sowie die optimalen Bedingungen für eine Transfektion humaner BPH1-Zellen zu bestimmen, wurden zunächst die  $\beta$ -Galaktosidase-Konstrukte Nr.1386 und Nr.2016 (vgl. Tab. 2.3) transfiziert. Die Transfektion dieser Konstrukte erlaubt nach der  $\beta$ -Gal-Färbereaktion die Identifikation erfolgreich transfizierter Zellen, die infolge des Umsatzes des Farbstoffes durch die exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase eine Blaufärbung aufweisen. Für die Transfektion wurden folgende Transfektionsreagenzien wie in Kap. 2.2.15 beschrieben eingesetzt: *SuperFect Transfection Reagent*, *Turbo Fect<sup>TM</sup> Reagent*, *GeneJuice<sup>®</sup> Transfection Reagent*, *Lipofectamin<sup>TM</sup> Reagent*, sowie *FuGENE<sup>®</sup> 6 Transfection Reagent*. Die ersten Auswertungen der Transfektion mit dem Lipofectamin<sup>TM</sup> Reagenz anhand der  $\beta$ -Gal-Färbung zeigten sehr geringe Transfektionseffizienzen, in Form von sehr wenigen blau angefärbten Zellen pro Gesichtsfeld. In den Herstellerangaben fanden sich große Variationsbreiten für die Mengen an eingesetzter Plasmid-DNA und eingesetztem Lipofectamin<sup>TM</sup> Reagenz, so dass in einem neuen Ansatz die Bedingungen vergleichend optimiert wurden (vgl. Kap. 2.2.15). Die besten Ergebnisse zeigten die Ansätze mit 0,4  $\mu$ g DNA und 5  $\mu$ l Lipofectamin<sup>TM</sup> Reagenz pro 25  $\mu$ l Medium bzw. 0,3  $\mu$ g DNA und 2,5  $\mu$ l Lipofectamin<sup>TM</sup> Reagenz pro 25  $\mu$ l Medium (vgl. Tab. 2.49).

Die Abbildung 3.5 zeigt für jedes eingesetzte Reagenz ein repräsentatives Gesichtsfeld der  $\beta$ -Gal-Färbung. In allen Ansätzen zeigte sich nur bei wenigen Zellen innerhalb eines Gesichtsfeldes eine Blaufärbung, d.h. eine Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens. Dies entspricht insgesamt sehr niedrigen Transfektionseffizienzen. Der abschließende Vergleich aller verwendeter Transfektionsreagenzien untereinander stellte das FuGENE<sup>®</sup> Transfektionsreagenz als bestes Mittel zur Transfektion von humanen benignen Prostataepithelzellen (BPH1) mit Effizienzen von ca. 5% heraus (vgl. Abb. 3.5).

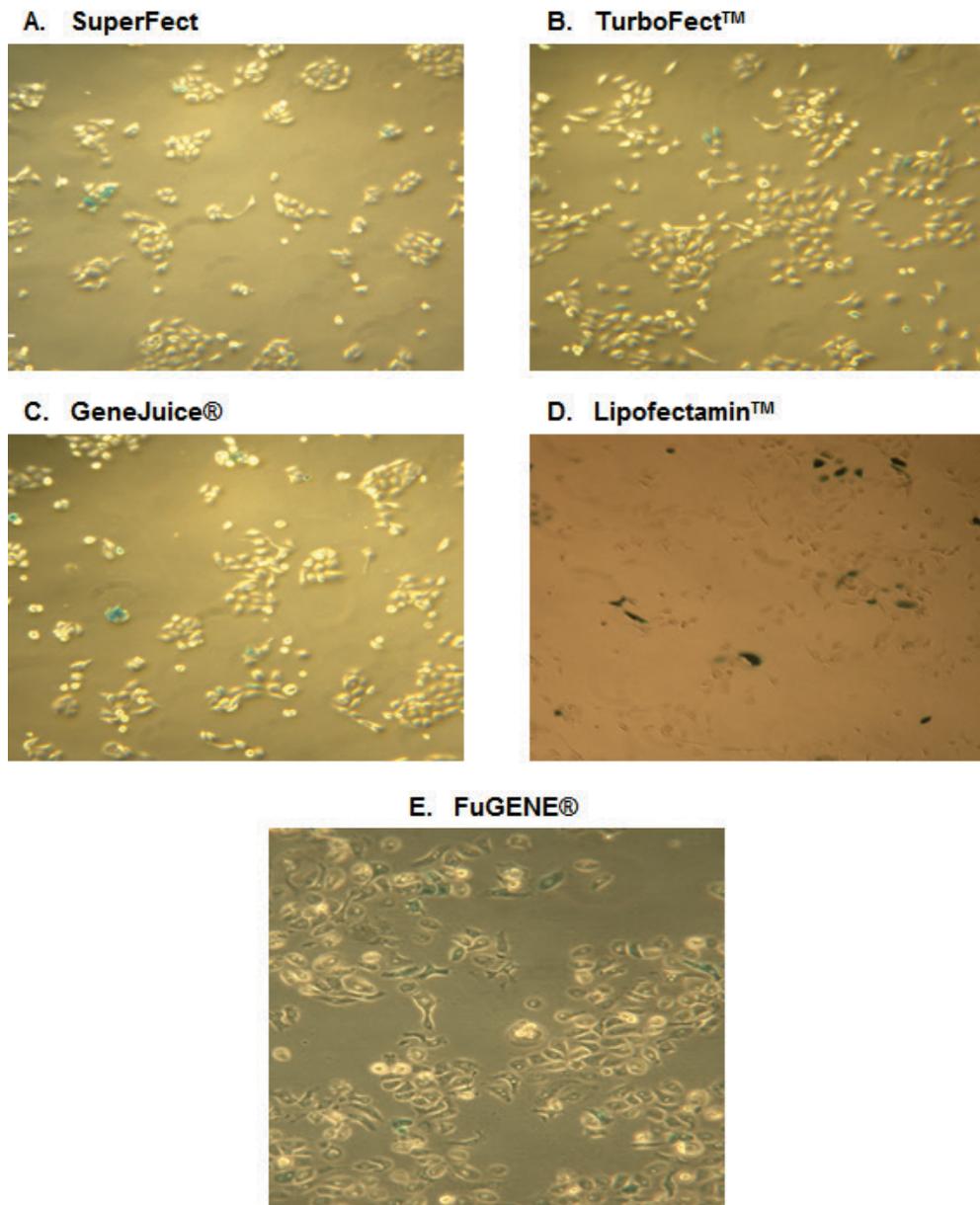


Abbildung 3.5: Repräsentative Gesichtfelder der  $\beta$ -Gal-Färbung der transfizierten humanen BPH1-Zellen zur vergleichenden Beurteilung der Transfektionseffizienz der unterschiedlichen Transfektionsreagenzien A. SuperFect Transfection Reagent B. TurboFect™ Reagent C. GeneJuice® Transfection Reagent D. Lipofectamin™ Reagent E. FuGENE® 6 Transfection Reagent

Die  $\Delta$ N-ERG-Konstrukte  $\Delta$ N-ERG-pMAX Nr.3135,  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo Nr.3137 und Nr.3142 sowie der pCDNA3.1zeo-Leervektor Nr.3129 wurden somit anschließend mithilfe des FuGENE<sup>®</sup> 6 Transfektionsreagenz in humane BPH1-Zellen transfiziert. Zur Überprüfung des Transfektionserfolges und der Expression des transfizierten Plasmids wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Hierfür wurde nach 48 Stunden die RNA der transient transfizierten Zellen mithilfe des RNeasy Mini Kits isoliert und in einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend in der quantitativen Real-Time-PCR analysiert. Hier zeigten sich - wie in Abb. 3.6 dargestellt - in allen RNA-Proben der mit  $\Delta$ N-ERG transfizierten Zellen ein signifikant höheres  $\Delta$ N-ERG-Expressionsniveau als im pCDNA3.1zeo-Leervektor (BPH1 mock (3129)). Trotz der geringen Transfektionseffizienzen war der Expressionsunterschied deutlich zu erkennen. Das zur Verfügung gestellte  $\Delta$ N-ERG-pMAX-Plasmid Nr.3135 mit seiner sehr deutlichen  $\Delta$ N-ERG-Expression diente bei allen folgenden transienten Transfektionen als Positivkontrolle. Dem Nachweis der gesteigerten  $\Delta$ N-ERG-Expression in den transient transfizierten BPH1-Zellen folgte eine erneute Transfektion humaner BPH1-Zellen mithilfe von FuGENE<sup>®</sup> mit der Absicht stabil transfizierte Zelllinien zu generieren. Diese

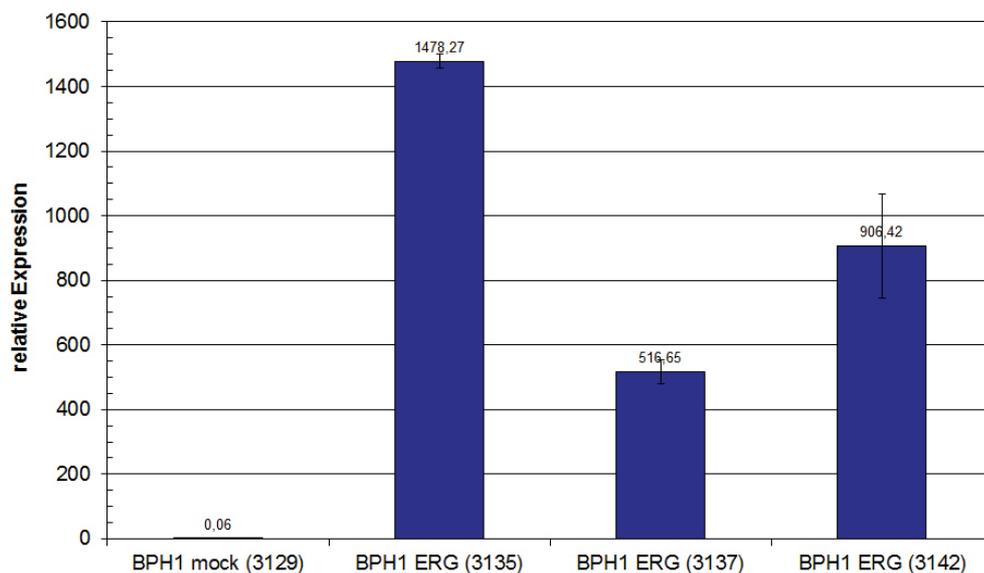


Abbildung 3.6:  $\Delta$ N-ERG-Expressionsniveau in transient transfizierten humanen BPH1-Zellen, relativ zum Haushaltsgen GAPDH. Dargestellt sind die Expressionslevel in den transient mit den  $\Delta$ N-ERG-Konstrukten transfizierten Zelllinien BPH1 ERG (3135), BPH1 ERG (3137) und BPH1 ERG (3142) vergleichend zu der Kontrollzelllinie BPH1 mock (3129).

sollten durch die Zugabe des Antibiotikums Zeocin selektiert werden. Im Laufe der Selektion starben jedoch alle transfizierten Zellen ab.

Um die geringen Transfektionseffizienzen mit dem FuGENE® 6 Reagenz und die damit einhergehenden geringen Zelldichten erfolgreich transfizierter Zellen als Ursache für die frustranen Versuche der stabilen Transfektion auszuschließen, wurde nach einer Methode mit höheren Transfektionseffizienzen gesucht. Als neuer Ansatz fand im Folgenden das Prinzip der Nukleofektion zur Transfektion humaner BPH1-Zellen Anwendung (vgl. Kap. 2.2.16). Es wurden das  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo-Konstrukt (Nr.3142) sowie der entsprechende Leervektor (Nr.3129) für die Nukleofektion eingesetzt. Als Positivkontrolle diente das vom Hersteller mitgelieferte pMaxGFP-Konstrukt. Durch die Fluoreszenz des GFP nach Anregung durch blaues oder ultraviolettes Licht, konnten die erfolgreich transfizierten Zellen durch die transfizierte Fähigkeit zur Grün-Fluoreszenz unter dem Mikroskop detektiert werden. Der Transfektionserfolg wurde 24 Stunden nach der Transfektion am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Für das pMAX-GFP-Konstrukt ergaben sich Transfektionseffizienzen von mehr als 50% in jedem Ansatz. Damit stellte sich das Prinzip der Nukleofektion für die Transfektion von humanen BPH1-Zellen als sehr effektive Methode heraus. Die mit dem  $\Delta$ N-ERG-Konstrukt bzw. dem Leervektor transfizierten Zellen wurden 48 Stunden nach der Nukleofektion lysiert und die  $\Delta$ N-ERG-Expression anhand der hergestellten Proteinlysate in einem Western Blot analysiert.

Abb. 3.7 zeigt deutlich, dass die transfizierte  $\Delta$ N-ERG-cDNA von den BPH1-Zellen aufgenommen wurde und das entsprechenden Protein exprimiert wird. Im Vergleich zum Leervektor war eine klare Protein-Bande in Höhe von 55 kD, die dem  $\Delta$ N-ERG-Protein zuzuordnen ist, erkennbar. Nach dem Nachweis der erfolgreichen  $\Delta$ N-ERG-Expression auf Proteinebene wurde eine

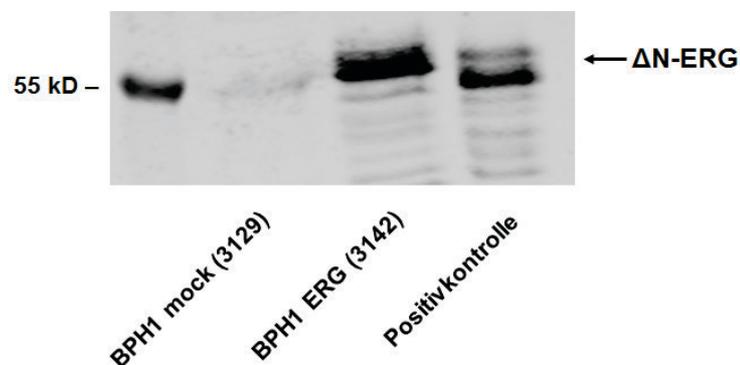


Abbildung 3.7: Western Blot zum Nachweis der  $\Delta$ N-ERG-Proteinexpression in den durch Nukleofektion transfizierten humanen BPH1-Zellen, BPH1 ERG (3142) im Vergleich zu BPH1 mock (3129). Als Positivkontrolle diente die  $\Delta$ N-ERG-pMAX-Zelllinie.

erneute Nukleofektion durchgeführt und die Zellen anschließend mit dem Selektionsmedium behandelt. Allerdings zeigte sich auch hier während der Selektionsphase ein Absterben aller Zellen. Die stabile Transfektion gelang auch nach Anwendung der Nukleofektion und nachweislich höherer Transfektionseffizienzen nicht.

### 3.2.2 Transfektion von HEK293-Zellen

Im Folgenden wurden parallel außerdem die häufig wegen guter Transfektionseffizienzen verwendeten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) transfiziert. Wie in Kap. 2.2.18 beschrieben, wurden die HEK293-Zellen mithilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode mit dem  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo-Konstrukt (Nr.3137), dem dazugehörigen Leervektor (Nr.3129) sowie dem  $\Delta$ N-ERG-pMAX-Konstrukt (Nr.3135) als Positivkontrolle transfiziert. Die  $\Delta$ N-ERG-Proteinexpression der transient transfizierten Zellen wurde in einem Western Blot überprüft. Hierfür wurden die Zellen zunächst mithilfe des Ripa-Lysepuffers lysiert und auf einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Als Primärantikörper wurde der inzwischen kommerziell erhältliche Erg1/2/3-Antikörper verwendet (vgl. Tab. 2.4).

In Abb. 3.8 ist der durchgeführte Western Blot abgebildet. Es ist eine starke  $\Delta$ N-ERG-Expression in den mit dem  $\Delta$ N-ERG-pMAX-Konstrukt (Nr.3135) transfizierten Zellen zu erkennen. Mithilfe dieser Positivkontrolle konnte die zur Größe von ungefähr 55kD korrelierende Bandenhöhe des exprimierten  $\Delta$ N-ERG-Proteins für den Western Blot von transfizierten HEK293-Zellen festgelegt werden. Auch das Konstrukt Nr.3137 wurde exprimiert, im Vergleich

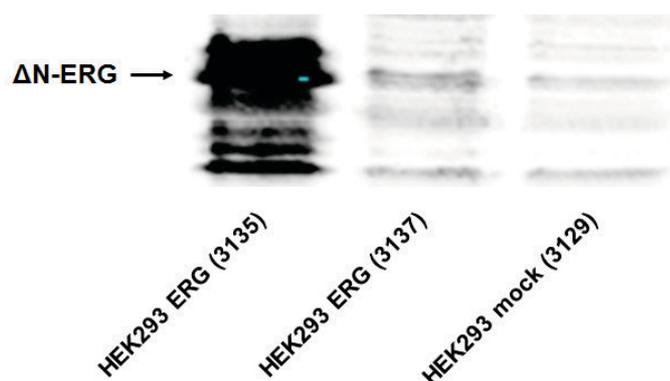


Abbildung 3.8: Western Blot zum Nachweis der  $\Delta$ N-ERG-Proteinexpression in den transient transfizierten HEK293-Zellen. Die Transfektionen erfolgten mit dem  $\Delta$ N-ERG-pMAX-Konstrukt (HEK293 ERG (3135)) als Positivkontrolle, dem  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo-Konstrukt (HEK293 ERG (3137)) sowie dem dazugehörigen Leervektor pCDNA3.1zeo (HEK293 mock (3129)).

jedoch deutlich schwächer. Die mit dem Leervektor Nr.3129 transfizierten HEK293-Zellen zeigten nur schwache unspezifische Banden.

Der Überprüfung des Transfektionserfolgs und dem Nachweis der  $\Delta$ N-ERG-Expression im Western Blot folgte die stabile Transfektion. Es wurden HEK293-Zellen mit den  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo-Konstrukten Nr.3137 und Nr.3142 sowie mit dem pCDNA3.1zeo-Leervektor Nr.3129 mithilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe des Antibiotikums Zeocin. Die positiven Zellklone überlebten die Selektionsphase, so dass nach wenigen Wochen ein stabil transfizierter HEK293-Pool etabliert war.

Mithilfe des Western Blots konnte die erfolgreiche Transfektion sowie die Expression des Proteins nachgewiesen werden - vgl. Abb. 3.9. Zum Vergleich mit den stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden ebenfalls die Proteinlysate der transient transfizierten Linien HEK293 ERG (3135) und HEK293 ERG (3137) aufgetragen. Es zeigte sich in allen mit  $\Delta$ N-ERG-Konstrukten transfizierten Zellen eine Expression des  $\Delta$ N-ERG-Proteins im Vergleich zur negativen Kontrollzelllinie HEK293 mock (3129). Gleichzeitig zeigte sich im Vergleich von stabil und transient

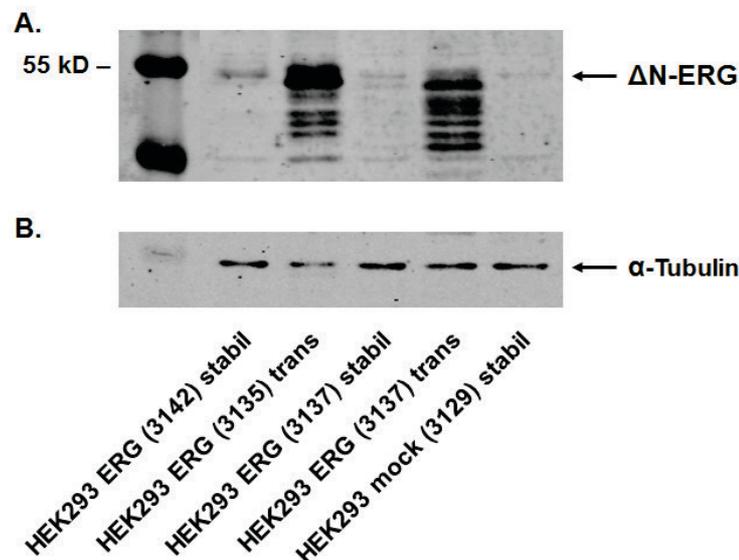


Abbildung 3.9: A. Western Blot zum Nachweis der  $\Delta$ N-ERG-Proteinexpression nach stabiler Transfektion der HEK293-Zellen, sowie Vergleich der  $\Delta$ N-ERG-Expression in stabil und transient transfizierten Zellen. Die stabile Transfektion erfolgte mit den  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo-Konstrukten Nr.3137 und Nr.3142 sowie dem dazugehörige Leervektor pCDNA3.1zeo Nr.3129. Für die transiente Transfektion wurden die  $\Delta$ N-ERG-Konstrukte Nr.3135 und Nr.3137 verwendet. B.  $\alpha$ -Tubulin als Ladungskontrolle.

transfizierten Zellen eine deutlich stärkere Expression in den transienten Zelllinien. Die stabil transfizierten HEK293-Zelllinien HEK293 ERG (3137) und HEK293 mock (3129) wurden für die folgenden funktionellen und analytischen Assays eingesetzt.

### **3.3 Funktionelle und analytische Assays an transfizierten HEK293-Zellen**

#### **3.3.1 Einfluss der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zellproliferation**

Zunächst wurde anhand des MTT-Proliferationsassays die Auswirkung der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zellproliferation untersucht. Das Ergebnis ist graphisch in Abb. 3.10 dargestellt. Es ist die photometrisch bestimmte Formazan-Konzentration als Maß für die Anzahl vitaler Zellen über der Zeit in Tagen aufgetragen. Die Abb. 3.10 zeigt das Proliferationsverhalten der mit  $\Delta$ N-ERG transfizierten HEK293-Zellen (HEK293 ERG (3137)) gegenüber dem pCDNA3.1zeo-Leervektor (HEK293 mock (3129)). Der Beobachtungszeitraum umfasste 5 Tage. Für jeden Messwert wurde zunächst anhand der Referenzprobe durch Subtraktion der jeweiligen Absorptionen der Absorptionsgrad ermittelt. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten aus jeweils 12 Einzelmesswerten mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Es zeigte sich für beide Zelllinien ein über den gesamten Beobachtungszeitraum parallel verlaufender sigmoidaler Kurvenverlauf mit sehr geringen Zellzahlen zu Beginn, einer Vervierfachung der Werte an Tag 2 und schließlich einer sprunghaften Zunahme der Formazan-Konzentration und damit der Zelldichte an Tag 3. Diese Dynamik zeigte sich im Verlauf abnehmend mit Ausbildung eines Plateaus zum Ende des Beobachtungszeitraums. Aus der Abb. 3.10 ist zu erkennen, dass die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen offenbar keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Dieses Ergebnis bestätigte sich in wiederholt durchgeführten unabhängigen Messungen.

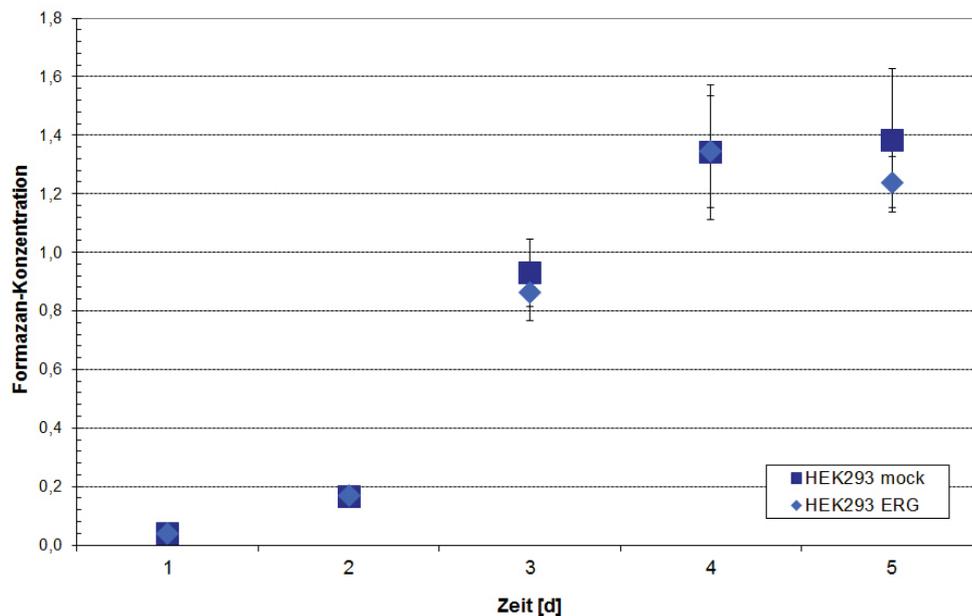


Abbildung 3.10: MTT-Proliferationsassay. Analyse des Proliferationsverhaltens der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden HEK293-Zellen (HEK293 ERG (3137)) im Vergleich zur Kontrollzelllinie (HEK293 mock (3129)). In der vergleichenden Analyse zeigte sich kein Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zellproliferation. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für wiederholt durchgeführte unabhängige Versuche.

### 3.3.2 Einfluss der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Migrationsverhalten

Zur Beurteilung des Effekts der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zellmigration wurde zunächst ein Scratch-Assay durchgeführt. Über 24 Stunden wurde in einem vierfachen Ansatz regelmäßig die Spaltbreite am Mikroskop ausgemessen. Aus den Einzelwerten wurde jeweils der Mittelwert ermittelt sowie die jeweilige Standardabweichung angegeben. Abb. 3.11 gibt den zeitlichen Verlauf der Zellmigration wieder.

Bei einem ähnlichen Ausgangswert von durchschnittlich ca. 500  $\mu$ m für die Kontrollzellen und ca. 600  $\mu$ m für die  $\Delta$ N-ERG-Zelllinie zeigte sich nach 6 Stunden erstmalig eine Migrationstendenz. Nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Stunden war eine deutliche Abnahme der Spaltbreite vor allem bei den  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen (HEK293 ERG (3137)) im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie (HEK293 mock (3129)) zu verzeichnen. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 24 Stunden verringerte sich die Spaltbreite bei den  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen insgesamt um fast 85 %, im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie mit nur

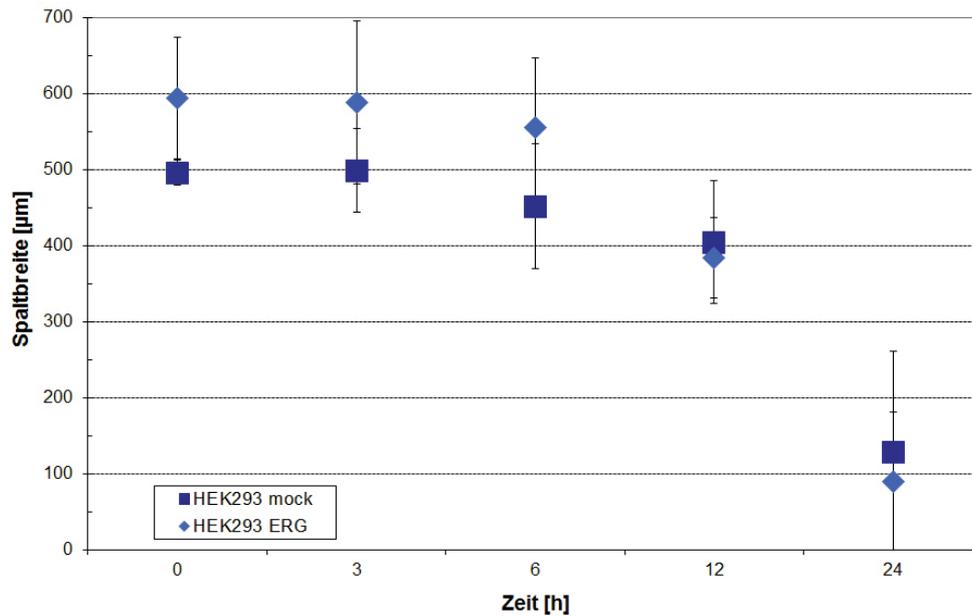


Abbildung 3.11: Scratch-Assay. Analyse des Einflusses der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zellmigration anhand der  $\Delta$ N-ERG transfizierten HEK293-Zellen (HEK293 ERG (3137)) im Vergleich zu den mit dem leeren Vektor transfizierten Kontrollzellen (HEK293 mock (3129)). Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für wiederholt durchgeführte unabhängige Experimente.

rund 75 %. Das entspricht einer absoluten Abnahme der Spaltbreite von rund 500  $\mu\text{m}$  bzw. weniger als 400  $\mu\text{m}$ . In der statistischen Auswertung ließ sich jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz nachweisen.

Um die Hinweise eines steigenden Effekt der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zellmigration aus dem Scratch-Assay zu überprüfen, wurde ein Transwell-Migrationsassay mit denselben Zelllinien durchgeführt. Dabei wurde die fibronectinabhängige Migration der Zellen in Abhängigkeit von der  $\Delta$ N-ERG-Expression untersucht. In einem Sechsfach-Ansatz wurden jeweils 50.000 Zellen pro Transwell ausgesät und eine Migrationszeit von 2 Stunden angesetzt (vgl. Kap. 2.2.22). Die Auswertung erfolgte am Mikroskop. Aufgrund sehr hoher Zellzahlen wurden pro Membran jeweils vier zufällig ausgewählte hochauflösende Gesichtsfelder ausgezählt und die Zellzahl bezogen auf die Gesamtmembrangröße extrapoliert. Aus den sechs Einzelwerten pro Zelllinie wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet (vgl. Abb. 3.12). Für die Kontroll-Zelllinie ergab sich eine Zahl von durchschnittlich 1351 migrierten Zellen im Vergleich zu 1744 migrierten  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen bei gleichzeitig hoher Standardabweichung in beiden Zelllinien. Die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression führte demzufolge zu einer

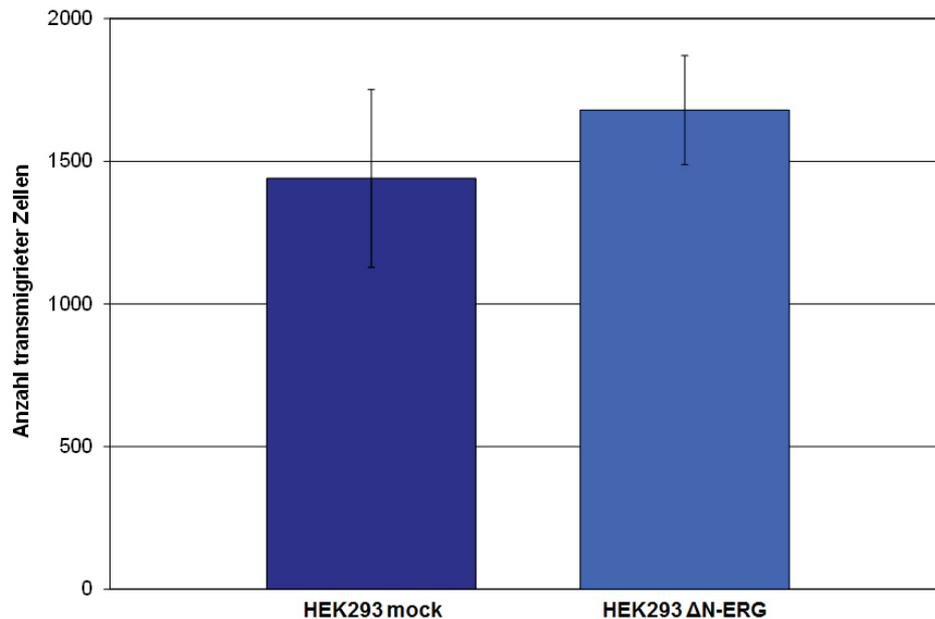


Abbildung 3.12: Transwell-Migrations-Assay. Analyse des Einflusses der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Migrationsverhalten transfizierter HEK293-Zellen. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der transmigrierten Zellen und die dazugehörigen Standardabweichungen der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen (HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)) im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie (HEK293 mock (3129)). Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für wiederholt durchgeführte unabhängige Versuche.

leicht gesteigerten Migration. Dieser Effekt erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für wiederholt durchgeführte unabhängige Versuche.

### 3.3.3 Beeinflussung des invasiven Verhaltens durch die $\Delta$ N-ERG-Überexpression

Um den Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das invasive Verhalten der Zellen zu untersuchen, wurde ein Matrigel-Invasionsassay durchgeführt. Es wurden die stabil transfizierten HEK293-Zelllinien HEK293 mock (3129) und HEK293 ERG (3137) miteinander verglichen. In einem Sechsfach-Ansatz wurden 50.000 Zellen pro Transwell ausgesät und nach 24 Stunden die Membranen fixiert und H.E.-gefärbt (vgl. Kap. 2.2.23). Die Auswertung erfolgte am Mikroskop. Bei sehr hohen Zellzahlen wurden jeweils vier zufällig ausgewählte hochauflösende

Gesichtsfelder ausgezählt und die Gesamtzahl invadierter Zellen pro Membran extrapoliert. Aus den sechs Einzelwerten wurde der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung berechnet (vgl. Abb. 3.13).

Es zeigten sich deutlich mehr invadierte Zellen bei der HEK293 ERG (3137)- als bei der Kontroll-Zelllinie HEK293 mock (3129). Rund 1872  $\Delta$ N-ERG-überexprimierende Zellen standen 584 Kontrollzellen gegenüber. Im Rahmen der statistischen Auswertung zeigte sich im nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter invasionssteigernder Effekt ( $p = 0,004$ ). Der signifikante invasionssteigernde Effekt durch die Überexpression des  $\Delta$ N-ERG-Proteins in transfizierten HEK293-Zellen bestätigte sich in wiederholt durchgeführten Assays.

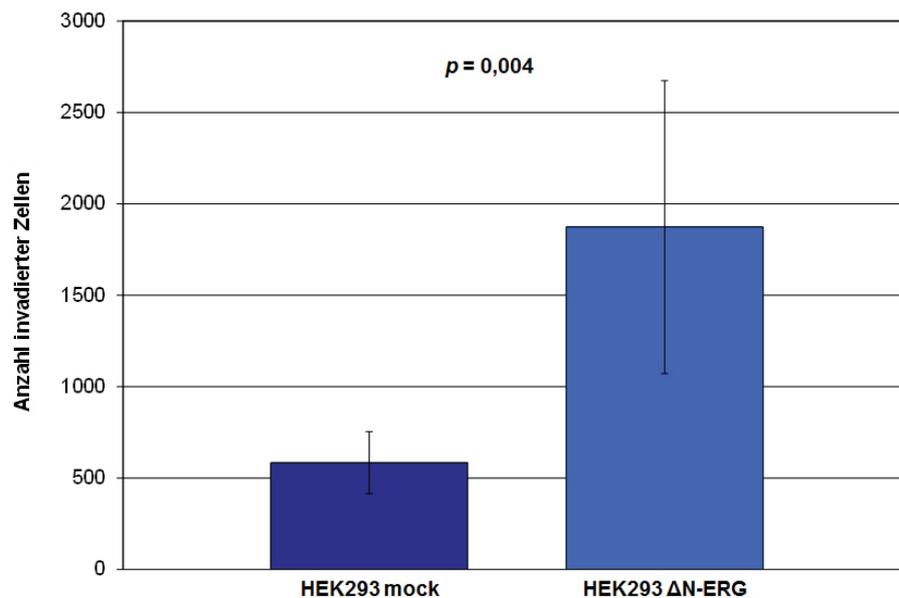


Abbildung 3.13: Matrigel-Invasionsassay. Analyse des Invasionsverhaltens mock- und  $\Delta$ N-ERG-transfizierter HEK293-Zellen im Matrigel-Invasionsassay (HEK293 mock (3129) vs. HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der invadierten Zellen und die dazugehörigen Standardabweichungen. Die Überexpression von  $\Delta$ N-ERG führt in den HEK293-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Matrigel-Invasion ( $p = 0,004$ ). Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für wiederholt durchgeführte unabhängige Versuche.

Um den Mechanismus der gesteigerten Invasion in  $\Delta N$ -ERG-überexprimierenden Zellen aufzuklären, wurden die Effekte von  $\Delta N$ -ERG auf das Expressionsmuster und die Aktivität der invasionsrelevanten Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 und deren Vorstufen Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9 mithilfe einer Gelatin-Zymographie semiquantitativ untersucht. Matrix-Metalloproteasen (MMP) werden von den Zellen in die sie umgebene Matrix sezerniert. In der *in-vitro*-Kultur sind die MMP daher im Nährmedium der Zellen nachweisbar.

Zur Bestimmung der Expressionslevel wurden die Überstände der mit dem  $\Delta N$ -ERG-pCDNA3.1 zeo-Konstrukt (Nr. 3137) transfizierten Zellen sowie der Kontroll-Zelllinie (HEK293 mock (3129)) gewonnen und wie in Kapitel 2.2.24 beschrieben analysiert. Die Matrix-Metalloprotease MMP-2 weist eine Größe von 64 kD auf, die Vorstufe Pro-MMP-2 eine Größe von 72 kD. Die Protease MMP-9 ist 92 kD groß, ihre Vorstufe Pro-MMP-9 100 kD.

Abb. 3.14 zeigt das angefärbte Zymographiegel mit einem repräsentativen Überstandpaar bestehend aus einer  $\Delta N$ -ERG- und einer mock-transfizierten Zelllinie (HEK293 ERG (3137) bzw. HEK293 mock (3129)). Wie in Abb. 3.14 dargestellt, zeigte sich im Vergleich der  $\Delta N$ -ERG-überexprimierenden zu den Kontroll-Zellen kein Unterschied für Pro-MMP-2, MMP-2 und MMP-9. Pro-MMP-9 wurde jedoch jeweils deutlich stärker von den  $\Delta N$ -ERG transfizierten Zellen sezerniert. Diese Beobachtung bestätigte sich in wiederholt durchgeführten unabhängigen Versuchen.

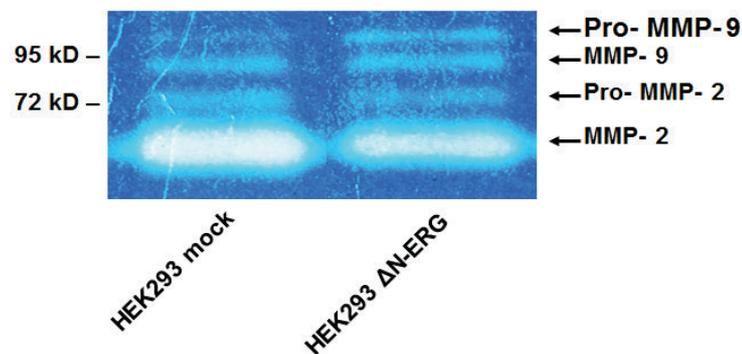


Abbildung 3.14: Gelatin-Zymographie-Gel. Parallele Analyse der Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 sowie ihrer Vorstufen Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9. Dargestellt ist ein repräsentatives Überstandpaar aus der HEK293  $\Delta N$ -ERG (3137)- und der HEK293 mock (3129)-Zelllinie. In der vergleichenden Analyse zeigte sich eine deutlich stärkere Pro-MMP-9-Sekretion in  $\Delta N$ -ERG-überexprimierenden Zellen. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für wiederholt durchgeführte unabhängige Versuche.

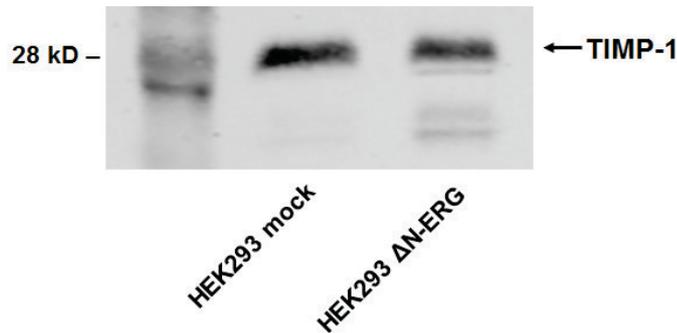


Abbildung 3.15: Western Blot zum Nachweis von TIMP-1 im Zellkultur-Überstand  $\Delta$ N-ERG überexprimierender HEK293-Zellen (HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)) und mock-transfizierter Kontrollzellen (HEK293 mock (3129)). Es zeigte sich eine leicht reduzierte Sekretion von TIMP-1 in  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden HEK293-Zellen. Dieses Ergebnis bestätigte sich in wiederholt durchgeführten unabhängigen Western Blots.

Ergänzend zum Expressionsmuster von MMP-2 und MMP-9 wurden auch die Effekte von  $\Delta$ N-ERG auf die Sekretion der spezifischen Inhibitoren der Matrix-Metalloproteasen TIMP-1 und TIMP-2 (*Tissue Inhibitor of Metalloprotease*) untersucht. Mittels Western Blot hat sich lediglich eine Sekretion von TIMP-1, nicht aber von TIMP-2 nachweisen lassen. Im Vergleich zu den mock-transfizierten Kontrollzellen zeigten  $\Delta$ N-ERG-transfizierte Zellen eine leicht reduzierte Sekretion von TIMP-1 (vgl. Abb. 3.15). Dieses Ergebnis bestätigte sich in wiederholt durchgeführten unabhängigen Western Blots.

Zusammenfassend führte die Überexpression von  $\Delta$ N-ERG in HEK293-Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie sowohl zu einer verstärkten Sekretion von Pro-MMP-9, als auch zu einer verminderten Sekretion von TIMP-1, was jeweils bekanntermaßen zur Steigerung der Tumordinvasion führt.

### 3.3.4 Untersuchung des Einflusses der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf den Tiam1-Rac-Signalweg

Zur Analyse eines möglichen Einflusses des  $\Delta$ N-ERG-Proteins auf den Tiam1-Rac-Signalweg wurde das Expressionsniveau von Tiam1 bzw. Rac mit Hilfe von Western Blots in mock- und  $\Delta$ N-ERG-transfizierten Zellen miteinander verglichen. Endogenes Tiam1 weist eine molekulare Größe von ca. 200 kD auf.

Abb. 3.16 stellt das Ergebnis anhand eines repräsentativen Proteinlysatespaars dar. Sowohl

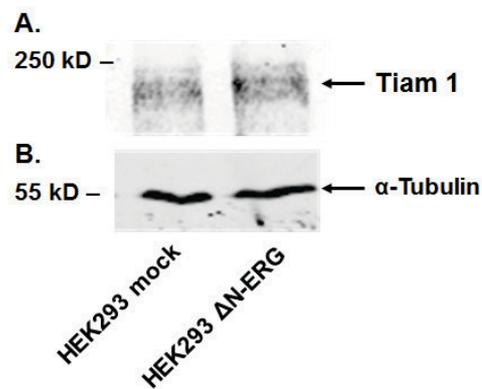


Abbildung 3.16: A. Western Blot zum Nachweis der endogenen Tiam1-Expression in mit  $\Delta$ N-ERG transfizierten HEK293-Zellen (HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)) im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie HEK293 mock (3129), ohne Hinweis auf einen Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Tiam1-Expression. B.  $\alpha$ -Tubulin als Ladungskontrolle.

in den  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden als auch in den Kontrollzellen zeigte sich eine deutliche Proteinbande für Tiam1 in einer Höhe von ca. 200 kD. Bei gleichmäßiger Proteinauftragung war unter dem Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen kein Unterschied in der Tiam1-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrollzelllinie nachweisbar.

Für die Beurteilung des Rac-Expressionsniveaus unter der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression wurden Proteinlysate-Paare der stabil transfizierten Zelllinien HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137) und HEK293 mock (3129) vergleichend analysiert.

Die in Abb. 3.17 dargestellte Western Blot-Membran zeigt eine deutliche endogene Expression von Rac sowohl in den  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden HEK293-Zellen (HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)) als auch in den Kontrollzellen (HEK293 mock (3129)). Ein Unterschied im Expressionsniveau von Rac konnte bei gleichen Proteinmengen nicht festgestellt werden.

Die qualitative Analyse der Rac-Expression im Western Blot zeigte, wie oben dargestellt, keine Unterschiede zwischen den  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen und der Kontroll-Zelllinie. Dieses Ergebnis spiegelt zwar den endogenen Gesamtgehalt an Rac wider, lässt jedoch keine Aussage über die Aktivität des Proteins zu. Um diese zu ermitteln wurde mit den Zelllinien HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137) und HEK293 mock (3129) ein Rac-Aktivitätsassay, wie in Kap. 2.2.25 beschrieben, durchgeführt. Der im Labor verfügbare und für die Untersuchungen eingesetzte Rac-Antikörper erkennt alle Rac-Isoformen gleichermaßen. Somit konnte die mit konstitutiv aktivem Rac (V12Rac3) transfizierte BPH1-Zelllinie, die vom Labor zur Verfügung gestellt wurde,

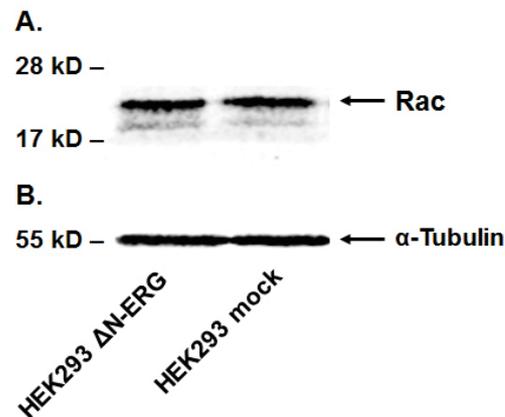


Abbildung 3.17: A. Western Blot zum Nachweis der endogenen Rac-Expression in  $\Delta$ ERG-überexprimierenden HEK293-Zellen (HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)) im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie HEK293 mock (3129), ohne Hinweis auf einen Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Rac-Expression. B.  $\alpha$ -Tubulin als Ladungskontrolle.

als Positivkontrolle eingesetzt werden. Aufgrund des zusätzlichen Flag-Tag erscheint die Bande der Positivkontrolle im Western Blot etwas höher als das endogene Rac, das eine Größe von 21 kD aufweist. Die Auftrennung der totalen Zelllysate und Immunpräzipitate (IP) erfolgte auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. Mithilfe des Rac-Antikörpers konnte die Rac-Expression im totalen Zelllysate sowie das Aktivitätsniveau in den Immunpräzipitaten analysiert werden.

Abb. 3.18 zeigt im totalen Zelllysate die Expression von endogenem Rac ohne signifikante Unterschiede zwischen  $\Delta$ N-ERG-transfizierten HEK293-Zellen und dem pCDNA3.1zeo-Leervektor. In den Präzipitaten war aktiviertes Rac in beiden untersuchten Zelllinien nicht nachweisbar. Die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression hat demzufolge keinen Einfluss auf die Aktivierung von Rac und somit die Aktivierung des entsprechenden invasionsfördernden Signalwegs. Die Ergebnisse sind repräsentativ für wiederholt durchgeführte unabhängige Experimente.

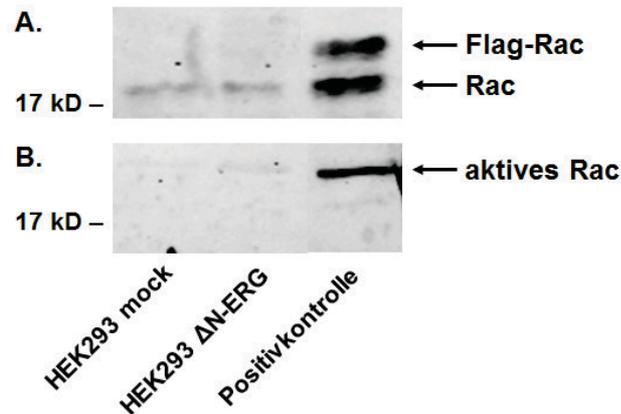


Abbildung 3.18: Rac-Aktivitätsassay mit der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zelllinie HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137) und der Kontroll-Zelllinie HEK293 mock (3129), sowie der Positivkontrolle BPH1 V12Rac3. A. totales Zellysat B. Präzipitate. Die Ergebnisse sind repräsentativ für wiederholt durchgeführte unabhängige Experimente.

### 3.3.5 Untersuchung des Einflusses der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zell-Zelladhäsion

Es erfolgte zunächst eine orientierende Beurteilung der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden im Vergleich zu den mock- transfizierten HEK293-Zellen in Kultur bzw. am Mikroskop. Abb. 3.19 zeigt für beide Zelllinien nahezu konfluente *monolayer* der epitheloiden Zellen mit teils unterschiedlicher Morphologie. Sie wachsen adhärent. Bei vollständiger Konfluenz des Zellrasen

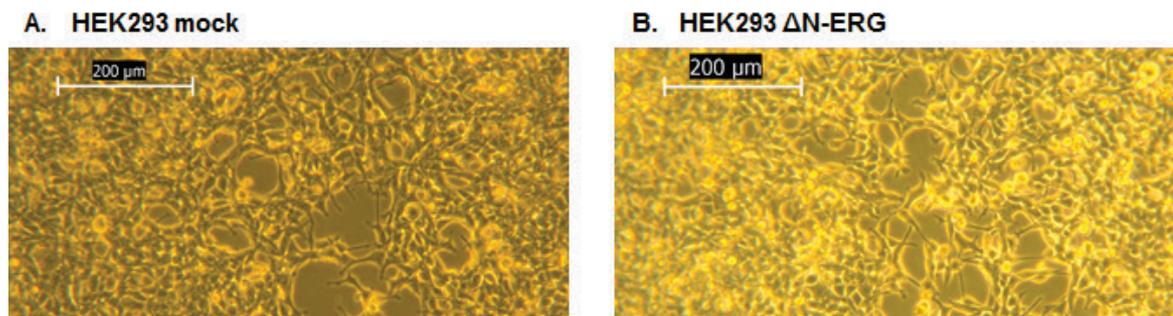


Abbildung 3.19: Repräsentative Übersichtsaufnahmen von transfizierten HEK293-Zellen in Kultur, HEK293 mock (3129) im Vergleich zu HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137).

war wiederholt das sehr leichte Abschwimmen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale zu beobachten. Eine Veränderung der Zellen in Morphologie und Wachstum durch die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression war nicht zu verzeichnen.

Auch bei mikroskopisch nicht eindeutig erkennbaren morphologischen Unterschieden zwischen den transfizierten Zelllinien wurde im Anschluss die Zell-Zelladhäsion und insbesondere mögliche Veränderungen derselben unter der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression untersucht. E-Cadherin wird in HEK293-Zellen nicht exprimiert [52], so dass sich die durchgeführten Analysen auf  $\beta$ -Catenin konzentrierten. In Abb. 3.20 ist der Western Blot zum Nachweis der  $\beta$ -Catenin-Expression in den transfizierten HEK293-Zellen dargestellt. Bei gleichmäßiger Probenauftragung zeigte sich eine leichte Verminderung der  $\beta$ -Catenin-Expression in den  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie.

Zur Bestimmung der Lokalisation von  $\beta$ -Catenin innerhalb der transfizierten HEK293-Zellen wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierzu wurden HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)- sowie HEK293 mock (3129)-Zellen angefärbt und die  $\beta$ -Catenin-Expression mithilfe des konfokalen Mikroskops dokumentiert. Abb. 3.21 zeigt für jede Zelllinie ein repräsentatives Gesichtsfeld, aufgeschlüsselt in die DAPI-Färbung der Zellkerne (blau), die Darstellung des Zytoskeletts in rot und die  $\beta$ -Catenin-Expression in grün. Im *overlay* aller drei Färbungen würden sich Lokalisationen von  $\beta$ -Catenin im Zytoskelett in einer Gelbfluoreszenz zeigen. In der vergleichenden Betrachtung der  $\beta$ -Catenin-Expression zeigte sich kein Unterschied zwischen den  $\Delta$ N-ERG-

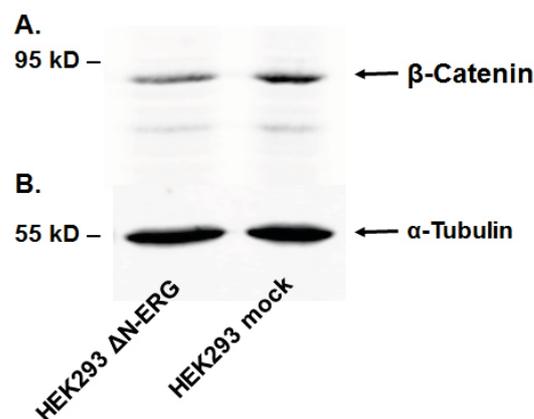


Abbildung 3.20: A. Western Blot zum Nachweis der  $\beta$ -Catenin-Expression in  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden HEK293-Zellen (HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)) vergleichend zur Kontroll-Zelllinie (HEK293 mock (3129)). Es zeigte sich eine leicht verminderte  $\beta$ -Catenin-Expression unter dem Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression. B.  $\alpha$ -Tubulin als Ladungskontrolle.

überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie.  $\beta$ -Catenin war in beiden Zelllinien vor allem im Zellkern lokalisiert.

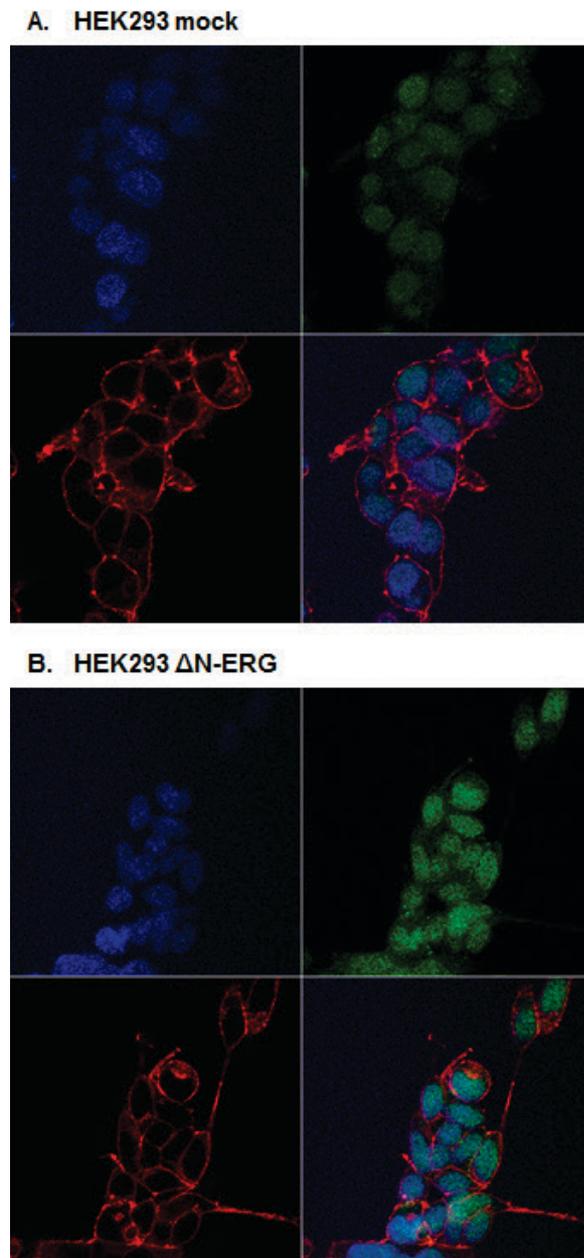


Abbildung 3.21: Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen der  $\beta$ -Catenin-Expression in transfizierten HEK293-Zellen, jeweils ein repräsentatives Gesichtsfeld der HEK293 mock (3129)- (A.) und HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)-Zelllinie (B.). Die 4 Einzelbilder zeigen jeweils die DAPI-Färbung der Zellkerne (blau), die Anfärbung des Zytoskeletts (rot) und die  $\beta$ -Catenin-Färbung (grün) sowie den overlay aller drei Einzelaufnahmen.

### 3.3.6 Transformierende Effekte der $\Delta$ N-ERG-Überexpression

In dieser Arbeit wurde zunächst der Colony-Formation-Assay zur Untersuchung der transformierenden Eigenschaften der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen eingesetzt.

Die vergleichende Beurteilung der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen mit den Kontrollzellen erbrachte keinen Unterschied. Es kam bei beiden Zelllinien bereits nach kurzer Zeit zur Ausbildung eines konfluenten *monolayers* in der Zellkulturschale. Kolonien bildeten sich nicht. In den meisten Fällen kam es bereits noch vor einer möglichen Koloniebildung zu einem Abschwimmen des gesamten *monolayers*. Abb. 3.22 zeigt repräsentative Übersichtsaufnahmen, ohne Nachweis von Kolonien, weder bei den  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen noch in der Kontroll-Zelllinie.

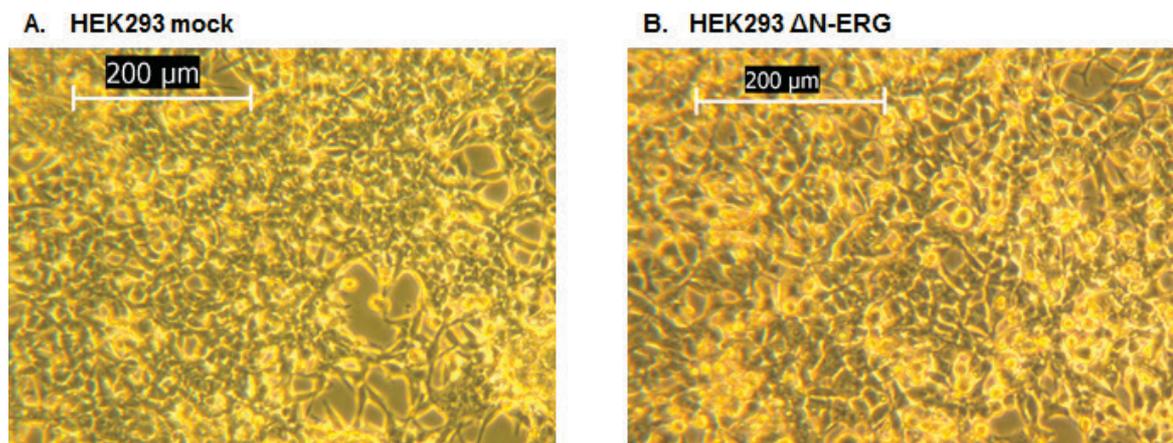
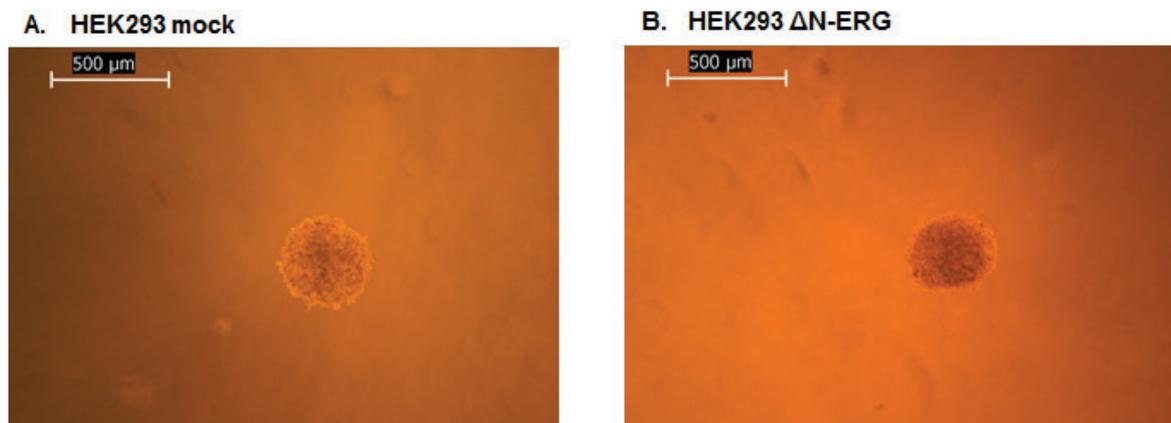


Abbildung 3.22: Colony-Formation-Assay. Foto-Dokumentation des Ergebnisses anhand repräsentativer Übersichtsaufnahmen. A. mock-transfizierte Zellen (HEK293 mock (3129)) B.  $\Delta$ N-ERG-überexprimierende Zellen (HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137)). In keiner der untersuchten Zelllinien kam es zu einer Koloniebildung.

Die Fähigkeit zu adhäsionsunabhängigem Wachstum der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden HEK293-Zellen als Merkmal der stattgefundenen onkogenen Transformation wurde mit Hilfe des Softagar-Assays untersucht.

In der vergleichenden Analyse zeigten sich keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien. Sowohl mock- als auch  $\Delta$ N-ERG-transfizierte Zellen bildeten Kolonien und weder in der Anzahl noch in der Größe der Kolonien fanden sich erkennbare Unterschiede. In Abb. 3.23 sind repräsentative Gesichtsfelder abgebildet, mit jeweils einer Kolonie gleicher Größe pro Zelllinie.



*Abbildung 3.23: Softagar-Assay. Darstellung repräsentativer Gesichtsfelder der vergleichend untersuchten Zelllinien A. HEK293 mock (3129) B. HEK293  $\Delta$ N-ERG (3137). Weder in Anzahl noch in der Größe der gewachsenen Kolonien zeigte sich ein Unterschied zwischen den Zelllinien.*

## 4 Diskussion

Fusionen zwischen dem TMPRSS2-Gen und Mitgliedern der ETS-Transkriptionsfaktorfamilie wurden erstmalig von der Arbeitsgruppe um Tomlins et al. bei der Suche nach genetischen Veränderungen des Prostatakarzinoms beschrieben. Die aus den Fusionen resultierenden Überexpressionen der ETS-Transkriptionsfaktoren fanden sich in der Mehrzahl aller Prostatakarzinomfälle [15]. Die häufigste Fusionsvariante T1/E4 ist charakterisiert durch die Fusion des Exon 1 des TMPRSS2-Gens mit dem Exon 4 des ERG-Gens. Es resultiert ein N-terminal trunkiertes, aber voll funktionsfähiges ERG-Protein ( $\Delta$ N-ERG) [16]. Die Überexpression des aus der Fusion resultierenden  $\Delta$ N-ERG-Proteins wurde wiederholt von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Die direkten Auswirkungen dieser Überexpression auf das Verhalten der Prostatakarzinomzellen hinsichtlich onkogener Transformation, Invasion, Migration oder Proliferation bzw. Tumorprogression wurden bis zum Beginn dieser Arbeit noch nicht gezielt untersucht. Erst im Verlauf wurden in der Literatur Hinweise zur Rolle der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression im Prostatakarzinom beschrieben.

### 4.1 Klonierung

Für die Untersuchungen der Auswirkungen der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das biologische Verhalten von Zellen im *in-vitro*-Modell erfolgte zunächst die Klonierung der entsprechenden cDNA in einen eukaryoten Transfektionsvektor. Als Grundlage und Referenz diente die ERG-Isoform 2 der NCBI-Datenbank (NM\_004449), die der häufigsten TMPRSS2-ERG-Fusionsvariante T1/E4 entspricht. Trotz wiederholt durchgeführter Optimierungsschritte war die Klonierung des  $\Delta$ N-ERG-Konstrukts problembehaftet und bedurfte schließlich mehrerer Strategiewechsel.

Initial wurde die NCI-H660-Zelllinie für die Extraktion der  $\Delta$ N-ERG-cDNA ausgewählt. Diese Zelllinie wurde in der Literatur als gutes *in-vitro*-Modell zur Untersuchung der TMPRSS2-ERG-Fusion beschrieben, da die Zellen die TMPRSS2-ERG-Fusion homozygot aufweisen [33]. Die Amplifikation der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz war wiederholt erfolgreich, mit Nachweis des amplifizierten PCR-Produkts in der Agarosegelelektrophorese. Allerdings waren die Amplifikatmengen

aus dieser Zelllinie zur Fortführung der Klonierung nicht ausreichend. Es zeigte sich in weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeit, dass für eine erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenz mittels PCR, als Voraussetzung für die weitere Klonierung, eine starke zelluläre Expression des  $\Delta$ N-ERG-Gens notwendig war, wie es beispielsweise in Prostatakarzinomzellen der Fall ist. Die TMPRSS2-ERG-Fusion und die damit verbundene  $\Delta$ N-ERG-Überexpression sind fast ausschließlich in invasiven Prostatakarzinomzellen nachweisbar, seltener in intraepithelialen Neoplasien (PIN) oder benignem Prostatagewebe [53]. Karzinomzellen weisen demnach im Vergleich zum Normalgewebe wesentlich höhere  $\Delta$ N-ERG-Expressionslevel auf und sind somit für die  $\Delta$ N-ERG-Amplifikation als Ausgangsmaterial besser geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde daher für alle weiteren Reaktionen die aus frischem Prostatakarzinomgewebe isolierte RNA (Probe T21005) verwendet.

Trotz der Wahl von Karzinomgewebe als Ausgangsmaterial für die  $\Delta$ N-ERG-Amplifikation und wiederholter Optimierungen der Reaktionsbedingungen zur Elimination von unspezifischen Reaktionsprodukten zeigte sich bei exakter Auftrennung der PCR-Proben mithilfe der Agarosegelelektrophorese durch längere Laufzeiten konstant in Höhe von 1300bp eine Doppelbande. Ihr Ursprung konnte erst im Verlauf dieser Arbeit identifiziert werden, als in der NCBI-Datenbank weitere ERG-Isoformen beschrieben wurden. Die in der PCR verwendeten Primer waren ebenfalls komplementär zu Sequenzabschnitten der ERG-Isoform 3 (NM\_001136154). Hieraus resultierte das zusätzliche, um 70bp größere PCR-Produkt.

Im Anschluss an die Optimierungen der PCR-Amplifikation wurden in der vorliegenden Arbeit zur Lösung der Klonierungsprobleme wiederholt neue Restriktionsendonukleasen und Expressionsvektoren kombiniert. Doch auch die unterschiedlichen Kombinationsvarianten erbrachten keine positiven Zellklone. Erst durch den Einsatz des CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kits (Fermentas, St.Leon-Rot) gelang die Klonierung der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz schließlich problemlos. Dieses Kit ist speziell für die unmittelbare *blunt*-Klonierung von PCR-Produkten geeignet. Fehlerquellen durch den Einsatz von Primern mit entsprechenden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und dementsprechenden Überhängen sowie durch den Restriktionsverdau selbst, sowohl des PCR-Produkts als auch des Vektors, wurden auf diese Weise vermieden.

Das ursprüngliche Ziel war, die  $\Delta$ N-ERG-Sequenz in einen pLRZS-Vektor, den Standardvektor des Labors, zu klonieren. Es sollte die Möglichkeit bestehen, in über diese Arbeit hinausgehenden Experimenten Ko-Transfektionen durchzuführen, um ggf. Interaktion der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression mit bereits etablierten Konstrukten beurteilen zu können.

Außerdem war bis zu diesem Zeitpunkt der Arbeit ein spezifischer ERG-Primärantikörper noch nicht kommerziell erhältlich. Um das  $\Delta$ N-ERG-Protein im Western Blot detektieren zu können,

wurde daher das generierte  $\Delta$ N-ERG-pJet2.1-Konstrukt zunächst in den HA-Tag-tragenden pMV0-Vektor umkloniert. Durch die entsprechende Auswahl der Restriktionsendonukleasen konnte das HA-Tag gemeinsam mit der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz in den endgültigen Expressionsvektor integriert werden.

Die Umklonierung der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus dem pMV0- in den pLZRS-Vektor gelang jedoch wiederholt nicht. Auch andere Klonierungen in den pLZRS-Vektor erwiesen sich als sehr schwierig, möglicherweise mitbedingt durch den deutlichen Größenunterschied zwischen dem 13kb großen pLZRS-Vektor und üblichen Klonierungsvektoren. Aufgrund der abschließend nicht zu klärenden Klonierungsprobleme wurde das Ziel der Umklonierung in den pLZRS-Vektor zugunsten der prompt erfolgreichen Klonierung in den pCDNA3.1zeo-Vektor verworfen. Durch Sequenzierung des Konstrukts und den Vergleich mit der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz der NCBI-Datenbank (NM\_004449.4) konnte der Erfolg der Klonierung nachgewiesen werden. Die  $\Delta$ N-ERG-Sequenz befand sich in korrekter 5'-3'-Orientierung im Expressionsvektor pCDNA3.1zeo und war frei von Leserasterverschiebungen oder anderen Mutationen. Zwischen HA-Tag- und  $\Delta$ N-ERG-Sequenz fand sich allerdings ein Stopp-Codon, das die Expression des HA-ERG-Fusionsproteins verhinderte. Dieses Stopp-Codon war durch einen fehlerhaften Primer entstanden. Nach Rücksprache mit der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) gehen Guanin-Basen in seltenen Fällen durch Depurinierungen bei der Synthese verloren. Hierzu muss es in diesem Fall gekommen sein, da der Firma eine korrekte Primersequenz übermittelt wurde. Mithilfe der *in vitro* Mutagenese nach Papworth et al. wurde durch den Austausch der fehlerhaften Base ein Konstrukt mit intaktem HA-Tag hergestellt (Nr.3142).

In den folgenden Transfektionen wurden das  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo- (Nr.3137) sowie das willentlich mutierte  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo-Konstrukt mit intaktem HA-Tag (Nr.3142) eingesetzt.

## 4.2 Transfektion

Als Ausgangspunkt für die Untersuchung der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression im *in-vitro*-Modell sollten die mit den  $\Delta$ N-ERG-Konstrukten transfizierten humanen BPH1-Zellen dienen. Zunächst erfolgte nur die Transfektion des Konstrukts Nr.3137, während parallel die oben beschriebene *in vitro* Mutagenese nach Papworth et al. durchgeführt wurde. Später wurde dann ebenfalls das willentlich mutierte Plasmid Nr.3142 transfiziert.

Vor der eigentlichen Transfektion der  $\Delta$ N-ERG-Konstrukte wurde das für humane BPH1-Zellen am besten geeignete Transfektionsreagenz ermittelt. Hierfür wurden zwei verschiedene  $\beta$ -Galaktosidase-Plasmide transfiziert. Die vergleichende Beurteilung der Blaufärbung der er-

folgreich transfizierten Zellen durch die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase erbrachte insgesamt für alle untersuchten Reagenzien geringe Transfektionseffizienzen. Der Vergleich der Reagenzien untereinander zeigte die besten Ergebnisse für das FuGENE® 6 Transfektionsreagenz, mit einer durchschnittlichen Effizienz von ca. 5%. Dieses wurde daher im Folgenden für die Transfektionen von humanen BPH1-Zellen mit den  $\Delta$ N-ERG-Konstrukten verwendet. Der Erfolg der transienten Transfektion wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR nachgewiesen. Diese bestätigte die deutliche Expression der transfizierten  $\Delta$ N-ERG-Konstrukte im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie. Trotz der vermutlich ebenfalls geringen Transfektionseffizienz für die  $\Delta$ N-ERG-Konstrukte, basierend auf den Ergebnissen der Transfektionen der  $\beta$ -Galaktosidase-Konstrukte, zeigte sich dennoch ein deutlicher Unterschied im Expressionsniveau der unterschiedlichen Zelllinien. In allen mit  $\Delta$ N-ERG-Konstrukten transient transfizierten Zellen fanden sich 500-1.500fach höhere  $\Delta$ N-ERG-Expressionslevel als in der Kontroll-Zelllinie. Die in der Literatur wiederholt beschriebene Überexpression von  $\Delta$ N-ERG in Prostatakarzinomzellen, die die TMPRSS2-ERG-Fusion aufwiesen [15], im Vergleich zu benignen Prostatazellen ließ sich somit im *in-vitro*-Modell der transfizierten BPH1-Zellen abbilden. Dabei zeigten die Zellen, die mit dem  $\Delta$ N-ERG-pMAX-Konstrukt transfiziert worden waren, die stärkste Expression. Das pMAX-Plasmid unterscheidet sich hinsichtlich der integrierten Promotoren von den pCDNA3.1zeo-Plasmiden, was die wesentlich ausgeprägtere Expression erklärt.

Im Verlauf erwies sich die stabile Transfektion der humanen BPH1-Zellen wiederholt als problematisch. Eigene Erfahrungen im Umgang mit humanen BPH1-Zellen haben gezeigt, dass diese Zelllinie sehr empfindlich gegenüber zu geringen Zelldichten mit vermehrtem Absterben der Zellen reagiert. Infolge der geringen Transfektionseffizienz überstanden nur wenige Zellen die Selektionsphase. Die resultierenden geringen Zelldichten waren für die transfizierten BPH1-Zellen vermutlich zu gering, um eine stabile Population auszubilden.

Aus diesem Grund wurde nach einer Transfektionsmethode mit höheren Effizienzen gesucht. Das Prinzip der Nukleofektion erwies sich nach ersten Versuchen mit dem pMAX-GFP-Konstrukt als sehr vielversprechend mit Effizienzen von mehr als 50%. Die Nukleofektion erfolgte mit dem inzwischen generierten  $\Delta$ N-ERG-pCDNA3.1zeo-Konstrukt Nr.3142 sowie dem dazugehörigen Leervektor Nr.3129. Der anschließend durchgeführte Western Blot erbrachte den Nachweis der erfolgreichen Nukleofektion und Plasmid-Expression auf Proteinebene, in Form von kräftigen Proteinbanden in der Höhe von ungefähr 55kD. Die Berechnung des Molekulargewichts des  $\Delta$ N-ERG-Proteins anhand der Proteinsequenz von 462 Aminosäuren (NP\_004440.1) bestätigte das Gewicht von ungefähr 53-55kD, übereinstimmend mit den Aussagen von Klezovitch et al., die das Protein ebenfalls als 53-55kD groß beschrieben [30].

Die Selektion der positiven Klone war allerdings auch nach erfolgreicher Nukleofektion mit mutmaßlich hohen Transfektionseffizienzen nicht möglich. Die geringen Zelldichten während der Selektionsphase waren folglich nicht der alleinige Grund der wiederholt frustrierten stabilen Transfektionen.

Bei der BPH1-Zelllinie handelt es sich um immortalisierte humane benigne Prostatahyperplasiezellen. Die Immortalisierung erfolgte über das Einbringen des *Simian-Virus 40 (SV40)-T*-Antigens [31]. Dieses virale *Large-T*-Antigen ist ein sequenzspezifisches DNA-Bindungsprotein. Es stimuliert Promotoren verschiedener viraler und zellulärer RNA-Polymerasen-II in transfizierten eukaryotischen Zellen, darunter auch den *SV40-late*-Promotor. Diese trans-Aktivierung ist aber beispielsweise auch durch andere zelluläre Transkriptionsfaktoren möglich [54]. Die Aktivierung dieses viralen Transkriptionsmechanismus könnte in den transfizierten humanen BPH1-Zellen zu einer übermäßigen Expression der  $\Delta$ N-ERG-Sequenz führen. Dies zeigte sich bereits in der quantitativen Analyse der Expression auf RNA-Ebene mit einer bis zu 1.500fach gesteigerten Expression in den transient transfizierten BPH1-Zellen. Möglicherweise sind diese hohen  $\Delta$ N-ERG-Expressionslevel auf noch nicht näher untersuchte Weise toxisch für die Zellen. Die starke  $\Delta$ N-ERG-Überexpression könnte beispielsweise direkt die Apoptose der Zellen induzieren.

Da nach den frustrierten Transfektionsversuchen mit den humanen benignen Prostataepithelzellen (BPH1) unklar blieb, ob dies auf die Eigenschaft der BPH1-Zellen zurückzuführen war, dass sie infolge niedriger Transfektionseffizienzen und daraus resultierender zu niedriger Zelldichte unter Selektionsbedingungen, oder ob sie infolge der übermäßigen  $\Delta$ N-ERG-Expression abstarben, wurden zusätzlich HEK293-Zellen transfiziert. Bei diesen Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die durch das Adenovirus Typ 5 transformiert wurden [32]. Sie werden aufgrund ihrer einfachen Handhabung und der meist hohen Transfektionseffizienzen häufig für Transfektionen eingesetzt und standen im Labor für die Experimente dieser Arbeit zur Verfügung. Die Transfektion der HEK293-Zellen mithilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode war auf Anhieb erfolgreich. Die positiven Zellklone wurden über die Zugabe des Antibiotikums Zeocin selektiert und auf diese Weise innerhalb weniger Wochen stabil transfizierte Zelllinien etabliert. Sowohl die Western Blot Analyse der transient transfizierten als auch der stabil transfizierten Zellen zeigten deutliche Proteinbanden in Höhe von 55kD.

An den erfolgreich stabil transfizierten HEK293-Zelllinien wurden die Auswirkungen der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression anhand verschiedener funktioneller und analytischer Assays untersucht.

### 4.3 Funktionelle und analytische Assays an transfizierten HEK293-Zellen

#### Einfluss der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Proliferationsverhalten

Zunächst wurde der Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Proliferationsverhalten der transfizierten HEK293-Zellen anhand des MTT-Assays untersucht. Die Proliferationskurven beider Zelllinien - der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden und der Kontroll-Zelllinie - entwickelten sich parallel im Sinne eines sigmoidalen Verlaufs der gemessenen Formazan-Konzentration als Maß für die Zellzahl über der Zeit. Dieser Kurvenverlauf bildet das typische exponentielle Wachstumsverhalten von Zellen ab. Nach einer gewissen Anlaufphase nimmt die Zellpopulation immer um den gleichen Prozentsatz zu (konstante Vermehrungsrate) [11]. Im Verlauf stellt sich dann eine Verlangsamung des Wachstums ein, im Sinne eines Plateaus bzw. im Sinne einer konstanten Zellzahl. Dies ist beispielsweise auf ein vermindertes Nährstoffangebot aber auch auf die sich über Zell-Zell-Kontakte ausbildende Kontaktinhibition zurückzuführen [49].

Die wiederholt voneinander unabhängig durchgeführten MTT-Assays zeigten keinen Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Proliferationsverhalten von HEK293-Zellen. Basierend auf den Ergebnissen im *in-vitro*-Modell scheint die Überexpression von  $\Delta$ N-ERG demnach keinen Einfluss auf die Tumorprogression im Sinne einer Proliferationssteigerung zu haben. Gleiche Beobachtungen wurden in der Literatur beschrieben. Auch in anderen Zelllinien, wie z.B. transfizierten BPH1-Zellen, war keine Beeinflussung der Zellproliferation unter einer Überexpression von  $\Delta$ N-ERG nachweisbar [53, 55]. Nur im Zusammenhang mit einem gleichzeitig bestehenden Verlust des *PTEN*-Gens, d.h. einer weiteren chromosomalen Aberration, konnte eine verstärkte Proliferation der Zellen und damit eine verstärkte Tumorprogression nachgewiesen werden [53]. Bei *PTEN* handelt es sich um ein Tumorsuppressor-Gen im Prostatakarzinom, dessen Verlust besonders häufig in Zusammenhang mit der TMPRSS2-ERG-Fusion gefunden wurde [56]. Insbesondere waren wesentlich häufiger vollständige Verluste des *PTEN*-Gens nachweisbar als lokalisierte Punktmutationen [56, 57]. Ein Verlust des *PTEN*-Gens in ERG-überexprimierenden Tumoren ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert, beispielsweise im Sinne eines frühen Krankheitsrückfalls, während der Verlust von *PTEN* in ERG-negativen Tumoren keinen Einfluss auf die Prognose aufweist [28, 57, 58]. Dies zeigt Hinweise für ein mögliches Zusammenspiel der durch ERG und *PTEN* aktivierten Signalwege auf [57].

Reid et al. führten ausführliche Analysen hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der TMPRSS2-ERG-Fusion, des *PTEN*-Verlusts und der Prognose der Patienten mit invasivem

Prostatakarzinom durch [9]. Sowohl der Verlust des *PTEN*-Gens als auch der ERG-Fusionsstatus waren allein betrachtet keine signifikanten Prädiktoren für das Überleben der Patienten, wobei Patienten ohne *PTEN*- oder ERG-Aberrationen die beste Prognose aufwiesen (krebspezifisches Überleben nach 11 Jahren 85,5%). Die schlechteste Prognose mit einem krebspezifischen Überleben nach 11 Jahren von nur 13,7% zeigte sich bei einem *PTEN*-Verlust ohne assoziierte TMPRSS2-ERG-Fusion. Aber auch in dieser Studie konnte die prognostische Aussagekraft der TMPRSS2-ERG-Fusion nicht abschließend geklärt werden.

Möglicherweise beeinflussen andere im Prostatakarzinom nachweisbare genetische Läsionen die Prognose der Patienten mit. Beispielsweise überexprimieren Tumore ohne nachweisbare Fusion das SPINK1-Gen, was mit schlechtem outcome assoziiert ist [9]. Auch Leinonen et al. beschrieben eine Assoziation zwischen der gesteigerten Expression von SPINK1 und einem aggressiveren Krankheitsverlauf. Einen Zusammenhang zwischen der Prognose der Patienten und allein dem TMPRSS2-ERG-Fusionsstatus konnte aber auch diese Arbeitsgruppe nicht herausstellen [59].

Zusammenfassend gib es für die TMPRSS2-ERG-Fusion selbst hinsichtlich der prognostischen Relevanz in der Literatur unterschiedliche Aussagen - von einer Assoziation mit einem besseren *outcome*, über eine schlechtere Prognose bis hin zu keiner nachweisbaren Assoziation [18, 22, 60, 61]. Insgesamt konnte der TMPRSS2-ERG-Fusion und der daraus resultierenden ERG-Überexpression zuletzt jedoch keine eindeutige prognostische Relevanz nachgewiesen werden [62].

### **Einfluss der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Migrationsverhalten**

Die Untersuchung des Einflusses der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Migrationsverhalten von transfizierten HEK293-Zellen zeigte im durchgeführten Scratch-Assay eine Steigerung der Zellmigration. Nach einem Beobachtungszeitraum von zwölf Stunden war eine deutliche Abnahme der Spaltbreite in den mit dem  $\Delta$ N-ERG-Konstrukt transfizierten Zellen von nahezu 85 % zu verzeichnen, im Vergleich zur Kontrollzelllinie mit nur rund 75 %. Eine Signifikanz konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Der sich im Scratch-Assay gezeigte migrationssteigernde Effekt des  $\Delta$ N-ERG-Proteins konnte in wiederholt durchgeführten Transwell-Migrationsassays nicht bestätigt werden. In der Auswertung der Transwellmembranen zeigten sich in der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zelllinie zwar insgesamt deutlich mehr migrierte Zellen, > 20 % mehr als in der Kontroll-Zelllinie. Allerdings war die Streuung der Werte in Form von weiten Standardabweichungen groß. Eine Signifikanz war auch in wiederholt durchgeführten unabhängigen Transwell-Migrationsassays nicht nachweisbar.

In der Literatur sind zum Migrationsverhalten der Zellen unter dem Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression ebenfalls widersprüchliche Beobachtungen beschrieben, je nach verwendeter Zelllinie und dem jeweilig durchgeführten Assay. Carver et al. beschrieb eine Migrationssteigerung in PC-3- und MEF-Zellen [53]. Die Daten zu dem durchgeführten Assay wurden im veröffentlichten Paper nicht dargestellt, so dass eine detaillierte Beurteilung des beschriebenen Effekts nicht möglich ist. Die Untersuchung in BPH1-Zellen zeigte in der Literatur keinen Einfluss bzw. nur eine sehr geringe Stimulation des Migrationsverhaltens der Zellen durch die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression [30], übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Bezüglich der der Migration zugrundeliegenden Signalwege fanden erstmals Carver et al. in einer Microarray-Expressionsanalyse von Prostatakarzinomzellen, die die TMPRSS2-ERG-Fusion aufwiesen, eine transkriptionale Hochregulation der Gene für CXCR4 und auch ADAMTS1. Beide Gene sind an Vorgängen der Proliferation, Migration und Invasion im Prostatakarzinom beteiligt [53, 63]. Zum Einen kommt es über die durch die TMPRSS2-ERG-Fusion bedingte Androgenabhängigkeit von ERG zu einer androgenabhängigen Expression von CXCR4 [63]. Zum Anderen fanden sich in weiteren Studien außerdem mehrere Bindungsstellen für ERG innerhalb des CXCR4-Promotors [63, 64]. Die Arbeitsgruppe um Singareddy et al. folgerete aus ihren Untersuchungen, dass das durch ERG induzierte CXCR4 über die sich anschließenden Signalwege an der Tumorzelladhäsion, -migration und -invasion beteiligt ist [63]. Im durchgeführten Migrationsassay konnte der *knockdown* von ERG die Migration der untersuchten Zellen jedoch nicht beeinflussen. Es bleibt folglich unklar, ob die durch ERG gesteigerte Expression von CXCR4 auch zu einer Aktivierung der nachgeschalteten migrationssteigernden Signalwege führt und dies allein eine Migrationssteigerung von Prostatakarzinomzellen hervorrufen kann.

Werden methodische Gründe für die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse ausgeschlossen, führt die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen nicht zu einer Steigerung der Zellmigration. Möglicherweise sind zusätzliche chromosomale Aberrationen oder andere stimulierende intrazelluläre Einflüsse auf migrationssteigernde Signalwege notwendig, um die zellulären Prozesse in Richtung gesteigerter Migration zu verändern. Außerdem sind passende Chemotaxis-Signale stets ausschlaggebend zur Initiierung von Migrationsprozessen. In Übereinstimmung mit der Literatur ist eine Hemmung der Zellmigration durch die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression unwahrscheinlich.

### **Beeinflussung des invasiven Verhaltens durch die $\Delta$ N-ERG-Überexpression**

Neben der Migration ist auch das invasive Verhalten der Zellen zentraler Bestandteil des Tumorprogresses - im Sinne der lokalen Größenausdehnung des Tumors gleichermaßen wie im Sinne der Metastasierung. In dem in dieser Arbeit durchgeführten Matrigel-Invasions-Assay konnte ein deutlich steigernder Effekt der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das invasive Verhalten der HEK293-Zellen gezeigt werden. Bei der  $\Delta$ N-ERG-Zelllinie fanden sich etwa dreimal so viele invadierte Zellen wie bei der Kontroll-Zelllinie. Die statistische Auswertung zeigte im nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Test einen signifikanten invasionssteigernden Effekt ( $p = 0,004$ ). Der invasionssteigernde Effekt wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen in verschiedenen Zellsystemen beobachtet [30, 53, 55]. Durch den *knockdown* von ERG in transfizierten VCaP-Zellen konnte das gesteigerte invasive Verhalten der Zellen unterdrückt werden [55]. Möglicherweise initiiert ERG auf diese Weise sogar den entscheidenden Schritt beim Übergang der PIN in ein invasives Karzinom [53].

Zur genaueren Analyse des möglichen Mechanismus der gesteigerten Invasion von  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen wurde anhand der Gelatin-Zymographie das Expressionsmuster sowie die Aktivität der invasionsrelevanten Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 semi-quantitativ bestimmt. Matrix-Metalloproteasen (MMP) werden von den Zellen in die sie umgebene Matrix sezerniert, wodurch diese proteolytisch degradiert und so die Invasivität von Tumorzellen gesteigert wird. Die Zymographie zeigte generell eine ausgeprägte Expression der untersuchten Matrix-Metalloproteasen. Für MMP-2, Pro-MMP-2 und MMP-9 zeigten sich in der vergleichenden Analyse der Zelllinien keine Unterschiede in der Sekretion. In den mit  $\Delta$ N-ERG transfizierten Zellen konnte allerdings eine deutlich stärkere Expression des Proenzym Pro-MMP 9 als in der Kontroll-Zelllinie nachgewiesen werden. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine gesteigerte Expression von MMP-9 infolge der TMPRSS2-ERG-Fusion nachweisen [63, 65]

Da für das invasive Verhalten von Tumorzellen nicht nur die bloße Sekretion von MMPs, sondern vielmehr das Verhältnis von invasionsfördernden MMPs und deren spezifischer Inhibitoren, den *Tissue Inhibitors of Metalloprotease* (TIMPs), relevant ist, wurden ergänzend zum Expressionsprofil der MMPs die Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 untersucht. Sie werden ebenfalls von den Zellen in die sie umgebene Matrix sezerniert, um dort ihren inhibitorischen Einfluss auszuüben. In der vergleichenden Analyse der Expressionslevel im Western Blot zeigte sich eine verminderte TIMP-1-Sekretion der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden HEK293-Zellen gegenüber den Kontrollzellen. Die Detektion von TIMP-2 war auch in wiederholt durchgeführten Western Blots nicht möglich. Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Miyamori et

al., die zeigen konnten, dass die HEK293-Grundzelllinie nur sehr geringe Mengen an endogenem TIMP-2 sezerniert [66].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von  $\Delta$ N-ERG in HEK293-Zellen zu einer gesteigerten Sekretion von Pro-MMP-9 und einer gleichzeitig verminderter Sekretion des Inhibitors TIMP-1 führt. Folglich wird das Verhältnis von invasionsfördernden MMPs und invasionshemmenden TIMPs zugunsten der MMPs verschoben, was den invasionsfördernden Effekt von  $\Delta$ N-ERG im Matrigel-Invasionsassay erklären kann.

Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur ist die gesteigerte Sekretion der MMPs möglicherweise auf die durch die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression hervorgerufene gesteigerte Expression von CXCR4 zurückzuführen. Vielfach wurde die Hochregulation der Expression von CXCR4 unter der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression beschrieben [53, 63, 64]. Im CXCR4-Promotor finden sich mehrere Bindungsstellen für ERG [63, 64] und es konnte gezeigt werden, dass die CXCL12-CXCR4-Interaktion zu einer gesteigerten Expression von MMP-2 und MMP-9 führt [67, 68]. Hohe CXCR4-Level sind außerdem mit einer erhöhten Tumoraggressivität und Invasivität und damit mit einem schlechteren *outcome* der Patienten assoziiert [63, 67]. CXCL12 wirkt neben der gesteigerten Sekretion von MMPs über die Interaktion mit CXCR4 zusätzlich als Chemoattractans und fördert darüber die Metastasierung des Prostatakarzinoms, insbesondere in den Knochen [68]. Hohe Plasmalevel der MMPs korrelieren dabei mit dem Vorkommen von Metastasen [67].

Tomlins et al. beschrieben im Zusammenhang mit der Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus der Invasionssteigerung außerdem eine verstärkte Expression der Matrix-Metalloprotease MMP-3 ohne gleichzeitige Analyse der TIMP-Expressionslevel [55]. Und auch die Aktivierung des Plasminogen-Aktivator-Signalwegs oder die Hochregulation von ADAMTS1 wurden in Hinblick auf die  $\Delta$ N-ERG-induzierten Invasionssteigerung beschrieben [30, 53, 55]. Sowohl beim Plasminogen-Aktivator (PLAU) als auch bei der Matrix-Metalloprotease 3 (MMP-3) handelt es sich um direkte Zielgene von ETS-Transkriptionsfaktoren. Ein MMP-3-Inhibitor zeigte allerdings *in-vitro* keinen Effekt auf das invasive Verhalten der Zellen, währenddessen sich der invasionssteigernde Effekt durch Zugabe von PLAU-Inhibitoren revidieren ließ [30, 55].

Viele, möglicherweise auch noch nicht beschriebene Einflussfaktoren und Signalwege spielen bei der Invasionssteigerung durch die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression eine Rolle. Weitere Untersuchungen sind folglich notwendig, um die zugrundeliegenden Signalwege der Invasionssteigerung abschließend zu klären.

### **Einfluss der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf den Tiam1-Rac-Signalweg**

Desweiteren wurde in dieser Arbeit der mögliche Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf den Tiam1-Rac-Signalweg untersucht, der ebenfalls zelluläre Prozesse der Invasion und Migration beeinflusst [69].

Rac1 gehört als niedermolekulare Rho-ähnliche GTPase mit einer Größe von 21kD zur Ras-Superfamilie und wird in allen eukaryotischen Zellen exprimiert. Es ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. der Regulation des Zellzyklus, der Zellmorphologie und -migration, beteiligt [70]. Besonders der Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett spielt eine wesentliche Rolle im Zusammenhang mit der Zelladhäsion, -migration und -invasion [69]. Die Aktivierung von Rac1, durch die Bindung von GTP, wird durch verschiedene zelluläre Proteine reguliert, darunter sog. Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (*guanine nucleotide exchange factor*, *GNEF*) [70]. Zu diesen *GNEF* gehört auch Tiam1. Tiam1 weist eine Größe von ca. 200kD auf und wird in Prostatakarzinomzellen und *high-grade* PIN-Läsionen stärker exprimiert als im korrespondierenden Normalgewebe [10]. Darüber hinaus ist die Tiam1-Überexpression statistisch signifikant mit einem herabgesetzten krankheitsfreien Überleben assoziiert und erwies sich in einer multivariaten Analyse als ein möglicher unabhängiger Prognosefaktor des Prostatakarzinoms [10].

In den durchgeführten Analysen konnte kein Einfluss der Überexpression von  $\Delta$ N-ERG in HEK293-Zellen auf den Tiam1-Rac-Signalweg nachgewiesen werden. In den vergleichenden Western-Blot-Untersuchungen zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede weder in der Tiam1- noch in der Rac-Expression zwischen den stabil transfizierten HEK293-Zelllinien. Da für die Funktion von Rac nicht nur das Ausmaß der Proteinexpression, sondern insbesondere die Aktivität des Proteins relevant ist, wurde ein Rac-Aktivitätsassay durchgeführt. Ein Unterschied in der Aktivität von Rac hat sich zwischen den  $\Delta$ N-ERG transfizierten HEK293-Zellen und der mock-transfizierten Kontroll-Zelllinie jedoch nicht nachweisen lassen.

Die genannten Ergebnisse zeigen, dass die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen keinen Einfluss auf den Tiam1-Rac-Signalweg hat und dass die  $\Delta$ N-ERG-induzierte Invasionssteigerung in HEK293-Zellen offenbar nicht durch den Tiam1-Rac-Signalweg vermittelt wird.

### **Einfluss der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zell-Zelladhäsion**

Hinsichtlich der Zellmorphologie und des Zellwachstums erbrachte die vergleichende Beurteilung der  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden und mock-transfizierten HEK293-Zellen in Kultur keinen Unterschied. Bei den HEK293-Zellen handelt sich um epitheloide Zellen teils unterschiedlicher

Größe mit einer teils pyramidalen, teils rhomboiden Morphologie [32]. Während der Untersuchungen zu dieser Arbeit wuchsen die HEK293-Zellen adhären und bildeten bereits nach kurzer Zeit einen konfluenten *monolayer* aus. Während der Kultivierung der Zellen war allerdings wiederholt eine insgesamt schwache Adhärenz sowohl an der Zellkulturschale, als auch den Zellen untereinander zu beobachten. Bei vollständiger Konfluenz des Zellrasens war wiederholt das sehr leichte Abschwimmen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale zu beobachten. Meist waren bereits sehr geringe Menge an Trypsin/EDTA ausreichend, um die Zellen von der Zellkulturschale zu lösen. Diese Beobachtungen gelten für beide untersuchte Zelllinien, so dass abschließend festgestellt werden kann, dass die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in den transfizierten HEK293-Zelllinien zu keiner mikroskopisch erkennbaren Veränderung von Morphologie oder Zellwachstum führte.

Zur genaueren Analyse wurde der Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zell-Zelladhäsion untersucht. Es wurde insbesondere die Beeinflussung der  $\beta$ -Catenin-Expression in den transfizierten HEK293-Zellen untersucht. E-Cadherin wird in HEK293-Zellen nicht exprimiert [52], und konnte somit in der vorliegenden Arbeit nicht gesondert untersucht werden.

$\beta$ -Catenin ist ein essentieller Bestandteil Cadherin-abhängiger Zellkontakte. Es ist 94 kD groß und verbindet die die Zell-Zelladhäsion herstellenden Cadherine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts [13]. Außerdem interagiert  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren bzw. bindet an solche. Die Ausübung der jeweiligen Funktion ist abhängig von der Lokalisation innerhalb der Zelle [71]. Der Verlust von cadherin-abhängigen Zell-Zell-Kontakten in einem Zellverband führt zu einer verstärkten Freisetzung von  $\beta$ -Catenin in das Zytoplasma. Ist gleichzeitig der Abbau von  $\beta$ -Catenin über die Bindung an den  *$\beta$ -Catenin-destruction-complex* und der anschließende Ubiquitin-abhängige Abbau durch die Proteasomen gehemmt, wird das im Zytoplasma vermehrt anfallende  $\beta$ -Catenin in den Zellkern transportiert und wirkt dort verstärkt in Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren [71].

Die Analyse der  $\beta$ -Catenin-Expression in den mit  $\Delta$ N-ERG transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie zeigte im Western Blot lediglich eine diskrete Verminderung der  $\beta$ -Catenin-Expression in den  $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zellen. Im Vergleich zu anderen in der Arbeitsgruppe untersuchten Zelllinien war die  $\beta$ -Catenin-Expression in HEK293-Zellen insgesamt gering ausgeprägt, was möglicherweise die oben beschriebene schlechte interzelluläre Adhärenz erklärt.

Anhand der durchgeführten Immunfluoreszenz ließ sich die Lokalisation von  $\beta$ -Catenin in den transfizierten HEK293-Zelllinien bestimmen. Sowohl in den  $\Delta$ N-ERG- als auch den mock-transfizierten HEK293-Zellen war  $\beta$ -Catenin verstärkt im Zellkern und nur sehr gering an der

Zellmembran lokalisiert. Ein Unterschied zwischen beiden Zelllinien zeigte sich nicht. Auch dies deutet darauf hin, dass HEK293-Zellen nur wenig  $\beta$ -Catenin-abhängige Zell-Zell-Kontakte aufweisen und  $\beta$ -Catenin in diesen Zellen vorrangig in Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wirkt. Eine Verlagerung von  $\beta$ -Catenin innerhalb der Zelle durch die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression konnte bei bereits hohem  $\beta$ -Catenin-Vorkommen im Zellkern der Kontrollzellen nicht nachgewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen könnten eventuell dennoch einen Einfluss von  $\Delta$ N-ERG nachweisen durch die verstärkte Aktivität  $\beta$ -Catenin-abhängiger Signalwege.

So spielt beispielsweise der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle in der Embryogenese, Organogenese sowie bei der Entwicklung maligner Erkrankungen [72, 73]. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs führt zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Plasma und schließlich zur Translokation in den Zellkern.  $\beta$ -Catenin wiederum kann so mit verschiedenen nukleären Transkriptionsfaktoren interagieren, wie beispielsweise mit LEF1. In aktuellen Untersuchungen zeigte sich, dass die TMPRSS2-ERG-Fusion bzw. die ERG-Überexpression als Aktivator des Wnt/LEF1-Signalwegs fungieren kann. Unter der ERG-Überexpression wurde eine Steigerung der intrazellulären  $\beta$ -Catenin-Level sowie gesteigerte LEF1-Level beobachtet [74]. Die Hochregulation von  $\beta$ -Catenin erfolgt möglicherweise über den Wnt-Rezeptor FZD4 [75]. In der Literatur zeigten sich außerdem Hinweise darauf, dass LEF1 möglicherweise ein direktes Zielgen von ERG ist, über die Bindung an den LEF1-Promotor, wodurch eine direkte Stimulation des Wnt-Signalwegs erfolgen kann [74].

Die Interaktion von ERG und dem Wnt-Signalweg scheint insgesamt eine zentrale Rolle in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms zu spielen. So zeigte sich beispielsweise eine Korrelation zwischen dem aktivierten Wnt-Signalweg und einem fortgeschrittenen, hormonrefraktären Stadium des Prostatakarzinoms. Die exakte biologische Relevanz, d.h. der Effekt auf das biologische Verhalten des Prostatakarzinoms, wurde jedoch noch nicht ausreichend geklärt [74]. Gupta et al. stellten außerdem die ERG-Überexpression mit der epithelialen-mesenchymalen Transformation (*Epithelial-to-Mesenchymal Transition*, EMT) der Prostatakarzinomzellen über die Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Zusammenhang [75]. Die EMT spielt eine zentrale Rolle in der Karzinogenese, insbesondere hinsichtlich des Übergangs zum invasiven Karzinom [76]. Während des EMT-Prozesses verlieren die Zellen ihren epithelialen Charakter, sie verlieren sowohl Polarität als auch Zell-Zell-Kontakte, und exprimieren zunehmend Merkmale mesenchymaler Zellen [76], was wiederum zu erhöhter Migration und Invasivität der Tumorzellen führt [77]. Eine zentrale Rolle dabei spielt der Verlust von E-Cadherin [75]. Inzwischen sind in der Literatur immer mehr Interaktionspartner von ERG in der Initiierung der epithelialen-mesenchymalen Transformation beschrieben. Neben des bereits erwähnten Wnt-Signalwegs,

der unter anderem durch ERG über FZDA4 aktiviert werden kann, werden ZEB1/ZEB2 sowie SOX4 als Vermittler der ERG-abhängigen EMT-Induktion beschrieben, teils indirekt über weitere vermittelnde Signalwege, teils direkt durch Bindung von ERG an die entsprechenden Promotoren [75, 77, 78].

Zusammengefasst konnten in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an HEK293-Zellen keine signifikanten Effekte der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zell-Zelladhäsion sowie die Expression und intrazelluläre Verteilung von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden.

### **Transformierende Effekte der $\Delta$ N-ERG-Überexpression**

Abschließend wurden in dieser Arbeit die transformierenden Eigenschaften der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen untersucht. Bei den durchgeführten Assays, dem Colony-Formation- und dem Softagar-Assay, handelt es sich um zwei verschiedene und vielfach verwendete *in-vitro*-Assays zur Untersuchung der malignen Transformation von Zellen.

Der Colony-Formation-Assay untersucht, inwieweit das Zellwachstum der transfizierten Zellen noch über den Mechanismus der Kontaktinhibition reguliert wird. Nicht transformierte Zellen werden durch die sich ausbildenden Zell-Zell-Kontakte in ihrem Wachstum gehemmt, transformierte Zellen hingegen wachsen weiter und können auf diese Weise sog. Kolonien bilden [49]. Der Colony-Formation-Assay zeigte abschließend keinen Unterschied zwischen den untersuchten Zelllinien. Beide Zelllinien bildeten einen konfluenten *monolayer* aus, ohne Nachweis von Kolonien. Das wiederholte frühzeitige Abschwimmen des gesamten *monolayers* ist als erneuter Hinweis auf die bereits oben beschrieben, immer wieder während verschiedener Experimente beobachtete, schlechte Zelladhäsion der HEK293-Zellen zu werten.

Neben dem Verlust der Kontaktinhibition stellt die Fähigkeit zu adhäsionsunabhängigem Wachstum ein weiteres Merkmal der stattgefundenen onkogenen Transformation dar. Diese wurde anhand des Softagar-Assays untersucht. Über den Versuchsaufbau werden die transfizierten Zellen vereinzelt. Auf diese Weise werden sowohl die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten als auch die Adhäsion der Zellen am Boden der Zellkulturschale verhindert. Nur transformierte Zellen sind in einer solchen Umgebung in der Lage adhäsionsunabhängig zu wachsen und Kolonien zu bilden [51]. Weder in Anzahl noch in der Größe der gewachsenen Kolonien zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden untersuchten HEK293-Zelllinien.

Die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression weist in HEK293-Zellen offenbar keine transformierenden Effekte auf. Es zeigte sich weder eine Koloniebildung infolge des Verlustes der Kontaktinhibition noch ein Einfluss auf das adhäsionsunabhängige Wachstum, als Beispiele für Eigenschaften transformierter Zellen [49, 51].

Die HEK293-Grundzelllinie selbst weist bereits ein geringes onkogenes Potential auf. In Mäusen sind sie in einigen Fällen in der Lage Tumore zu induzieren [32]. Zudem ist eine E-Cadherin-Expression in HEK293-Zellen nicht nachweisbar [52], als möglicher Hinweis der bereits stattgefundenen epithelialen-mesenchymalen Transformation (EMT). Dies könnte die fehlenden Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien erklären. Insbesondere könnte dies die Koloniebildung von mock-transfizierten HEK293-Zellen im Softagar erklären.

Untersuchungen hinsichtlich der Fähigkeit des überexprimierten ERG-Proteins zur Tumorentstehung bzw. malignen Transformation von Zellen stehen in der bisher publizierten Literatur ebenfalls immer wieder im Vordergrund. In wiederholt durchgeführten Mausmodellen konnten Induktionen von *high-grade* intraepithelialen Neoplasien der Prostata (HG-PIN) durch ERG beobachtet werden, was ein allgemeines onkogenes Potential voraussetzt [30, 55]. Zudem verzeichneten Arbeitsgruppen unabhängig voneinander einen verstärkten Verlust von Basalzellen unter der ERG-Überexpression als wichtiges histologisches Merkmal dafür, dass sich aus der HG-PIN ein invasives Karzinom entwickelt hat [30, 55].

Anders stellen sich die Beobachtungen hinsichtlich des humanen Prostatakarzinoms dar. Für die vollständige Entwicklung eines invasiven Adenokarzinoms der humanen Prostata braucht es neben der TMPRSS2-ERG-Fusion noch zusätzliche genetische Aberrationen. Die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression allein weist offenbar keine transformierenden Eigenschaften auf [55].

Wie bereits beschrieben weist zwar die Mehrzahl aller humaner Prostatakarzinome die TMPRSS2-ERG-Fusion auf, in der korrespondierenden *high-grade* PIN, der Vorläuferläsion, ist sie jedoch nicht oder nur vereinzelt nachweisbar [28, 53]. Die chromosomale Umlagerung scheint demnach in der Übergangsphase von der HG-PIN zum invasiven Karzinom stattzufinden und den Übergang zum invasiven Karzinom möglicherweise zu beschleunigen [53, 55]. Die eigentliche Initiation des invasiven Adenokarzinoms allein durch die Überexpression von ERG ist in der humanen Prostata - im Gegensatz zum Mausmodell - nicht möglich, hierfür braucht es zusätzliche chromosomale Aberrationen, wie beispielsweise den Verlust des *PTEN*-Gens oder die Amplifikation von *MYC* [28]. Der *PTEN*-Verlust und die daraus resultierende Haploinsuffizienz führt zum verstärkten Auftreten von prostatistischen intraepithelialen Neoplasien (PIN). Der Verlust des *PTEN*-Gens allein ist jedoch ebenfalls nicht in der Lage den Übergang zum invasiven Karzinom zu initiieren. Nur bei einem gemeinsamen Auftreten dieser beiden Läsionen zeigte sich im Mausmodell ein verstärktes Auftreten von invasiven Adenokarzinomen und eine verringerte Latenz der Karzinomentstehung [53]. An der Induktion von Neoplasien der Prostata durch die ERG-Überexpression scheint der PI3-Kinase-Signalweg beteiligt zu sein und könnte somit zukünftig therapeutisch genutzt werden [9, 28]. Zudem scheint ERG allein auch nicht das

Ausmaß der Aggressivität des Prostatakarzinoms zu regulieren. Auch hier gibt es Hinweise für eine Interaktion mit dem Verlust von *PTEN*. Nur die Kombination der ERG-Überexpression und des Verlustes von *PTEN* führen zu einem gesteigerten aggressiven Verhalten von Prostatakarzinomzellen [57].

Zusammenfassend und übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen besitzt die TMPRSS2-ERG-Fusion und die daraus resultierende ERG-Überexpression allein keine transformierenden Eigenschaften [55]. Für die Entwicklung eines invasiven Adenokarzinoms der Prostata braucht es das Zusammenwirken mehrerer genetischer Läsionen.

## 5 Zusammenfassung

In Anbetracht der hohen Inzidenz des Prostatakarzinoms ist die TMPRSS2-ERG-Fusion eine der häufigsten molekularen Veränderungen in malignen Neoplasien der Prostata und ERG das am häufigsten überexprimierte Protoonkogen im Prostatakarzinom [6, 15].

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die häufigste TMPRSS2-ERG-Fusionsvariante (T1/E4) sowie die Auswirkungen der aus dieser Fusion resultierenden  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Zellverhalten im *in-vitro*-Modell untersucht. Hierfür wurden nach erfolgreicher Klonierung und Transfektion der entsprechenden cDNA in HEK293-Zellen funktionelle und analytische Assays zu Proliferation, Migration, Invasion sowie onkogener Transformation durchgeführt.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte ein Einfluss der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Tumorprogression im Sinne einer gesteigerten Proliferation der transfizierten HEK293-Zellen nicht nachgewiesen werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Zellmigration durch die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression nicht beeinflusst wird.

Im Hinblick auf das invasive Verhalten zeigte sich, dass die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen zu einer signifikanten Invasionssteigerung führt. Auf der Suche nach dem zugrunde liegenden Mechanismus war eine durch  $\Delta$ N-ERG hervorgerufene Sekretionssteigerung der Matrix-Metalloprotease (MMP) Pro-MMP-9 nachweisbar, bei gleichzeitig verminderter Sekretion des entsprechenden Inhibitors TIMP-1. Die Sekretion von MMP-2 blieb unbeeinflusst. Folglich wird durch die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression in HEK293-Zellen das Verhältnis von invasionsfördernden MMPs und invasionshemmenden TIMPs zugunsten der MMPs verschoben. Dies kann den nachgewiesenen invasionsfördernden Effekt der  $\Delta$ N-ERG-Überexpression erklären. Ein Einfluss auf den Tiam1-Rac-Signalweg, der bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen spielt, war nicht nachweisbar.

Darüber hinaus hatte die  $\Delta$ N-ERG-Überexpression keine signifikanten Effekte auf die Zell-Zelladhäsion sowie die Expression und intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin. Weiterhin führte die Überexpression von  $\Delta$ N-ERG in HEK293-Zellen weder im Colony-Formation-Assay noch im Softagar-Assay zur onkogenen Transformation dieser Zellen *in-vitro*.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von  $\Delta$ N-ERG *in-vitro* zu einer signifikanten Steigerung der Invasivität von HEK293-Zellen über eine Beeinflussung der Balance zwischen Pro-MMP-9 und TIMP-1 zugunsten von Pro-MMP-9 führt. Andere wichtige biologische Eigenschaften wie die Zellproliferation, Zell-Zelladhäsion und Zellmigration werden hingegen nicht beeinflusst. Darüber hinaus reicht die Überexpression von  $\Delta$ N-ERG in HEK293-Zellen nicht aus, um eine onkogene Transformation dieser Zellen *in-vitro* zu induzieren. Dies deutet darauf hin, dass die häufig nachweisbare TMPRSS2-ERG-Fusion zwar zu einer Aggressivitätssteigerung von Prostatakarzinomen führt, für die Entstehung des Prostatakarzinoms aber alleine nicht ausreicht, sondern hierfür gleichzeitig weitere molekulare bzw. genetische Veränderungen erforderlich sind.

# Literaturverzeichnis

- [1] Böcker, W., Denk, H. und Heitz, P.U. *Pathologie*. Urban & Fisher, 2004. 3. Edition.
- [2] Hautmann, R. und Huland, H. *Urologie*. Springer Verlag, 2006. 3. Edition.
- [3] Haag, P., Hanhart, N. und Müller, M. *Gynäkologie und Urologie Für Studium und Praxis*. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach, 2008/09. 4. Edition.
- [4] Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends*. 2010. 7. Edition.
- [5] Dietel, M., Suttrop, N. und Zeitz, M. *Harrisons Innere Medizin, Deutsche Ausgabe*. ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2005. 16. Edition.
- [6] Petrovics, G. et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene*, 24:3847–3852, 2005.
- [7] Nam, R.K. et al. Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer Biology and Therapy*, 6(1):40–45, 2007.
- [8] Barwick, B.G. et al. Prostate cancer genes associated with TMPRSS2-ERG gene fusion and prognostic of biochemical recurrence in multiple cohorts. *British Journal of Cancer*, 102:570–576, 2010.
- [9] Reid, A.H.M. et al. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 102:678–684, 2010.
- [10] Engers, R. et al. Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *British Journal of Cancer*, 95:1081–1086, 2006.

- [11] Miram, W. und Scharf, K.-H. *Biologie heute SII*. Schroedel Verlag GmbH, Hannover, 2002.
- [12] Buselmaier, W. *Biologie für Mediziner*. Springer-Verlag, 2009. 11. Edition.
- [13] Löffler, G. und Petrides, P.E. *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag, 2003. 7. Edition.
- [14] Schulz, W.A. et al. Genomewide DNA Hypomethylation Is Associated With Alterations on Chromosome 8 in Prostate Carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 35:58–65, 2002.
- [15] Tomlins, S.A. et al. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science*, 310(5748):644–648, 2005.
- [16] Tu, J.J. et al. Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Modern Pathology*, 20:921–928, 2007.
- [17] Yoshimoto, M. et al. Three-Color FISH Analysis of TMPRSS2/ERG Fusions in Prostate Cancer Indicates That Genomic Microdeletion of Chromosome 21 Is Associated with Rearrangement. *Neoplasia*, 8(6):465–469, 2006.
- [18] Wang, J. et al. Expression of Variant TMPRSS2/ERG Fusion Messenger RNAs Is Associated with Aggressive Prostate Cancer. *Cancer Research*, 66(17):8347–8351, 2006.
- [19] Clark, J. et al. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene*, 26:2667–2673, 2007.
- [20] Wang, J. et al. Pleiotropic Biological Activities of Alternatively Spliced TMPRSS2/ERG Fusion Gene Transcripts. *Cancer Research*, 68(20):8516–8524, 2008.
- [21] Hermans, K.G. et al. 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 Research*, 66(22):10658–10663, 2006.
- [22] Perner, S. et al. TMPRSS2:ERG Fusion-Associated Deletions Provide Insight into the Heterogeneity of Prostate Cancer. *Cancer Research*, 66(17):8337–8341, 2006.
- [23] Liu, W. et al. Multiple Genomic Alterations on 21q22 Predict Various TMPRSS2/ERG Fusion Transcripts in Human Prostate Cancers. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 46:972–980, 2007.

- [24] Wang, Q. et al. A Hierarchical Network of Transcription Factors Governs Androgen Receptor-Dependent Prostate Cancer Growth. *Molecular Cell*, 27(3):380–392, 2007.
- [25] Yu, J. et al. An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. *Cancer Cell*, 17(5):443–454, 2010.
- [26] Luedeke, M. et al. Predisposition for TMPRSS2-ERG Fusion in Prostate Cancer by Variants in DNA Repair Genes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 18(11):3030–3035, 2009.
- [27] Bastus, N.C. et al. Androgen-Induced TMPRSS2:ERG Fusion in Nonmalignant Prostate Epithelial Cells. *Cancer Research*, 70(23):9544–9548, 2010.
- [28] King, J.C. et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nature Genetics*, 41(5):524–526, 2009.
- [29] Fine, S.W. et al. TMPRSS2-ERG gene fusion is associated with low Gleason scores and not with high-grade morphological features. *Modern Pathology*, 23:1325–1333, 2010.
- [30] Klezovitch, O. et al. A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium. *PNAS*, 105(6):2105–2110, 2008.
- [31] Hayward, S.W. et al. Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 31(1):14–24, 1995.
- [32] Graham, F.L. et al. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal of General Virology*, 36:59–72, 1977.
- [33] Mertz, K.D. et al. Molecular Characterization of TMPRSS2-ERG Gene Fusion in the NCI-H660 Prostate Cancer Cell Line: A New Perspective for an Old Model. *Neoplasia*, 9(3):200–206, 2007.
- [34] Horoszewicz, J.S. et al. LNCap Model of Human Prostatic Carinoma. *Cancer Research*, 43:1809–1818, 1983.
- [35] Kaighn, M.E. et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*, 17(1):16–23, 1979.
- [36] Qiagen. *RNeasy Mini Handbook*, 4th edition, April 2006.

- [37] Mülhardt, C. *Der Experimentator Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2009. 6. Edition.
- [38] Qiagen. *Omniscript Reverse Transcription Handbook*, May 2004.
- [39] Fermentas. *Handbook: CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit #K1231, #K1232*.
- [40] Papworth, C. et al. Site-Directed Mutagenesis in One day with >80% Efficiency. *Strategies*, 9:3–4, 1996.
- [41] Schmitz, S. *Der Experimentator Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2011. 3. Edition.
- [42] Jordan, M. et al. Transfecting Mammalian Cells: Optimization of Critical Parameters Affecting Calcium-Phosphate Precipitate Formation. *Nucleic Acids Research*, 24(4):596–601, 1996.
- [43] Rehm, H. und Letzel, T. *Der Experimentator Proteinbiochemie/ Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2010. 6. Edition.
- [44] W.Luttmann, K.Bratke, M.Küpper und D.Myrtek. *Der Experimentator Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2006. 2. Edition.
- [45] Berridge, M.V. et al. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4:14–19, 1996.
- [46] Engers, R. et al. In vitro invasiveness of human epithelioid-sarcoma cell lines: Association with cell motility and inverse correlation with the expression of tissue inhibitor of metalloproteinases. *International Journal of Cancer*, 80:406–412, 1999.
- [47] Albini, A. et al. A Rapid in Vitro Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells. *Cancer Research*, 47:3239–3245, 1987.
- [48] Sander, E.E. et al. Matrix-dependent Tiam1/Rac Signaling in Epithelial Cells Promotes Either Cell-Cell Adhesion or Cell Migration and Is Regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *The Journal of Cell Biology*, 143(5):1385–1398, 1998.
- [49] Seluanov, A. et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *PNAS*, 106(46):19352–19357, 2009.
- [50] Engers, R. et al. Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *International Journal of Cancer*, 88:369–376, 2000.

- [51] Mori, S. et al. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene*, 28:2796–2805, 2009.
- [52] Hogan, C. et al. Rap1 Regulates the Formation of E-Cadherin-Based Cell-Cell Contacts. *Molecular and Cellular Biology*, 24(15):6690–6700, 2004.
- [53] Carver, B.S. et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nature Genetics*, 41(5):619–624, 2009.
- [54] Casaz, P. et al. Trans Activation of the Simian Virus 40 Late Promoter by Large T Antigen Requires Binding Sites for the Cellular Transcription Factor TEF-1. *Journal of Virology*, 65(12):6535–6543, 1991.
- [55] Tomlins, S.A. et al. Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer. *Neoplasia*, 10(2):177–188, 2008.
- [56] Taylor, B.S. et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell*, 18:11–22, 2010.
- [57] Leinonen, K.A. et al. Loss of PTEN Is Associated with Aggressive Behavior in ERG-Positive Prostate Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 22(12):2333–2344, 2013.
- [58] McCall, P. et al. Is PTEN loss associated with clinical outcome measures in human prostate cancer? *British Journal of Cancer*, 99:1296–1301, 2008.
- [59] Leinonen, K.A. et al. Association of SPINK1 Expression and TMPRSS2:ERG Fusion with Prognosis in Endocrine-Treated Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(10):2845–2851, 2010.
- [60] Saramäki, O.R. et al. TMPRSS2:ERG Fusion Identifies a Subgroup of Prostate Cancers with a Favorable Prognosis. *Clinical Cancer Research*, 14(11):3395–3400, 2008.
- [61] Gopalan, A. et al. TMPRSS2-ERG Gene Fusion Is Not Associated with Outcome in Patients Treated by Prostatectomy. *Cancer Research*, 69(4):1400–1406, 2009.
- [62] Pettersson, A. et al. The TMPRSS2:ERG Rearrangement, ERG Expression, and Prostate Cancer Outcomes: A Cohort Study and Meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 21(9):1497–1509, 2012.
- [63] Singareddy, R. et al. Transcriptional Regulation of CXCR4 in Prostate Cancer: Significance of TMPRSS2-ERG Fusions. *Molecular Cancer Research*, 11(11):1349–1361, 2013.

- [64] Cai, J. et al. Androgens Induce Functional CXCR4 through ERG Factor Expression in TMPRSS2-ERG Fusion-Positive Prostate Cancer Cells. *Translational Oncology*, 3(3):195–203, 2010.
- [65] Tian, T.V. et al. Identification of novel TMPRSS2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene*, 33:2204–2214, 2014.
- [66] Miyamori, H. et al. Claudin Promotes Activation of Pro-matrix Metalloproteinase-2 Mediated by Membrane-type Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(30):28204–28211, 2001.
- [67] Singh, S. et al. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Laboratory Investigation*, 84:1666–1676, 2004.
- [68] Chinni, S.R. et al. CXCL12/CXCR4 Signaling Activates Akt-1 and MMP-9 Expression in Prostate Cancer Cells: The Role of Bone Microenvironment-Associated CXCL12. *The Prostate*, 66:32–48, 2006.
- [69] Engers, R. et al. Rac Affects Invasion of Human Renal Cell Carcinomas by Up-regulating Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45):41889–41897, 2001.
- [70] Jaffe, A.B. and Hall, A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21:247–269, 2005.
- [71] Valenta, T. et al. The many faces and functions of  $\beta$ -Catenin. *The EMBO Journal*, 31:2714–2736, 2012.
- [72] Polakis, P. The oncogenic activation of  $\beta$ -catenin. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9:15–21, 1999.
- [73] Logan, C.Y. and Nusse, R. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20:781–810, 2004.
- [74] Wu, L. et al. ERG Is a Critical Regulator of Wnt/LEF1 Signaling in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 73(19):6068–6079, 2013.
- [75] Gupta, S. et al. FZD4 as a Mediator of ERG Oncogene-Induced WNT Signaling and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 70(17):6735–6745, 2010.

- 
- [76] Kang, Y. and Massagué, J. Epithelial-Mesenchymal Transitions: Twist in Development and Metastasis. *Cell*, 118:277–279, 2004.
- [77] Leshem, O. et al. TMPRSS2/ERG Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition through the ZEB1/ZEB2 Axis in a Prostate Cancer Model. *PLoS ONE*, 6(7):e21650, 2011.
- [78] Wang, L. et al. ERG-SOX4 Interaction Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Cells. *The Prostate*, 74(6):647–658, 2014.

# Anhang

# Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	<i>Epithelial-to-Mesenchymal Transition</i> , epitheliale-mesenchymale Transformation
ERG	<i>ETS-Related-Gene</i>
ΔN-ERG	N-terminal trunkiertes ERG
ETS	<i>E-Twenty-Six</i>
FCS	foetales Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
<i>g</i>	Schleuderziffer bei der Zentrifugation
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GFP	grün fluoreszierendes Protein
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HG-PIN	<i>high-grade</i> prostatistische intraepitheliale Neoplasie
hia	hitzeinaktiviert
HKG	<i>Housekeeping-Gen</i>
IP	Immunpräzipitate
kb	Kilobase = $10^3$ Basenpaare
kD	Kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i>
Mb	Megabasen = $10^6$ Basenpaare
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PLAU	Plasminogen-Aktivator
PSA	prostata-spezifisches Antigen
QRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
rcf	<i>Relative Centrifugal Force</i> , Relative Zentripetalbeschleunigung
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium des Roswell Park Memorial Instituts

---

RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloprotease
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
<i>T<sub>m</sub></i>	Schmelztemperatur
TMPRSS2	<i>Transmembrane Protease, Serine 2</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan
U	<i>Unit</i> , Enzymeinheit

# Abbildungsverzeichnis

3.1	Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus cDNA der NCI-H660-Zelllinie. . . . .	64
3.2	Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus cDNA verschiedener Zelllinien und der Tumorprobe 727T. . .	65
3.3	Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus verschiedenen Tumorproben sowie zum Vergleich der Expressionslevel untereinander. . . . .	65
3.4	Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der erfolgreichen Amplifikation der $\Delta$ N-ERG-Sequenz aus frischem Prostatatumorgewebe (T21005); Pfu- und Taq-DNA-Polymerase im Vergleich. . . . .	67
3.5	Repräsentative Gesichtfelder der $\beta$ -Gal-Färbung der transfizierten humanen BPH1-Zellen zur vergleichenden Beurteilung der Transfektionseffizienz der unterschiedlichen Transfektionsreagenzien. . . . .	70
3.6	$\Delta$ N-ERG-Expressionsniveau in transient transfizierten humanen BPH1-Zellen, relativ zum Haushaltsgen GAPDH. . . . .	71
3.7	Western Blot zum Nachweis der $\Delta$ N-ERG-Proteinexpression in den durch Nucleofektion transfizierten humanen BPH1-Zellen. . . . .	72
3.8	Western Blot zum Nachweis der $\Delta$ N-ERG-Proteinexpression in den transient transfizierten HEK293-Zellen. . . . .	73
3.9	Western Blot zum Nachweis der $\Delta$ N-ERG-Proteinexpression nach stabiler Transfektion der HEK293-Zellen, sowie Vergleich der $\Delta$ N-ERG-Expression in stabil und transient transfizierten Zellen. . . . .	74
3.10	MTT-Proliferationsassay. Analyse des Proliferationsverhaltens der $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden HEK293-Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie. . . . .	76
3.11	Scratch-Assay. Analyse des Einflusses der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf die Zellmigration anhand der $\Delta$ N-ERG transfizierten HEK293-Zellen. . . . .	77

---

3.12 Transwell-Migrations-Assay. Analyse des Einflusses der $\Delta$ N-ERG-Überexpression auf das Migrationsverhaltens transfizierter HEK293-Zellen. . . . .	78
3.13 Matrigel-Invasionsassay. Analyse des Invasionsverhaltens mock- und $\Delta$ N-ERG-transfizierter HEK293-Zellen im Matrigel-Invasionsassay. . . . .	79
3.14 Gelatin-Zymographie-Gel. Parallele Analyse der Matrix-Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 sowie ihrer Vorstufen Pro-MMP-2 und Pro-MMP-9. . . . .	80
3.15 Western Blot zum Nachweis von TIMP-1 im Zellkultur-Überstand $\Delta$ N-ERG überexprimierender HEK293-Zellen und mock-transfizierter Kontrollzellen. . . . .	81
3.16 Western Blot zum Nachweis der endogenen Tiam1-Expression in mit $\Delta$ N-ERG transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie. . . . .	82
3.17 Western Blot zum Nachweis der endogenen Rac-Expression in $\Delta$ ERG- überexprimierenden HEK293-Zellen im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie. . . . .	83
3.18 Rac-Aktivitätsassay mit der $\Delta$ N-ERG-überexprimierenden Zelllinie und der Kontroll-Zelllinie. . . . .	84
3.19 Repräsentative Übersichtsaufnahmen von transfizierten HEK293-Zellen in Kultur	84
3.20 Western Blot zum Nachweis der $\beta$ -Catenin-Expression in $\Delta$ N-ERG- überexprimierenden HEK293-Zellen vergleichend zur Kontroll-Zelllinie. . . . .	85
3.21 Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen der $\beta$ -Catenin-Expression in transfizierten HEK293-Zellen. . . . .	86
3.22 Colony-Formation-Assay. Foto-Dokumentation des Ergebnisses anhand repräsentativer Übersichtsaufnahmen. . . . .	87
3.23 Softagar-Assay. Darstellung repräsentativer Gesichtsfelder der vergleichend untersuchten Zelllinien. . . . .	88

# Tabellenverzeichnis

1.1	TMPRSS2-ERG-Fusionsvarianten (in Anlehnung an Tu et al. Tab.2 [16]) . . . . .	7
2.1	Oligonukleotide . . . . .	14
2.2	Vektoren . . . . .	15
2.3	Plasmidkonstrukte . . . . .	15
2.4	Primärantikörper . . . . .	16
2.5	Sekundärantikörper . . . . .	16
2.6	Medium für humane BPH1-Zellen . . . . .	19
2.7	Medium für HEK293-Zellen . . . . .	19
2.8	2 x HEBS-Puffer (pH 7,05) . . . . .	20
2.9	50 x TAE-Puffer . . . . .	20
2.10	Ripa-Lysepuffer (pH 7,4) . . . . .	21
2.11	Lysepuffer für $\beta$ -Catenin-Proteinlysate . . . . .	21
2.12	Sammelgel . . . . .	22
2.13	Trenngel . . . . .	22
2.14	6 x SDS-Ladepuffer . . . . .	22
2.15	Elektrophoresepuffer . . . . .	23
2.16	Transferpuffer . . . . .	23
2.17	Waschpuffer TBS . . . . .	23
2.18	Waschpuffer TBST . . . . .	23
2.19	2 x Ladepuffer für die Zymographie . . . . .	24
2.20	8%iges Trenngel für die Zymographie . . . . .	24
2.21	Zymographie-Reaktionspuffer . . . . .	24
2.22	Zymographie-Färbelösung . . . . .	25
2.23	Zymographie-Entfärbelösung . . . . .	25
2.24	Fixierlösung $\beta$ -Gal-Färbung . . . . .	25

2.25 Färbelösung $\beta$ -Gal-Färbung . . . . .	25
2.26 Bakterienlysepuffer . . . . .	26
2.27 GST-Fish-Puffer . . . . .	26
2.28 <i>baselayer</i> (Volumen ausreichend für sechs 6-wells) . . . . .	27
2.29 <i>toplayer</i> (Volumen pro 6-well) . . . . .	27
2.30 2 x konzentriertes Medium . . . . .	27
2.31 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription [38] . . . . .	29
2.32 Initialer Reaktionsansatz für die $\Delta$ N-ERG-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase . . . . .	30
2.33 Initial verwendetes $\Delta$ N-ERG-PCR-Programm . . . . .	31
2.34 Endgültiger Reaktionsansatz für die $\Delta$ N-ERG-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase . . . . .	31
2.35 Endgültiges $\Delta$ N-ERG-PCR-Programm . . . . .	32
2.36 Reaktionsansatz für die $\Delta$ N-ERG-PCR mit der Pfu-DNA-Polymerase . . . . .	32
2.37 Reaktionsansatz für die GAPDH-PCR . . . . .	33
2.38 GAPDH-PCR-Programm . . . . .	33
2.39 Master Mix QRT-PCR . . . . .	35
2.40 QRT-PCR-Programm für $\Delta$ N-ERG . . . . .	35
2.41 QRT-PCR-Programm für GAPDH . . . . .	35
2.42 Allgemeingültiges Rezept für den Restriktionsverdau . . . . .	39
2.43 Vektor-Dephosphorylierung . . . . .	40
2.44 Ligationsansatz . . . . .	40
2.45 Master Mix für die Kolonie-PCR . . . . .	42
2.46 PCR-Programm für die Kolonie-PCR . . . . .	43
2.47 Reaktionsansatz für die <i>in vitro</i> Mutagenese nach Papworth et al. . . . .	44
2.48 PCR-Programm für die <i>in vitro</i> Mutagenese . . . . .	44
2.49 Optimierung der Transfektion von humanen BPH1-Zellen . . . . .	49
2.50 Transfektionsansatz für die Transfektion von $1 \times 10^6$ HEK293-Zellen . . . . .	51
2.51 Übersicht über die durchgeführten Western Blots . . . . .	53

# Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

21.07.2015, Kathinka Krull