Molekulargenetische Analyse des Androgenrezeptorund DICE1-Gens beim Prostatakarzinom

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

> doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biochem. Albrecht Röpke

geb. am 14.07.1972 in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. med. Peter F. Wieacker

Prof. Dr. rer. nat. Eckart D. Gundelfinger

Privatdozent Dr. med. Andreas Erbersdobler

Eingereicht am: 27.10.2004 Verteidigung am: 08.03.2005

Danksagung

Zuallererst möchte ich dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Professor Dr. med. P. Wieacker danken, nicht allein für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sondern vor allem für sein großes Interesse am Gelingen derselben und der ständigen Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Danken möchte ich außerdem Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. I. Wieland für die vielen hilfreichen fachlichen Gespräche und Ratschläge, die mir eine große Unterstützung bei den Arbeiten zur molekularen Charakterisierung des DICE1-Promotors waren.

Mein besonderer Dank gilt Frau John für die Unterstützung bei den FISH-Analysen und Frau Seger für die vielseitige Hilfe bei der Promotoranalyse des DICE1-Gens.

Herrn Oberarzt Dr. med. Buhtz und Herrn Privatdozent Dr. med. Erbersdobler danke ich für die Bereitstellung der Paraffinschnitte bzw. Kryoschnitte der Prostatakarzinome, Herrn Privatdozent Dr. med. Böhm für die Hilfe bei den Mikrodissektaten.

Da in dieser Arbeit sowohl molekularbiologische als auch zytogenetische Arbeitstechniken angewandt wurden, war ich auf alle Labore unseres Instituts angewiesen und möchte an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik danken für die Hilfsbereitschaft und Abnahme von verschiedenen Aufgaben.

Finanziert wurde die vorliegende Arbeit von der Dr.-Mildred-Scheel-Stiftung.

Eine große Stütze während der gesamten Zeit an meiner Arbeit zu diesem Thema waren mir meine Frau und meine beiden Kinder, denen ich sehr herzlich danken möchte. Ich danke meiner Frau für die vielen Diskussionen beim Schreiben und Korrekturlesen dieser Arbeit. Meinen Kindern danke ich auch dafür, dass sie mir zu verstehen gaben, dass es neben der Arbeit noch eine andere wichtige Aufgabe im Leben gibt. In diesen Dank möchte ich auch unsere Eltern für ihre große Unterstützung mit einschließen.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Prostatakarzinom	1
1.1.1	Die menschliche Prostata	1
1.1.2	Das Prostatakarzinom	3
1.2	Der Androgenrezeptor (AR)	7
1.3	Das DICE1-Gen	10
1.4	Ziel der Arbeit	13
2.	MATERIAL	14
2.1	Chemikalien	14
2.1.1	Allgemeine Chemikalien	14
2.1.2	Biochemikalien und Kits	15
2.1.3	Zellkultur	16
2.1.4	Längenstandards	16
2.2	Verbrauchswaren	17
2.3	Geräte	17
2.4	Allgemeine Puffer und Stammlösungen	18
2.5	Medien für Zellkultur	19
2.6	Herkunft des verwendeten Untersuchungsmaterials	19
2.6.1	Prostatakarzinome zur FISH-Analyse des Androgenrezeptor-Gens	19
2.6.2	Prostatakarzinome für die Untersuchung des DICE1-Promotors	20
2.7	Primersequenzen	21
3.	METHODEN	22
3.1	Interphase-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Interphase-FISH)	22
3.1.1	Isolierung von Interphasenkernen aus paraffiniertem Gewebe	23
3.1.2	Interphase-Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (Interphase-FISH)	24
3.1.2.1	Denaturierung der fixierten Zellkerne auf dem Objektträger	24
3.1.2.2	Sondenvorbereitung	24
3.1.2.3	Hybridisierung	25
3.1.2.4	Waschung der Präparate nach der Hybridisierung und Gegenfärbung	25
3.1.2.5	Fluoreszenzmikroskopie und Dokumentation	26

3.2	lekularbiologische Methoden zur Promotorcharakterisierung des		
	DICE1-Gens	27	
3.2.1	Gewinnung menschlicher Genom-DNA aus Blut: DNA-Präparation mit		
	Proteinaussalzung nach Baas und Miller	27	
3.2.2	Kultivierung von Zelllinien	28	
3.2.3	DNA-Isolierung aus Zelllinien	29	
3.2.4	Gewinnung genomischer DNA aus Paraffinschnitten	30	
3.2.5	RNA-Isolierung aus Zelllinien	30	
3.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	31	
3.2.7	cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase (RT-Reaktion)	31	
3.2.8	DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32	
3.2.8.1	Ansatz der PCR	33	
3.2.8.2	PCR-Bedingungen	33	
3.2.9	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese	34	
3.2.10	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	34	
3.2.11	Isolierung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen	35	
3.2.12	Realtime-PCR	36	
3.2.12.1	Ansatz der Realtime-PCR	37	
3.2.12.2	Bedingungen der Realtime-PCR	37	
3.2.12.3	Bestimmung der relativen DICE1-Genexpression	37	
3.2.13	Sequenzierung	38	
3.2.13.1	Sequenzierung von PCR-Produkten	38	
3.2.13.2	Sequenzierung von Plasmid-DNA	40	
3.2.13.3	Elektrophorese und Auswertung	40	
3.2.14	Ligation von PCR-Produkten in einen Vektor	41	
3.2.14.1	Ligation in den pGEM-T Easy Vektor	41	
3.2.14.2	Ligation in den pBlue-TOPO-Vektor	41	
3.2.15	Transformation in XL1-Blue-Zellen nach Hanahan (1986)	42	
3.2.16	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	43	
3.2.16.1	Mini-Plasmid-Isolierung (nach Ausubel et al., 1992)	43	
3.2.16.2	Midi Plasmid Präparation	44	
3.2.17	Transfektion von COS-7 Zellen	44	
3.2.18	ß-Galaktosidase-Nachweis	45	
3.2.18.1	Proteinbestimmung nach Bradfort	46	
3.2.19	Bandshift-Assay	47	
3.2.19.1	Radioaktive PCR	47	
3.2.19.2	Herstellung der DNA-Protein-Hybridmoleküle	48	

3.2.19.3	Nachweis der radioaktiv-markierten Hybridmoleküle	48
3.2.20	Restriktionsspaltung	49
3.2.21	Southern-Blot	49
3.2.22	Dig-Chemilumineszenz-Nachweis	50
3.2.23	Gewinnung von Gewebeproben durch Mikrodissektion	51
3.2.24	LOH-Analyse	51
3.2.25	Bestimmung des Methylierungsmusters mittels Bisulfitmodifizierung	52
3.2.26	Kultivierung von Zelllinien in Anwesenheit von 5-Azacytidin	53
4.	ERGEBNISSE	54
4.1	FISH-Analyse des Androgenrezeptor-Gens bei Patienten mit	
	Prostatakarzinom	54
4.1.1	Interphase-FISH mit Sonden für das AR-Gen und einer	
	zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom (Zweifarben-FISH)	54
4.1.1.1	Evaluierung der FISH-Sonden an Nichttumorgewebe von	
	Prostatakarzinom-Patienten	54
4.1.1.2	Interphase-FISH an Prostatakarzinom-Gewebeproben	55
4.1.2	Interphase-FISH mit zentromerspezifischen Sonden für die	
	Chromosomen X, Y und 18 (Dreifarben-FISH)	58
4.1.2.1	FISH-Analyse an Nichttumor-Zellkernen mit dem Dreifarben-Sondenmix	59
4.1.2.2	FISH-Analyse der Prostatakarzinome mit dem Dreifarben-Sondenmix	60
4.2	Molekulare Charakterisierung des DICE1-Gens	64
4.2.1	Sequenz-Analyse der DNA-Sequenz im 5'-Bereich des DICE1-Gens	64
4.2.2	Analyse der CpG-Inseln in der DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen	67
4.2.3	Verteilung der 13-bp-Deletion im DICE1-Promotor in der	
	Normalbevölkerung	68
4.2.4	Funktionelle Charakterisierung des DICE1-Promotors	69
4.2.4.1	Herstellung der β-Galaktosidase-Konstrukte für die Promotoranalyse	69
4.2.4.2	β-Galaktosidase-Nachweis zur funktionellen Überprüfung der fraglichen	
	Promotorregion	71
4.2.4.3	Einfluss der Methylierung des DICE1-Promotors auf die	
	Promotor-Aktivität	73
4.2.4.4	Einfluss der 13-bp-Deletion auf die DICE1-Promotoraktivität	74
4.2.4.5	Methylierungsstatus ausgewählter CpG-Dinukleotide des	
	DICE1-Promotors	75
4.2.4.6	Bandshift-Assay zum Nachweis von Bindestellen für	
	Transkriptionsfaktoren	78

4.2.5	Molekulare Charakterisierung der Promotoraktivität des DICE1-Gens	
	in Prostatakarzinom-Zellen	80
4.2.5.1	DICE1-Expressionsanalysen bei Prostatakarzinom-Zelllinien	
4.2.5.2	Analyse des Methylierungsstatus der Prostatakarzinom-Zelllinien	
	LNCaP und DU-145 im Vergleich zu normalem Prostatagewebe	83
4.2.5.3	DICE1-Expressionsanalyse nach Einwirkung von 5-Azacytidin bei der	
	Kultivierung von Prostatakarzinom-Zelllinien	87
4.2.6	DICE1-Promotormethylierung bei primären Prostatakarzinomen	89
4.2.6.1	LOH-Analyse bei Prostatakarzinomen mit dem Mikrosatellitenmarker	
	D13S284	89
4.2.6.2	Methylierungsstatus bei Prostatakarzinomen	92
5.	DISKUSSION	94
5.1	Bedeutung des Androgenrezeptor-Gens beim Prostatakarzinom	95
5.1.1	Interphase-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an isolierten	
	Zellkernen	95
5.1.2	Ermittlung des Cut-off-Wertes	96
5.1.3	Bestimmung der Anzahl der AR-Genkopien bei Prostatakarzinomen	97
5.1.4	Dreifarben-FISH mit zentromerspezifischen Sonden für die	
	Chromosomen X, Y und 18	100
5.1.5	Statistische Auswertung der FISH-Ergebnisse	102
5.1.6	Auswirkung der Polysomie des X-Chromosoms	102
5.2	Das DICE1-Gen	103
5.2.1	Identifizierung des DICE1-Promotors	104
5.2.2	Identifizierung eines 13-bp-Deletionspolymorphismus im	
	DICE1-Promotor	106
5.2.3	Funktionelle Charakterisierung des DICE1-Promotors	106
5.2.3.1	Nachweis der Promotoraktivität mit dem β-Galaktosidase Reporter	
	Assay	107
5.2.3.2	Nachweis von Transkriptionsfaktor-Bindestellen im DICE1-Promotor	108
5.2.3.3	Promotormethylierung bei Verlust der DICE1-Expression	110
5.2.4	Nachweis der Tumorsuppressoraktivität des DICE1-Gens in	
	Prostatakarzinom-Zelllinien	111
5.2.4.1	Nachweis von CpG-Methylierungen im DICE1-Promotor in	
	Prostatakarzinom-Zelllinien	111
5.2.4.2	Re-Expression von DICE1 unter Einwirkung von 5-Azacytidin	114

5.2.5	LOH-Analysen am Mikrosatellitenmarker D13S284 bei primären	D13S284 bei primären	
	Prostatakarzinomen	115	
5.2.6	Methylierung des DICE1-Promotors bei primären Prostatakarzinomen	115	
6.	ZUSAMMENFASSUNG	119	
7.	LITERATURVERZEICHNIS	120	
8.	ABKÜRZUNGEN	138	
9.	ANHANG	140	

1. Einleitung

Das Prostatakarzinom ist in vielen Industrieländern der westlichen Welt derzeit das häufigste Krebsleiden beim Mann und stellt die zweithäufigste Todesursache durch eine Krebserkrankung dar.

Der klinische Verlauf des Prostatakarzinoms ist vor allem von zwei kritischen Progressionsstufen abhängig: einerseits von der möglichen Entstehung von Metastasen und andererseits von einer möglichen Resistenz gegenüber einer Hormontherapie. Bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen sprechen ungefähr 25 % der Patienten primär nicht auf eine Antiandrogentherapie an. Außerdem zeigen viele Patienten nach einigen Monaten bis wenigen Jahren der zunächst erfolgreichen Hormonbehandlung eine erneute Progression und Metastasierung des Prostatakarzinoms (Suzuki et al., 2003).

Aus diesem Gesichtspunkt ergeben sich die Forschungsanstrengungen der letzten Jahre zur Optimierung der Therapie des Prostatakarzinoms. Der molekulargenetische Hintergrund der Progression und der Entwicklung eines hormonrefraktären Prostatakarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt. Durch den Einsatz von CGH- (comparative genomic hybridization) und LOH- (loss of heterozygosity)-Analysen konnten wesentliche Erkenntnisse über weitere genomische Veränderungen des Prostatakarzinoms gefunden werden (Bova und Isaacs, 1996; Visakorpi et al., 1995; Alers et al., 2001). Es zeigte sich, dass für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber einer Hormontherapie oft die Amplifikation des Androgenrezeptors (AR) verantwortlich ist (Visakorpi et al., 1995). Aber auch somatische Mutationen im AR-Gen kommen für eine Resistenzentwicklung des Prostatakarzinoms in Frage (Tilley et al., 1995). Ferner verwiesen LOH-Analysen auf die Bedeutung des Tumorsuppressorgens DICE1 (Wieland et al., 1999). Der Mikrosatellitenmarker D13S284, der mit dem DICE1-Gen kolokalisiert, zeigt die höchste LOH-Rate bei Prostatakarzinomen unter den untersuchten Mikrosatellitenmarkern des Chromosoms 13 (Yin et al., 1999).

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Die menschliche Prostata

Die normale Prostata ist bei ausgewachsenen jungen Männern ein etwa kastaniengroßes, derbes Organ. Sie umschließt mit ihrer Längsachse von 2,5 cm die hintere Harnröhre

zwischen Blasenhals und Diaphragma urogenitale (Hautmann und Huland, 1997). Aufgebaut ist die Prostata aus 30 – 50 verzweigten tubuloalveolären Drüsen, die in einem Stroma aus Fibrozyten und glatten Muskelzellen eingebettet sind (Helpap, 1993). Diese Drüsengänge münden in den Furchen lateral des Colliculus seminalis. Makroskopisch wird die gesamte Prostata von einer kapsel- oder bandartigen Muskel- und Bindegewebsschicht umgeben (McNeal, 1980). Anatomisch wird die Prostata in vier Zonen unterteilt (nach Helpap, 1993; McNeal 1988; Aumüller 1989):

- 1. die dorsokranial gelegene Zentralzone mit weitlumigen Drüsen und aufgelockertem Stroma
- 2. die *Transitionszone* oder präprostatisches Segment, mediolateral der Urethra gelegen, mit englumigen Drüsen und straffem Stroma
- 3. die periphere Zone umgibt die Zentralzone, mit lockerem Stroma und Drüsen
- 4. die aglanduläre Stromazone ohne Drüsen

Die Drüsen, die in den ersten drei Zonen gefunden werden, sind von einem mehrschichtigen Zylinderepithel sowie überwiegend in geschlossener Formation liegenden Basalzellen ausgekleidet. Aus dem sekretorischen inneren Zylinderepithel wird ein dünnflüssiges, milchiges Prostatasekret abgegeben. Das Sekret hat einen pH-Wert von 6,4 – 6,8 und beinhaltet proteolytische Enzyme. Zudem enthält das Prostatasekret Phospholipide, Spermine, Zink und saure Phosphatasen. Diese Drüsenflüssigkeit dient als Transport- und Aktivierungsmittel des Spermas. Weiterhin wird von der Prostata das Prostata-spezifische Antigen (PSA) und die Prostata-spezifische saure Phosphatase (PAP) abgesondert. Die PSA-Konzentration schwankt in der Prostata sehr stark. PSA ist ein spezifisches Sekret, das nur in der Prostata gebildet wird, und dient der Verflüssigung des Spermas (Hautmann und Huland, 1997). Die PSA-Expression wird genetisch gesteuert und von Androgenen stimuliert (Hilz, 1995).

Die spezifische Entwicklung der Prostata verläuft unter Androgeneinfluss, welcher für die Verzweigungen als auch für die Differenzierung des Drüsenepithels wichtig ist (Bonkhoff und Remberger, 1996). Die Androgensynthese erfolgt zu ca. 90 % in den Hoden und zu 10 % in der Nebennierenrinde. Am wichtigsten sind dabei die Androgene Testosteron aus dem Hoden und Dehydroepiandrosteron aus der Nebennierenrinde, das zu Testosteron umgewandelt werden kann. Der intrazellulären Wirkung von Testosteron geht dessen Umwandlung zu Dihydrotestosteron (DHT) voraus. DHT bindet an den Androgenrezeptor (AR). Der AR ist als intrazellulärer Rezeptor in den Zellen des Drüsenepithels immunhistochemisch nachweisbar. Er vermittelt die Wirkung der Androgene durch direkte Anbindung an hormonresponsive Elemente in der DNA-Sequenz (Evans, 1988; Beato, 1989). Dagegen zeigt die Basalzellschicht nur eine schwache Expression des AR (Ruizeveld de Winter et al., 1990). Die neuroendokrinen Zellen exprimieren den Androgenrezeptor nicht

(Bonkhoff und Remberger, 1993). Östrogen- und Progesteronrezeptoren sind in den sekretorischen Drüsenzellen nicht nachweisbar, dafür findet man aber beide Rezeptoren in den Basalzellen (Ruizeveld de Winter et al., 1990). Ein normales Wachstum der Prostata ist nur durch eine ausgeglichene Hormonbalance zwischen den zirkulierenden Androgenen, Östrogenen und nichtsteroidalen Wachstumsfaktoren möglich (Aso et al., 1995).

Das Prostataepithel entwickelt sich aus einer Stammzellpopulation, die sich permanent unter dem Einfluss von Wachstumshormonen teilt und aus der sich die Basalzellen bilden. Die Basalzell-Proliferation ist nicht androgenabhängig. Jedoch entwickelt sich ein Teil der Basalzellen zu androgen-responsiven Zielzellen. Aus dieser Gruppe von androgenresponsiven Zellen erfolgt unter dem Einfluss von Androgenen die Differenzierung zu den sekretorischen Zellen. Das proliferative Zellkompartiment ist androgenunabhängig und liegt in der Basalzellschicht. Die sekretorischen Zellen bilden das Differenzierungskompartiment. Sie besitzen in der normalen Prostata eine geringe Proliferationsaktivität (Bonkhoff und Remberger, 1996).

Das Stromagewebe der Prostata besteht aus glatter Muskulatur und Bindegewebe mit kollagenen, retikulären und elastischen Fasern. Immunhistochemisch ist der Östrogenrezeptor in den Kernen des fibromatösen Stromas nachweisbar, der AR dagegen nur sehr schwach (Sar et al., 1990).

1.1.2 Das Prostatakarzinom

In den letzten Jahren stieg die Inzidenz des Prostatakarzinoms kontinuierlich an (Landis et al., 1998; Hsing et al., 2000). Nach Schätzung des Robert-Koch-Instituts erkranken in Deutschland jährlich etwa 32000 Männer neu an einem Prostatakarzinom (Robert-Koch-Institut, 2002). Weltweit werden starke Schwankungen in der Prostatakarzinomhäufigkeit beobachtet. Die höchste Wahrscheinlichkeit, an Prostatakarzinom zu erkranken, besteht bei der afrikanisch-stämmigen Bevölkerung der Vereinigten Staaten (Sakr et al., 1998). Die asiatischen Völker dagegen weisen eine sehr niedrige Inzidenzrate auf (Pienta und Espers, 1993). Auffällig ist in diesem Zusammenhang auch, dass bei Männern der afrikanischstämmigen Bevölkerung der USA mit Prostatakarzinom zur Diagnosestellung ein durchschnittlich klinisch jüngeres Alter und meistens ein fortgeschritteneres Prostatakarzinom festgestellt wird (Mebane et al., 1990). Insbesondere die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) hat zu einem Anstieg der diagnostizierten Prostatakarzinome geführt. Durch die Einführung der PSA-Messung konnte in höherem Maße ein organbegrenztes Prostatakarzinom im kurablen Stadium frühzeitig erkannt werden. Die Sterblichkeit des Prostatakarzinoms liegt in der Statistik hinter der des Bronchialkarzinoms.

Aus epidemiologischer Sicht kann man zwischen sporadisch und familiär auftretenden Prostatakarzinomen unterscheiden. In der Mehrzahl der Fälle geht man von einer polygenmultifaktoriellen Genese aus. Epidemiologische Studien zeigen, dass das Risiko eines Prostatakarzinoms bis zu dreimal höher ist, wenn ein Verwandter ersten Grades am Prostatakarzinom erkrankt ist. Dabei ist für die Brüder das Prostatakarzinom-Risiko höher als für die Söhne des Erkrankten (Whittemore et al., 1995). Deutliche Hinweise auf erbliche Prostatakarzinome sind das Vorkommen von drei oder mehr betroffenen Familienmitgliedern ersten Grades. das Vorkommen in drei Generationen oder zwei betroffene Familienmitglieder vor dem 55. Lebensjahr. Erbliche Prostatakarzinome, die in mehreren Generationen auftreten, kommen bei ca. 9 % aller Prostatakarzinome vor (Carter et al., 1992; Carter et al., 1993). Mutationen bei erblichen Prostatakarzinomen wurden unter anderem in den Genen RNASEL (Chromosom 1q25) (Carpten et al., 2002), MXI1 (10q25) (Eagle et al., 1995), ELAC2 (17p11) (Tavtigian et al., 2001) und dem AR-Gen (Xq12) (Mononen et al., 2000) gefunden. In der Mehrzahl der Fälle wird bei einem vererbten Prostatakarzinom von einer autosomal-dominanten Vererbung ausgegangen (Gronberg et al., 1997; Schaid et al., 1998). Nwosu et al. (2001) fanden auch in einigen Familien Hinweise auf eine autosomal-rezessive oder X-gekoppelte Vererbung.

Die radikale Prostatektomie ist heute die am häufigsten durchgeführte Therapie des Prostatakarzinoms. Allerdings ist die radikale Entfernung der Prostata bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen oft nicht möglich. Hier bieten Hormontherapie, Orchiektomie, Strahlensowie Chemotherapie oder eine Kombination dieser Methoden eine Möglichkeit der palliativen Behandlung (Huggins und Hodges, 1941; Harisiadis et al., 1978; Labrie et al., 1982; Arcangeli et al., 1998). Die Inhibierung der Androgen-Produktion bzw. die Blockade des AR spielen dabei eine zentrale Rolle, da primäre Prostatakarzinome in ihrem Wachstum androgenabhängig sind. Durch die Antiandrogentherapie kommt es zur Apoptose der androgenentzugstherapie erfolgt mit Agonisten des Luteinisierungshormon-Releasing-Hormons (LHRH), die Blockierung der Funktion des AR entweder durch steroidale (Crypteronacetat) oder nichtsteroidale (Hydroxyflutamid oder Bicalutamid) Verbindungen. Andere Therapieformen gehen von einer Hemmung der 5α-Reduktase, die das Testosteron in Dihydrotestosteron (DHT) umwandelt, mit Finasterid aus.

Nachsorge-Untersuchungen zeigen jedoch bei vielen Patienten (etwa 80%) nach einigen Monaten bis Jahren der zunächst erfolgreichen Antiandrogentherapie einen erneuten Anstieg der PSA-Konzentration im Serum (Petrylak, 1999). Bei diesen Patienten kam es im Laufe der Antiandrogentherapie zu einer erneuten Progression oder Metastasierung der Erkrankung. Etwa 25% der Patienten zeigen bereits primär kein Ansprechen auf die Antiandrogentherapie (Konety und Getzenberg, 1997). Bei diesen hormonrefraktären Prostatakarzinomen kann eine zytostatische Chemotherapie angewandt werden. Die Effektivität dieser Behandlungsform ist jedoch gering und weist eine maximale Ansprechrate von 30% auf (Wirth, 1990).

Fünf unterschiedliche Pathomechanismen, die zu einem androgenunabhängigen Prostatakarzinom führen können, kommen in Frage (Feldman und Feldman, 2001):

a) Der hypersensitive Mechanismus beruht auf einer Amplifikation des AR-Genlokus (Visakorpi et al., 1995) oder auf einer verstärkten Umwandlung von Testosteron in das aktivere Dihydrotestosteron (Makridakis et al., 1997).

b) Auf Grund von Mutationen des AR-Gens kann der AR auch durch andere Steroidhormone oder Nicht-Steroide wie Hydroxyflutamid aktiviert werden (Buchanan et al., 2001). Ebenfalls können auch veränderte Co-Faktoren des AR zu einem Prostatawachstum, auch bei niedrigen Androgenkonzentrationen, führen (Gregory et al., 2001).

c) Eine dritte Möglichkeit des androgenunabhängigen Wachstums von Prostatakarzinomen ergibt sich aus der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die wiederum über den Proteinkinase B- oder den MAP-Kinase-Signalweg zur Phosphorylierung des AR führen. Der AR wird somit bei diesem Mechanismus unabhängig von einem Liganden aktiviert (Culig et al., 1994; Graff et al., 2000).

d) Ein vierter Mechanismus könnte darin bestehen, dass androgenunabhängige Signalwege aktiviert werden. Das Protein BCL2 (B-cell lymphoma 2), welches die Apoptose blockiert, ist ein Kandidat für diesen Mechanismus. BCL2 wird in androgenunabhängigen Prostatakarzinomen häufig exprimiert, dagegen in den normalen sekretorischen Zellen der Prostata nicht (McDonald et al., 1992).

e) Schließlich postulierte Isaacs (1999) eine mögliche fünfte Theorie, bei der eine Subpopulation androgenunabhängiger Zellen bereits vor der Therapie vorhanden sein soll. Das Prostataepithel entwickelt sich aus einer Stammzellpopulation, die sich permanent unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, unabhängig von Androgenen teilt und aus der sich die Basalzellen bilden (Bonkhoff und Remberger, 1996). Durch eine Antiandrogentherapie würden also alle androgenabhängigen Zellen entfernt, nur die Stammzellen bleiben übrig und würden weiter proliferieren.

Chromosomenaberrationen wurden in einer Vielzahl von Publikationen bei primären Prostatakarzinomen beschrieben (Brothman et al., 1994; Brown et al., 1994; Henke et al., 1994; Erbersdobler et al., 1997; Sauter et al., 1998; Miyoshi et al., 2000; Edwards et al., 2001). Mittels konventioneller Chromosomenanalysen wurden am häufigsten bei den Chromosomen 1, 7, 8, 10, 16 und Y Aberrationen festgestellt. Eine Aneusomie des X-

6

Chromosoms wurde dagegen bei konventionellen Chromosomenanalysen selten gefunden (Lundgren et al., 1992; Breitkreuz et al., 1993; Micale et al., 1993; Zitzelsberger et al., 1996). Die molekulargenetischen Analysen des Prostatakarzinoms erbrachten weitere Erkenntnisse über genetische Veränderungen, die mit der Progression des Prostatakarzinoms einhergehen (Bova und Isaacs, 1996; Dong et al., 1997). Dabei wurden vor allem LOH-Analysen und CGH-Analysen zur Untersuchung des Prostatakarzinoms eingesetzt. Wie bei den meisten soliden Tumoren geht auch die Progression des Prostatakarzinoms mit einem Verlust genetischen Materials einher. Selten zu beobachten sind dagegen Loci mit einer Amplifikation (Koivisto et al., 1995; Visakorpi et al., 1995b; Cher et al., 1996; Bubendorf et al., 1999; Kaltz-Wittmer et al., 2000; Alers et al., 2001; El Gedaily et al., 2001). Alers et al. (2001) untersuchten unterschiedlich große Prostatakarzinome. Bei Karzinomen mit einem kleinen Tumorvolumen konnten Verluste im langen Arm des Chromosoms 6 und im langen Arm des Chromosoms 13 festgestellt werden. Weiterhin wurde bei dieser Gruppe ein Verlust des Y-Chromosoms nachgewiesen. Prostatakarzinome mit großen Volumina zeigten zusätzlich einen Verlust im kurzen Arm des Chromosoms 8 und im langen Arm der Chromosomen 5, 16 und 18. Zugewinne wurden nur bei fortgeschrittenen Karzinomen festgestellt. Zusätzliches Material wurde in den langen Armen der Chromosomen 3, 7, 8, 9 und X sowie dem langen Arm des Chromosoms 7 gefunden. El Gedaily et al. (2001) fanden zusätzliche Amplifikationen in den Chromosomen 1, 10 und 17. Zusätzliche X-Chromosomen wurden in 2 von 16 lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen analysiert (Alers et al., 2001). Insgesamt zeigen die CGH-Ergebnisse, dass die Amplifikation von bestimmten Loci ein spätes Ereignis in der Progression des Prostatakarzinoms ist (Visakorpi et al., 1995b, Alers et al., 2001).

Da LOH-Analysen eine feinere Auflösung als die CGH zeigen, konnten die CGH-Ergebnisse weiter eingegrenzt werden (Visakorpi et al., 1995b; Joos et al., 1995; Cher et al., 1996). So konnten durch LOH-Analysen einige progressionsspezifische Verluste spezifischer Chromosomenregionen bereits bekannten Tumorsuppressorgenen zugeordnet werden. Zum Beispiel konnten die Verluste im Chromosom 17p mit dem p53-Gen in Verbindung gebracht werden. LOH und Mutationen im p53-Gen wurden bei einer Vielzahl von metastasierten Prostatakarzinomen gefunden (Bookstein et al., 1993; Aprikian et al., 1994). Ebenfalls konnten die Verluste der Chromosomen-Region 13q14 mittels LOH dem Retinoblastom-prädisponierenden Gen 1 (RB1-Gen) zugeordnet werden (Bookstein et al., 1990; Brooks et al., 1995). Jedoch wurde in einigen Fällen mit LOH in 13q14 keine verminderte Expression des RB1-Gens gefunden (Simpson et al., 1999). Dies weist auf ein mögliches zweites Tumorsuppressorgen neben dem RB1-Gen in 13q14 hin (Cooney et al., 1996; Li et al., 1998; Alfonso et al., 1999; Ueda et al., 1999; Yin et al., 1999; Chen et al., 2001). In dieser Region ist das DICE1-Gen lokalisiert, das alle Charakteristika eines Tumorsuppressorgens erfüllt

(Wieland et al., 1999; Li et al., 2003; s. Kapitel 1.3). Für das Prostatakarzinom wurde auch das CHC1-L-Gen (Chromosome condensation 1-like) als weiteres Kandidatengen für ein Tumorsuppressorgen in der Chromosomenbande 13q14.2 isoliert (Latil et al., 2002).

1.2 Der Androgenrezeptor (AR)

In den letzten Jahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen der AR für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber einer Hormontherapie bei Prostatakarzinom beschrieben. Dabei wurden Mutationen im AR-Gen, die Amplifikation des AR-Gens und die Methylierung von CpG-Dinukleotiden im AR-Promotor als ein möglicher Grund der Hormonresistenz beschrieben (Newmark et al., 1992; Culig et al., 1993; Visakorpi et al., 1995a; Nakayama et al., 2000).

Seit der Klonierung des AR wurde mit einer Vielzahl von Studien versucht, die Rolle des AR bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms zu erklären. Wie bereits beschrieben, stellt der AR als intrazellulärer Rezeptor die Verbindung zu den Androgenen her, die für die Entwicklung, Differenzierung und das Wachstum der Prostata verantwortlich sind. Über den AR können die Androgene ihre regulierende Wirkung ausführen (Lubahn et al., 1988, Trapman et al., 1988).

Der AR ist ein Mitglied der intrazellulären Liganden-Bindungsproteine. Er gehört zu den nukleären Transkriptionsfaktoren und beeinflusst die Transkription über eine direkte Interaktion mit der DNA (Culig et al., 1998). Zu dieser Familie von Steroid-Rezeptoren gehören unter anderem die Östrogen-, Glucocorticoid-, Mineralocorticoid- und die Progesteron-Rezeptoren (Tsai und O'Malley, 1994). Der AR wird in fast allen Geweben exprimiert (Taplin et al., 1995). In der Prostata wird der AR in den sekretorischen Zellen nachgewiesen, während die Basalzellen ihn nur schwach exprimieren. Im Stromagewebe ist der AR immunhistochemisch nicht oder nur sehr schwach nachweisbar (Helpap, 1989; Sar et al., 1990).

Das AR-Gen ist auf dem X-Chomosom lokalisiert und erstreckt sich über mehr als 90 kb in der chomosomalen Region Xq12 (Wieacker et al., 1987). Es besteht aus 8 Exons und exprimiert in der menschlichen Prostata zwei verschieden große mRNAs von 7 kb und 10 kb (Lubahn et al., 1988). Das AR-Protein besteht aus durchschnittlich 917 Aminosäuren mit einer kalkulierten molekularen Masse von 98,845 kD (Brinkman et al., 1989).

Das AR-Protein besteht aus vier funktionellen Domänen (Cude et al., 1999):

- 1. die Amino-terminale Transaktivierungsdomäne,
- 2. die DNA-Bindungsdomäne,
- 3. die hinge Region,
- 4. die Carboxy-terminale Liganden-Bindungsdomäne (Androgen-Bindungsdomäne).

Die DNA-Bindungsdomäne und die Liganden-Bindungsdomäne sind beide evolutionär hoch konserviert. Die Transaktivierungsdomäne wird vom Exon 1 kodiert. Sie hat modulierende Funktionen. Die DNA-Bindungsdomäne wird von den Exons 2 und 3 kodiert, die *hinge* Region von der 5'-gelegenen DNA-Sequenz des Exons 4 und die Liganden-Bindungsdomäne wird von der Sequenz vom 3'-Ende des Exons 4 bis zum Exon 8 kodiert (Quigley et al., 1995).

Das freie Testosteron diffundiert passiv durch die Zellmembran der Prostatazellen. Im Zytoplasma wird das Testosteron durch die 5α-Reduktase in das Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt, das die eigentlich wirksame Substanz darstellt. Nach Bindung des DHT an den AR bildet der AR Homodimere aus (Veldscholte et al., 1990; Zhou et al., 1994; Beato et al., 1996). Die DNA-Bindungsdomäne des AR besitzt zwei Zinkfinger-Regionen, die eine Bindung an palindrome DNA-Sequenzen, die sogenannten androgen-responsiven Elemente (ARE), ermöglichen. Durch den DNA-Protein-Komplex aus ARE und AR wird zusammen mit weiteren Proteinen ein Transkriptionskomplex aufgebaut, der die Transkription des regulierten Zielgens ermöglicht (Beato et al., 1996; Ueda et al., 2002; Suzuki et al., 2003).

Innerhalb der Amino-terminalen Transaktivierungsdomäne sind zwei, in ihrer Länge polymorphe Trinukleotid-Wiederholungen lokalisiert. Der im 5'-Bereich der Transaktivierungsdomäne gelegene CAG-Polymorphismus und im 3'-Bereich gelegene GGN-Polymorphismus (N = T, G oder C) kodieren eine Polyglutamin- bzw. eine Polyglyzin-Wiederholung und führen so zu einer variablen Länge des AR-Proteins (Chong und Wilson, 1998).

Die 5'-gelegene CAG-Wiederholung ist polymorph und für die Aktivität des AR von besonderer Bedeutung. Bei Männern werden CAG-Längen von 11 bis 31 CAG-Einheiten gefunden (Fischbeck et al., 1986). Zwischen den verschiedenen Bevölkerungsgruppen gibt es jedoch Unterschiede in der Verteilung der CAG-Länge (Irvine et al., 1996; Caskey et al., 1997). Bei den afrikanisch-stämmigen Amerikanern werden CAG-Längen von durchschnittlich 18 CAG-Wiederholungen und bei den weißen Amerikanern von durchschnittlich 21 CAG-Wiederholungen gefunden (Edwards et al., 1992).

Durch mehrere Arbeitsgruppen konnte dargestellt werden, dass zusätzliche CAG-Wiederholungen eine verminderte Aktivität des AR-Proteins verursachen, während Verkürzungen zu verstärkten Protein-Aktivitäten führen (Chamberlain et al., 1994; Knoke et al., 1999; Beilin et al., 2000; Ding et al., 2004). Die Expansion der 5'-gelegenen CAG-Wiederholung (40 bis 55 Wiederholungen) ist die Ursache der spinobulbären Muskelatrophie (SBMA oder Kennedy-Krankheit) einer neurodegenerativen Erkrankung, die u.a. durch Muskelschwund, Faszikulationen, Dysphagie, Dysarthrie, Gynäkomastie und Infertilität gekennzeichnet ist (Doyu et al., 1992).

Es gibt unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Korrelation zwischen CAG-Länge und dem Risiko, ein Prostatakarzinom zu entwickeln. Ein Teil der Studien konnte zeigen, dass Männer mit wenigen CAG-Wiederholungen (<19 CAG-Repeats) häufiger an Prostatakarzinomen erkranken als Männer mit einer CAG-Länge von mehr als 25 CAG-Repeats (Ingles et al., 1997; Hakimi et al., 1997; Giovannucci et al., 1999). Andere Studien konnten keine Korrelation zwischen CAG-Länge und Prostatakarzinom feststellen (Bratt et al., 1999; Irvine et al., 1995; Edwards et al., 1999; Latil et al., 2001).

Der GGN-Polymorphismus im 3'-Bereich der Transaktivierungsdomäne weist Allele von 10 bis 30 GGN-Wiederholungen auf (Platz et al., 1998). Allerdings ist diese Wiederholungssequenz nicht so polymorph wie die CAG-Wiederholung (Edwards et al., 1999). Wie bei den CAG-Wiederholungen gibt es auch bei den GGN-Wiederholungen unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation zwischen GGN-Länge und dem Risiko zur Entwicklung eines Prostatakarzinoms, dem Alter bei Diagnosestellung oder der Mortalität (Irvine et al., 1995; Hakimi et al., 1997; Stanford et al., 1997; Correa-Cerro et al., 1999; Edwards et al., 1999).

Mutationen im AR-Gen wurden bei Patienten mit Prostatakarzinom gefunden, verursachen aber auch andere Krankheiten. So zeigen Patienten mit einem kompletten oder partiellen Androgeninsensitivitätssyndrom (AIS) ebenfalls Mutationen im AR-Gen. Jedoch unterscheiden sich die Mutationen im AR-Gen bei Prostatakarzinom generell von denen bei Patienten mit AIS (Gottlieb et al., 1998). Mehr als 60 unterschiedliche Mutationen wurden bis AR-Gen Patienten heute im bei mit Prostatakarzinom gefunden (siehe www.mcgill.ca/androgendb). Allerdings gibt es in der Literatur starke Unterschiede in der Anzahl von Patienten mit Prostatakarzinom, die eine Mutation im AR-Gen aufweisen (Newmark et al., 1992; Culig et al., 1993; Tilly et al., 1996; Peterziel et al., 1997; Marcelli et al., 2000). Insgesamt zeigen jedoch nur wenige Patienten mit Prostatakarzinom eine Mutation im AR-Gen (Montgomery et al., 2001). Frühe Prostatakarzinome zeigen seltener eine Mutationen im AR-Gen als fortgeschrittene Karzinome (Culig et al., 1993; Elo et al., 1995; Evans et al., 1996; Marcelli et al., 2000).

Im Gegensatz zu der Wildtypform, zeigen die mutierten AR-Gene oft eine veränderte Spezifität in der Bindung von unterschiedlichen Hormonen. Die Analyse einiger mutierter AR zeigte, dass tumorspezifische Mutationen die Steroidbindungseigenschaften und somit die Antwort auf Anti-Androgene, Östrogene und Gestagene beeinflussen können (Veldscholte et al., 1990; Culig et al., 1993; Peterziel et al., 1995; Taplin et al., 1995; Shi et al., 2002).

Interessanterweise wurden bei einigen wenigen Patienten mit Prostatatumoren zwei Mutationen im AR-Gen beschrieben (Tilley et al., 1996; Marcelli et al., 2000; Taplin et al., 1995; Zhao et al., 2000; Taplin und Ho, 2001; Hyytinen et al., 2002). Die funktionelle Auswirkung der Doppelmutation (L701H und T877A) ergab, dass die Prostatakarzinomzellen durch all die Steroide zur Proliferation stimuliert werden, die auch in den untersuchten Einzelmutationen eine Proliferation hervorrufen (Zhao et al., 2000).

Verschiedene Studien unterstützen die Hypothese, dass die Amplifikation des AR-Gens verantwortlich für die Entwicklung einer Hormonresistenz ist (Visakorpi et al., 1995a; Koivisto et al., 1997). Eine Amplifikation des AR-Gens wurde bei 20 bis 30 % der Patienten mit hormonrefraktären Prostatakarzinomen gefunden (Koivisto et al., 1997; Gregory et al., 1998; Bubendorf et al., 1999; Miyoshi et al., 2000; Kaltz-Wittmer et al., 2000; Linja et al., 2001). Durch diese AR-Genamplifikation kommt es zu einer bis zu sechsfach höheren Expression des AR-Gens (Linja et al., 2001). Allerdings zeigen andere Studien eine heterogene oder verminderte AR-Genexpression bei refraktären Prostatakarzinomen (Ruizeveld de Winter et al., 1994; Hobisch et al., 1995; Kinoshita et al., 2000).

Nakayama et al. (2000) konnten im Promotor des AR-Gens eine Hypermethylierung der CpG-Inseln in einem Teil der Prostatakarzinome feststellen. Der AR-Promotor war bei 29 % der Patienten mit hormonrefraktären Prostatakarzinomen methyliert. Dagegen zeigte das Prostatagewebe von Patienten mit primären Karzinomen nur in 10 % der Fälle eine Hypermethylierung.

1.3 Das DICE1-Gen

LOH-Analysen beim Prostatakarzinom aber auch bei Tumoren der Lunge, des Ovars und des Ösophagus wiesen darauf hin, dass die Chromosomenregion 13q14 zusätzlich zum RB1-Gen weitere Tumorsuppressorgene beherbergen muss (Tamura et al., 1997; Alfonso et al., 1999; Ueda et al., 1999; Yin et al., 1999; Chen et al., 2001). In dieser Region wurden neben dem RB1-Gen die Tumorsuppressorgene Leu1, Leu2 und das DICE1-(deleted in cancer 1)-Gen lokalisiert (Friend et al., 1986; Lee et al., 1987; Liu et al., 1997; Wieland et al., 1999; Wieland et al., 2004). Durch den Einsatz mehrerer Mikrosatellitenmarker war es möglich, die tumorrelevante Region in 13q14 beim Prostatakarzinom weiter einzugrenzen (Yin et al., 1999; Ueda et al.; 1999, Afonso et al., 1999; Chen et al., 2001). Der Mikrosatellitenmarker D13S284 zeigte bei Prostatakarzinomen die höchste LOH-Rate von 37,5 % (Yin et al., 1999). Dieser Mikrosatellitenmarker D13S284 kolokalisiert mit dem DICE1-Gen in der Subbande des Chromosoms 13q14.3 (Wieland et al., 2001).

Das DICE1-Gen besteht aus 18 Exons mit einer Größe von 78 bis 619 bp. Die Introns haben eine Länge von 127 bp bis über 10 kb (Wieland et al., 2001). Insgesamt überspannt das DICE1-Gen auf dem Chromosom 13 eine Länge von mehr als 40 kb. Die DICE1-mRNA hat eine Länge von 4,4 kb und wird in den Zellen des Herzens, Gehirns, der Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und des Pankreas exprimiert (Wieland et al., 1999). Im Gehirn wurde ein alternatives Spleißprodukt identifiziert, welches zum Verlust des Exons 3 führte. Aus dem Exon-Verlust ergab sich jedoch kein vorzeitiges Stoppcodon, aber ein Verlust konservierter Proteindomänen. Diese Spleißvariante wurde ausschließlich im adulten Gehirn gefunden (Wieland et al., 2001).

Das Dice1-Protein besteht aus 887 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 100 kD und zeigt eine hohe Konservation zwischen den Homologen von *Drosophila melanogaster* (CG3125), *Caenorhabditis elegans* (F08B4.1) und *Mus musculus* (DBI-1). Das Dice1-Protein beinhaltet ein DEAD-Boxmotiv, benannt nach der hochkonservierten Aminosäurefolge Asp(D)-Glu(E)-Ala(A)-Asp(D). Eine DEAD-Box ist bei einer Vielzahl von Proteinen, die als ATP-abhängige RNA-Helicasen fungieren, zu finden (Linder et al., 1989). RNA-Helicasen sind für die Veränderung der Sekundärstruktur der RNA, aber auch für das Spleißen und den Translationsstart verantwortlich (Lüking et al., 1998; Garkavtsev et al., 2001; Westermarck et al., 2002). RNA-Helicasen mit DEAD-Motiven zeigen eine Folge von 8 verschiedenen Motiven (Schmid und Linder, 1992). Die anderen Motive der RNA-Helicasen zeigen keine vollständige Homologie im DICE1-Gen (Wieland et al., 2001).

DEAX-Box (Zusammenfassung von DEAD und DEAH-Boxen) enthaltende Proteine werden in der Gruppe der DDX-Proteine zusammengefasst. Dementsprechend wurde dem DICE1-Protein nach der HUGO-Nomenklatur die Bezeichnung DDX26 zugeteilt.

Die schwache Homologie des Dice1-Proteins zu den anderen Proteinen der DEAD-Superfamilie macht es schwierig die Funktion von Dice1 zu erklären. Durch eine *in-situ*-Hybridisierung eines Dice1-EGFP-Fusionsproteins (EGFP: *enhanced green fluorescent protein*) konnte eine preferentielle Kernlokalisation festgestellt werden (Wieland et al., 2001). Diese Kernlokalisation von Dice1 zeigt eine mögliche Beteiligung des Proteins bei der DNA-Reparatur, der Transkriptionskontrolle oder beim Spleißen der RNA. Unterstützt wird diese mögliche funktionelle Bedeutung des Dice1-Proteins durch die Anwesenheit der von-Willebrand-Faktor-A (VWFA)-Domäne im aminoterminalen Bereich des Proteins. Proteine mit VWFA-Domänen sind in die DNA-Reparatur und die Transkription eingebunden (Whittaker und Hynes, 2002).

Die carboxyterminale Sequenz des Dice1-Proteins zeigt eine Homologie von 92,9% zum DBI-1-Protein der Maus (Wieland et al., 1999). Das DBI-1-Protein interferiert mit der mitogenen Antwort des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors (IGF-1) und ist am substratabhängigen Zellwachstum beteiligt (Hoff et al., 1998).

Mutationen im DICE1-homologen Gen CG3125 von Drosophila melanogaster führen zu einem rezessiv-letalen Phänotyp. Diese Erkenntnis verweist auf eine mögliche Bedeutung des DICE1-Gens auf regulative Prozesse während der Entwicklung (Bourbon et al., 2002). Deletionen im Bereich des Mikrosatellitenmarkers D13S284 wurden in den Tumorgeweben von Patienten mit Prostatakarzinomen, aber auch in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, Ösophaguskarzinomen und Karzinomen der Mundhöhle gefunden (Tamura et al., 1997; Ogawara et al., 1998; Ueda et al., 1999; Wieland et al., 1999; Li et al., 2003). Eine verminderte DICE1-Expression oder deren Verlust konnte bei primären nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen festgestellt werden (Wieland et al., 1999). Karzinome der Ösophagusepithelzellen wiesen in 73 % der informativen Patienten ein LOH am Mikrosatellitenmarker D13S284 auf. Jedoch zeigten nur 5 % der Tumore mit LOH eine Mutation im DICE1-Gen (Li et al., 2003). Diese niedrige Mutationsrate ist ein Hinweis, dass das DICE1-Gen vorrangig durch andere genetische oder epigenetische Ereignisse in Tumoren herabreguliert wird.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Arbeit soll zur weiteren Klärung der Entwicklung von Hormonresistenzen sowie des Einflusses des Tumorsuppressorgens DICE1 auf die Progression des Prostatakarzinoms beitragen.

Bei den Untersuchungen zur Bedeutung des AR-Gens bei möglichen Hormonresistenzen des primären Prostatakarzinoms sind folgende Aufgaben zu lösen:

- 1. Bestimmung der Anzahl von Kopien des Androgenrezeptor-Gens und des X-Chromosoms mittels FISH-Diagnostik,
- 2. Überprüfung der ermittelten Ergebnisse mit einem zentromerspezifischen Sondenmix für die Chromosomen X, Y und 18 und
- 3. Korrelation der FISH-Ergebnisse mit den klinischen Daten.

Im zweiten Teil der Arbeit soll die molekulare Rolle des DICE1-Gens als Tumorsuppressorgen spezifiziert werden. Dabei waren zu Beginn dieser Arbeit sowohl die genomische Struktur des DICE1-Gens als auch der Promotor des Gens noch weitgehend unbekannt. Im einzelnen sind dabei folgende Punkte zu untersuchen:

- 1. Identifizierung und Charakterisierung des DICE1-Promotors,
- 2. Analyse des DICE1-Promotors auf CpG-Methylierung,
- 3. DICE1-Promotoranalyse bei Prostatakarzinomen.

Material 2.

Im folgenden Kapitel sind die Hersteller der verwendeten Reagenzien und Geräte sowie die Zusammensetzung von Standardlösungen und -medien aufgelistet.

2.1 Chemikalien

2.1.1 **Allgemeine Chemikalien**

Acrylamid Solution Ammoniumpersulfat Ampuwa Antifading mit DAPI (1,25 µg/ml) (4',6-Diamidino-2-phenylindol; Vectashild) **ß-Mercaptoethanol** Bisacrylamid Borsäure Bromphenolblau Chloroform Dimethylsulfoxid (DMSO) Dodecylsulfat-Natriumsalz Essigsäure Ethanol (absol.) Ethanol (96%, MEK-vergällt) Ethidiumbromid Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure Ficoll 400 Formaldehyd Formamid Isopropanol Kaliumacetat MgCl₂ x 6H₂O NaCl Na₂HPO₄ x 2H₂O Merck, Darmstadt

Serva, Heidelberg Serva, Heidelberg Frisenius Kabi, Bad Homburg Vector Laboratories, Heidelberg

Fluka, Taufenkirchen Pharmacia, Freiburg Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Roth, Karlsruhe Sigma Aldrich, Steinheim Serva, Heidelberg Roth, Karlsruhe Alkohol Handelskontor Berlin Alkohol Handelskontor Berlin Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Pharmacia, Freiburg Roth, Karlsruhe Calbiochem, Darmstadt Alkohol Handelskontor Berlin Sigma Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe Na-Laurylsarkosin Natriumacetat Merck, Darmstadt Natriumcitrat Roth, Karlsruhe NaOH Merck, Darmstadt Nonidet P-40 (NP-40) Roche, Mannheim Orange G Chemapol, Prag Phenol Roth, Karlsruhe Salzsäure Roth, Karlsruhe Tetramethyletylendiamid (TEMED) Merck, Darmstadt Tris Invitrogen, Karlsruhe **Xylen** Roth, Karlsruhe

2.1.2 Biochemikalien und Kits

Agarose Autoload TM Solid Phase Sequencing Kit Auto Read Sequencing Kit 5-Azacytidin α^{[32}P]-dCTP ß-Galactosidase Assay CpGenome DNA Modification Kit CSPD (ready-to-use) 7-Deaza-2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat (c7dGTP) Dig-Chemilumineszenz-Kit dNTPs Gelshift Assay Genejammer Transfektionsreagenz HotStarTaq-Polymerase mit Q-Solution und PCR-Puffer Hybridisierungspuffer Midi-Plasmid-Isolation Kit pBlue TOPO Cloning Kit Pepsin (3500 u/mg) Perfect Match pGEM T Easy Vector System **QIAGEN Plasmid Midi Kit**

Invitrogen, Karlsruhe Amersham Pharmacia, Freiburg Amersham Pharmacia, Freiburg Sigma Aldrich, Steinheim Amersham Pharmacia, Freiburg Invitrogen, Karlsruhe Intergen, Purchase, USA Roche, Mannheim

Sigma Aldrich, Steinheim Roche, Mannheim Invitrogen, Karlsuhe Promega, Mannheim Stratagene, La Jolla, USA

Qiagen, Hilden Vysis/Abbott, Wiesbaden Qiagen, Hilden Invitrogen, Karlsruhe Sigma Aldrich, Steinheim Stratagene, La Jolla, USA Promega, Mannheim Qiagen, Hilden DNA-Extraktionskit (QIA EXII) Restriktionsendonukleasen (mit dazugehörenden Restriktionspuffern und BSA) Sonden für alle FISH-Analysen S*ssl*-Methylase Superscript II Reverse Transcriptase SYBR Green Supermix Taq-Polymerase (rekombinant), mit dazugehörendem Reaktionspuffer und MgCl₂) Trizol-Reagenz Qiagen, Hilden

New England Biolabs, Schwalbach Vysis/Abbott, Wiesbaden New England Biolabs, Schwalbach Invirtogen, Karlsruhe Biorad, München

Invitrogen, Karlsruhe Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Zellkultur

Agar	Difco, Augsburg	
Ampicillin	Sigma Aldrich, Steinheim	
DMEM Ham's F12	Biochrom, Berlin	
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin	
Gentamycin	Biochrom, Berlin	
Hefe-Extrakt	Difco, Augsburg	
Isopropyl-ß-D-Thiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe	
200 mM L-Glutamin	Biochrom, Berlin	
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin	
Pepton	Roth, Karlsruhe	
Phosphate-buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe	
RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES		
und 0,532 g/l Glutamin	Biochrom, Berln	
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe	
Versen (1:5000)	Invitrogen, Karlsruhe	
X-Gal	Roth, Karlsruhe	

2.1.4 Längenstandards

100bp Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
1kb Leiter	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Verbrauchswaren

Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Diamantstift	Roth, Karlsruhe
Filterpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Fixogum	Marabu, Tamm
Hybond N+-Filter	Amersham Pharmacia, Freiburg
25 cm ² Kulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
50 µm Nylonfilter (Nytal HD55)	Heidland, Harsewinkel
Nagellack (farblos)	Jade
Objektträger Superfrost	Menzel-Gläser, Braunschweig
PCR-Gefäße	Sarstedt, Nürnbrecht
Petrischalen (Durchmesser: 3,5 cm)	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen (Durchmesser: 8,5 cm)	Roth, Karlsruhe
Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Mikro-Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nürnbrecht
Schaber, steril	Nunc, Wiesbaden
Skalpelle, steril	PFM, Köln
Sterilfilter	Renner, Darmstadt
Vakuumzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht

2.3 Geräte

Autoklav	KSG, Olching	
CCD Kamera	Applied Imaging, Hylton Park, USA	
CO ₂ -Inkubatoren	Nuaire, Plymouth, USA	
Digitales Bildaufnahme- und Bildver-		
arbeitungssystem (Cytovision)	Applied Imaging, Hylton Park, USA	
Elektrophoresekammern	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe	
Fluoreszenzmikroskop DMRBE	Leica, Bensheim	
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen	
Heizblock	Thermo Dux, Wertheim	
Laborschüttler	Scientific Industries, Bohemia, USA	
Mikrowelle 900 W	AEG, Nürnberg	
Mikropipetten	Gilson, Eppendorf, Heidelberg	

pH-Meter	Clamann&Grahnert, Dresden	
Photometer DU-64	Beckman, Krefeld	
Sequenziergerät AlfExpress und die		
dazugehörigen Auswertungsprogramme	Amersham Pharmacia, Freiburg	
Sterilbank	Heraeus, Stuttgart	
Thermocycler, iCycler mit optischem Modul	Biorad, München	
Thermocycler, Techne	Techne AG, Burkhardtsdorf	
Thermocycler, GeneAmp 9600	Perkin Elmer Cetus, Weiterstadt	
Transilluminator	Herolab, Wiesloch	
Videoprinter	Mitsubishi, Japan	
Vortexer	Sarstedt, Nümbrecht	
Waagen	Sartorius, Göttingen	
Zentrifuge Biofuge	Eppendorf, Heidelberg	
Zentrifuge 3K20	Sigma, Taufenkirchen	

2.4 Allgemeine Puffer und Stammlösungen

TBE-Puffer:	5x (pH 8,3)	Ethidiumbro	midstammlösung: 1 mg/ml
	445 mM Tris		1 mg Ethidiumbromid
	445 mM Borsäure		ad 1 ml aqua dest.
	10 mM EDTA, pH 8,0		
		Phosphat-bu	uffered saline (PBS)
Gelladepuffer Blue-Juice			10x (pH 7,4)
	0,1 % Bromphenolblau		1,37 M NaCl
	0,1 % Xylen-Cyanol		26,8 mM KCI
	15 % Ficoll 400		80,9 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
			17,6 mM KH ₂ PO ₄
Gelladepuffe	er Orange G		
	0,1 % Orange G	SSC	20x (pH 7,0)
	10 mM EDTA (pH 8,0)		3 M NaCl
	15 % Ficoll		0,3 M Tri-Natriumcitrat
		TE-Puffer	10 mM Tris-HCI
			1 mM EDTA (pH 8,0)

2.5 Medien für Zellkultur

LB (Luria-Bertani)-Nährmedium 10,0 g NaCl 5,0 g Hefe-Extract 10,0 g Trypton ad 1000 ml aqua dest. Autoklavieren

LB-Agarplatten

500 ml LB-Medium 7,5 g Agar Autoklavieren LB-Amp 500ml autoklaviertes LB-Medium, abgekühlt auf Raumtemperatur Zugabe von 1 ml Ampicillin (Endkonzentration 0,1 mg/ml)

LB-Amp Agarplatten 500ml autoklavierter LB-Agar abgekühlt auf 50°C Zugabe von 1 ml Ampicillin (Endkonzentration 0,1 mg/ml)

2.6 Herkunft des verwendeten Untersuchungsmaterials

2.6.1 Prostatakarzinome zur FISH-Analyse des Androgenrezeptor-Gens

Archiviertes Prostatakarzinom-Gewebe für die FISH-Analysen des Androgenrezeptor (AR)-Gens wurden von dem Institut für Pathologie und von der Klinik für Urologie der Universität Hamburg bereitgestellt. Die entsprechenden Tumor- und Nichttumorgebiete wurden auf HE-Schnitten markiert. Diese Markierung wurde dann auf die Paraffin-Schnitte, die für die Analysen benötigt wurden, übertragen.

Die klinischen Daten der Prostatakarzinom-Patienten wurden erst nach Abschluß der Analysen mitgeteilt. Bei allen Patienten ist vor der Prostatektomie die PSA-Konzentration bestimmt worden. Die postoperative PSA-Bestimmung erfolgte erstmals innerhalb der ersten zwei Jahre nach der Operation, danach jährlich. Postoperative PSA-Konzentrationen von 0,1 ng/ml oder höher dienten als ein biochemischer Marker für die Wiederkehr des Tumors. Von jedem untersuchten Patienten wurden das Alter, das Tumorvolumen, das Tumorstadium (T-Kategorien nach Sobin und Wittekind, 1997), das primäre (vorherrschende) und sekundäre (weitere) Gleason-Grading (nach Gleason et al., 1974) erfasst. Das durchschnittliche Alter der Patienten mit Prostatakarzinom betrug 61 Jahre (43 bis 73 Jahre). Insgesamt wurden Prostatakarzinome mit den Tumorstadien pT2a in 8 Fällen (10,0%), pT2b in 30 Fällen (37,5%), pT3a in 18 Fällen (22,5%), pT3b in 17 Fällen (21,0%) und pT4 in 7 Fällen (9,0%) untersucht. Sechs Prostatakarzinom-Patienten hatten Lymphknotenmetastasen (pN1). Diese 6 Fälle verteilten sich auf die Tumorklassifikationen pT4 (3 Fälle), pT3b (1 Fall) und pT3a (2 Fälle). Das primäre Gleason-Muster (Gleason grade) betrug 2 in 4 Fällen (5,0%), 3 in 62 Fällen (77,5%), 4 in 13 Fällen (15,0%) und 5 in 1 Fall (1,3%). Das sekundäre Gleason-Muster wurde mit 2 in 12 Fällen (15,0%), 3 in 32 Fällen (40,0%), 4 in 34 Fällen (42,5%) und 5 in 2 Fällen (2,5%) bestimmt. Der gesamte Gleason-Score betrug 5 in 15 Fällen (18,8%), 6 in 19 Fällen (23,8%), 7 in 43 Fällen (53,8%) und 9 in 3 Fällen (3,8%).

Die Bestimmung der PSA-Konzentration vor der Prostatektomie konnte bei 77 der 80 Patienten mit Prostatakarzinom ermittelt werden. Die Messung der PSA-Konzentration ergab bei diesen 77 Patienten einen Wert zwischen 2,8 und 44,7 ng/ml Serum (Mittelwert 12,1 ± 8,9 ng/ml). Postoperative Serum-PSA-Messungen konnten bei 70 Patienten durchgeführt werden. Diese Bestimmungen ergaben bei 20 Patienten einen PSA-Anstieg auf über 0,1 ng/ml. Die restlichen 50 Patienten zeigten einen negativen PSA follow-up.

Das Karzinom-Volumen der Prostatektomien lag zwischen 0,6 und 58,1 cm³. Der Mittelwert betrug 8,2 cm³ bei einer Standardabweichung von 8,7 cm³.

2.6.2 Prostatakarzinome für die Untersuchung des DICE1-Promotors

Für die Untersuchung des DICE1-Gens wurden Prostatakarzinome analysiert, die von dem Institut für Pathologie der Universität Magdeburg bereitgestellt wurden. Insgesamt wurden von 14 Patienten mit Prostatakarzinom Gewebeproben in flüssigem Stickstoff konserviert. Diese kryokonservierten Prostatakarzinome wurden für die LOH-Analysen eingesetzt. Für die Bestimmung des Methylierungsstadiums des DICE1-Promotors wurden 8 der 14 Patienten ausgewählt und die DNA für die Bisulfitmodifizierung aus Paraffinschnitten isoliert. Das durchschnittliche Alter dieser 14 Patienten betrug zum Zeitpunkt der Prostatektomie 63,3 Jahre (57 bis 73 Jahre). Insgesamt wurde das Tumorstadium (T-Kategorien nach Sobin und Wittekind, 1997) T1c bei einem, pT2a bei zwei, pT2b bei fünf, pT3a bei fünf und pT3b bei einem Patienten diagnostiziert. Der gesamte Gleason-Score (nach Gleason et al., 1974) betrug 5 in drei Fällen, 6 in zwei Fällen, 7 in acht Fällen und 8 in einem Fällen.

Bei 11 der 14 Patienten konnte die PSA-Konzentration vor der Prostatektomie bestimmt werden. Dabei wurde bei den 11 Patienten im Serum eine PSA-Konzentration zwischen 3,5 und 133,4 ng/ml gemessen (Mittelwert 20,8 \pm 37,6 ng/ml).

2.7 Primersequenzen

Auf Grund der Menge der eingesetzten Primersequenzen und der unterschiedlichen Primerkombinationen, werden die Sequenzen der Primer zusammen mit den etablierten PCR-Bedingungen im Ergebnisteil aufgelistet. Die Primersequenzen für die Realtime-PCR des DICE1-Gens und des GAPDH-Gens wurden von Wieland et al. (1999) übernommen (s. Kapitel 3.2.11). Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

3. Methoden

Im ersten Teil dieses Kapitels werden die Methoden zur Bestimmung der Anzahl der Androgenrezeptor-(AR)-Genkopien mittels Interphase-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Interphase-FISH) vorgestellt (Kapitel 3.1). Der zweite Teil geht auf die eingesetzten Methoden für die Promotor- und Expressionsanalysen des DICE1-Gens ein (Kapitel 3.2).

3.1 Interphase-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Interphase-FISH)

Die chromosomale *in-situ*-Hybridisierung ist eine molekularzytogenetische Methode, die es ermöglicht, spezifische DNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit einer markierten komplementären Nukleinsäuresonde zu identifizieren (Pardue et al., 1969; John et al., 1969). Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) kommen fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden zum Einsatz. Durch deren Verwendung ist es gelungen, die Empfindlichkeit und Auflösung der *in-situ*-Hybridisierung deutlich zu verbessern (Trask, 1991).

Die FISH-Methode basiert auf der Denaturierung der chromosomalen Ziel-DNA und der markierten DNA-Sonde. Die DNA-Sonde bindet an die komplementäre Sequenz der chromosomalen Ziel-DNA (Hybridisierung). Nach der Hybridisierung und dem Entfernen unspezifisch gebundener Sondenmoleküle ist eine Analyse der spezifischen Bindungsstellen der markierten DNA-Sonden auf der chromosomalen DNA möglich. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe der DNA-Sonden angeregt und die resultierende Lichtemission mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt. Durch ein Bildbearbeitungssystem ist es möglich, die Bindungsstellen mehrerer DNA-Sonden, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, zu erfassen und zu dokumentieren.

Neben den direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Sonden werden auch indirekt markierte Sonden verwendet. Bei indirekt markierten DNA-Sonden kommen Nukleotide zum Einsatz, die kovalent ein Reportermolekül (z.B. Biotin oder Digoxigenin) gebunden haben. Diese Reportermoleküle können durch Antikörper nachgewiesen werden, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Der Vorteil des indirekten Nachweises liegt in der Verstärkung der Intensität der Signale durch eine Koppelung verschiedener Antikörper. Dieses zeit- und arbeitsintensive Nachweisverfahren ist bei direkt markierten DNA-Sonden nicht nötig und stellt deren Vorteil in den Vordergrund.

Die bei der FISH-Methode verwendeten DNA-Sonden enthalten üblicherweise einen großen Anteil an repetitiver DNA. Repetitive DNA besitzt eine hohe Sequenzhomologie und würde bei der Durchführung der FISH-Analyse zu unspezifischen Signalen führen. Daher werden die DNA-Sonden vor der Hybridisierung mit einem Überschuss nichtmarkierter humaner Cot-1-DNA (Blocking-DNA) versetzt und denaturiert. Dabei bindet die Cot-1-DNA, die einen hohen Anteil hochrepetitiver Sequenzen enthält, an die repetitiven Anteile der DNA-Sonden (Lichter et al., 1990). Eine Absättigung der repetitiven Sequenzen ist die Folge, so dass die Signale der spezifischen Sequenz nicht mehr überlagert werden können.

3.1.1 Isolierung von Interphasenkernen aus paraffiniertem Gewebe

Material: Xylen

96 %, 70 %, 50 % Ethanol 0,9 % NaCl Proteinase K-Lösung: 5 mg/ml Proteinase K; 50 mM Tris/HCl pH 7,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 10 mM NaCl

1x PBS

Auf 10 µm Schnitten von Paraffin-eingebetteten Prostatakarzinomen wurden das Tumorbzw. das Nichttumorgewebe markiert. Als Vorlage dienten Hämatoxylin-Eosin gefärbte Paraffin-Schnitte, auf denen durch einen Pathologen die Tumorgebiete bzw. Nichttumorgewebe markiert worden sind. Je nach Größe des markierten Gewebes wurde Material von 5 bis 10 Paraffinschnitten für die Kernextraktion eingesetzt.

Die Methode der Kernextraktion für die Interphase-FISH erfolgte nach Liehr et al. (1995). Das entsprechend markierte Gewebe auf den nichtgefärbten Paraffinschnitten wurde mit einem sterilen Skalpell entnommen und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurde das Material mit 10 ml Xylen für 10 min deparaffiniert, 3 min bei 160 g (1000 upm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diese Deparaffinierung wurde zweimal wiederholt. Das deparaffinierte Material wurde anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (96 %, 70 %, 50 % Ethanol für je 5 min) rehydriert und zweimal für je 2 min mit 5 ml 0,9 % NaCI-Lösung gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Gewebe durch Zentrifugation (3 min bei 160 g) sedimentiert. Im Anschluss wurde das Gewebe mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Proteinase K-Lösung vermischt. Diese Suspension wurde 30 min bei 37°C inkubiert und dabei mehrmals stark gevortext. Die Lösung wurde durch eine 50 µm Nylonmembran gefiltert und die Membran mit 1x PBS (phosphate-buffered saline) gewaschen. Das Filtrat mit der Zellsuspension wurde 8 min bei 160 g zentrifugiert, das Pellet mit 1x PBS gewaschen

und erneut zentrifugiert. Zum Abschluss der Kernisolierung wurde das Pellet (je nach Größe) in 50 bis 100 µl 1x PBS resuspendiert.

3.1.2 Interphase-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Interphase-FISH)

3.1.2.1 Denaturierung der fixierten Zellkerne auf dem Objektträger

Material: 0,01 % Pepsin-Lösung: 0,01 % Pepsin in 0,1 N HCl 1x PBS MgCl₂/Formaldehyd-Lösung: 50 mM MgCl₂; 4 % Formaldehyd in 1x PBS 96 %, 85 %, 70 % Ethanol 0,1x SSC; 2x SSC 0,07 N NaOH

Für jede FISH-Analyse wurden zweimal 10 µl Zellkernsuspension auf einen markierten Objektträger (Superfrost) aufgetragen und auf einer Heizplatte bei 37°C über Nacht getrocknet. Zur Entfernung von restlichen Zytoplasmaanteilen wurden die Objektträger für 5 min in einer 0,01 % Pepsin-Lösung inkubiert und 5 min in 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Präparate in einer MgCl₂/Formaldehyd-Lösung für 5 min nachfixiert, erneut in 1x PBS gewaschen und getrocknet. Nach dieser Behandlung wurden die Objektträger in einer Ethanolreihe (je 2 min 70 %, 85 %, 96 % Ethanol) dehydriert und getrocknet. Für die Denaturierung wurden die Objektträger 1 min in 0,1x SSC und anschließend für 30 min in 2x SSC bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Objek tträger auf Raumtemperatur wurden diese für 1 min in 0,1x SSC gewaschen. Die Denaturierung der chromosomalen DNA erfolgte für 30 sec in einer 0,07 N NaOH-Lösung. Danach wurden die Objektträger für je 1 min mit 0,1x SSC und 2x SSC gewaschen. Zum Abschluss wurden die Objektträger erneut in einer Ethanolreihe dehydriert (je 1 min 30 %, 50 %, 70 %, 96 % Ethanol) und 10 min auf einer Wärmeplatte getrocknet (Protokoll modifiziert nach Fritz et al., 1998).

3.1.2.2 Sondenvorbereitung

Material: Lokusspezifische DNA-Sonden: Androgenrezeptor SpectrumOrange [Vysis/Abbott] Zentromerspezifische DNA-Sonden: CEPX – SpectrumGreen [Vysis/Abbott] Zentromerspezifischer Sondenmix mit CEPX – SpectrumGreen, CEPY – SpectrumOrange, CEP18 – SpectrumAqua [Vysis/Abbott] Hybridisierungspuffer für Lokusspezifische DNA-Sonden [Vysis/Abbott] Ampuwa Für die FISH-Analysen wurden direktmarkierte lokusspezifische und zentromerspezifische DNA-Sonden eingesetzt, die kommerziell bei der Firma Vysis/Abbott (Downer's Grove, USA) erhältlich sind.

Der Hybridisierungsansatz für die Interphase-FISH mit der Sonde für den Androgenrezeptor und die X-chromosomale Zentromerprobe CEPX lautet:

- 1,0 µl Androgenrezeptor (SpectrumOrange)
- 0,5 µl CEPX (SpectrumGreen)
- 7,0 µl LSI/WCP-Hybridisierungspuffer
- 1,5 µl Ampuwa

Der zentromerspezifischer Sondenmix wurde unverdünnt für die FISH-Analysen eingesetzt. Die Hybridisierungsansätze wurden 5 min bei 70°C de naturiert, anschließend sofort auf Eis abgekühlt und für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Wäh rend dieser Zeit bindet die unmarkierte Blocking-DNA an die repetitiven Sequenzbereiche der Sonden-DNA. Danach kann die einzelsträngige Sonden-DNA für die Hybridisierung eingesetzt werden.

3.1.2.3 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde die denaturierte DNA-Sonde auf den markierten Bereich des Objektträgers, in dem die denaturierten Zellkerne liegen, aufgetragen. Anschließend wurde der markierte Bereich auf dem Objektträger mit einem 22 x 22 mm Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Präparat und Deckglas wurden mit einer Gummilösung (Fixogum) verschlossen. Für die Hybridisierung wurden die Objektträger über Nacht bei 37℃ in einer feuchten Kammer inkubiert.

3.1.2.4 Waschung der Präparate nach der Hybridisierung und Gegenfärbung

Material: 2x SSC

2x SSC / 0,1 % NP40 Aqua dest. Vectashield/DAPI: Vectashield antifade medium with DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; 1,25 μg/ml)

Die Waschschritte nach der Hybridisierung erfolgten unter Bedingungen, bei denen sich unspezifisch gebundene DNA-Sonden von den Präparaten ablösen, während die

spezifischen DNA/DNA-Hybridmoleküle erhalten blieben. Damit erfolgte eine Reduzierung von unspezifischen Hintergrundsignalen.

Nach Entfernung der Gummilösung wurden die Deckgläser in einer 2x SSC-Lösung von den Objektträgern abgelöst. Danach wurden die Objektträger erneut in einer 2x SSC-Lösung für 2 min bei 72°C gewaschen, dann in einer 2x SSC/0,1 % NP-40-Lösung für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend kurz in destilliertem Wasser gespült. Die Gegenfärbung der Präparate erfolgte mit 20 µl Vectashield/DAPI. Vectashield ist eine Stabilisatorlösung für das DAPI. Die Objektträger mit der Vectashield/DAPI-Lösung wurden mit einem 24 x 50 mm Deckglas luftblasenfrei abgedeckt und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die überschüssige Lösung ausgedrückt und die Deckglasränder mit Nagellack versiegelt. Bis zur Auswertung der Präparate wurden die Objektträger bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt, die Langzeitlagerung erfolgte bei –20°C.

3.1.2.5 Fluoreszenzmikroskopie und Dokumentation

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte an dem Auflichtfluoreszenzmikroskop DMRBE-Fotomikroskop (Leica, Bensheim). Mit Hilfe von Einzelbandanregungsfiltern für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe wurden die verschiedenen Fluoreszenzsignale bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet und dokumentiert.

Nacheinander wurden die entsprechenden Monochrombilder der verwendeten Fluorochrome mit einer CCD Kamera (Applied Imaging, Santa Clara, USA) aufgenommen. Die Einzelaufnahmen wurden mit Hilfe des Computerprogramms CytoVision (Applied Imaging, Santa Clara, USA) zu einem Bild zusammengefasst und archiviert.

3.2 Molekularbiologische Methoden zur Promotorcharakterisierung des DICE1-Gens

3.2.1 Gewinnung menschlicher Genom-DNA aus Blut: DNA-Präparation mit Proteinaussalzung nach Baas und Miller

Zur DNA-Präparation aus peripherem Blut wurde die Proteinaussalzung nach Baas et al. (1984) sowie Miller et al. 1988 verwendet.

Material: Lysispuffer: 155 mM NHCI; 0,1 mM Na₂EDTA; 10 mM KHCO₃ (pH7,4) SE-Puffer: 75 mM NaCl; 1 mM Na₂EDTA (pH 8,0) 10 mg/ml Proteinase K 20 % Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) 6 M NaCI-Lösung 100 %, 70 % Ethanol

Eine Menge von 10 ml EDTA-Vollblut wurde mit 30 ml kaltem Lysispuffer in einem 50 ml Reagenzgefäß gemischt. Dieses Gemisch ist danach 30 min auf Eis inkubiert und dabei mindestens viermal gemischt worden. Danach wurde für 10 min bei 2000 upm und 10°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment in 10 ml kaltem Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde bei 2000 upm und 10°C 15 min abzentrifugiert. Die Resuspendierung mit Lysispuffer mußte so oft wiederholt werden, bis das Leukozytensediment beige erschien. Daraufhin wurde das Sediment vollständig in 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Nach der Resuspension wurden 25 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) und 150 µl 20 % SDS zugegeben. Diese Suspension wurde bei 55℃ über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1,5 ml 6 M NaCI-Lösung dazugegeben und die Suspension genau 15 sec geschüttelt und danach 15 min bei Raumtemperatur und 5000 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Reagenzgefäß überführt und 2,5 Volumen 100 % Ethanol zugegeben. Durch langsames Schwenken fiel die DNA aus und drehte sich zu einem Knäuel zusammen. Dieses DNA-Präzipitat ist mit einer 1 ml Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt worden. Nach Zentrifugieren und Waschen mit 70 % Ethanol wurde das getrocknete Pellet in H₂O aufgenommen und gelöst.

3.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Material: RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES; 0,532 g/l Glutamin (Biochrom) Penicillin/Streptomycin (10000 E/ml; Biochrom) L-Glutamin (200 mM; Biochrom) Fetales Kälberserum (Gibco/Invitrogen) Versen (1:5000; Gibco/Invitrogen) Trypsin (0,025 % in 1x PBS; Gibco/Invitrogen) Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (1x PBS; Gibco/Invitrogen)

Mediumansatz: 100 ml RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES; 0532 g/l Glutamin

1 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100 E/ml)

1 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM)

10 ml Fetales Kälberserum (Endkonzentration 10 %)

Die kryokonservierten Zellen wurden aufgetaut, in ein steriles Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium überführt und bei 1000 upm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen nochmals mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in eine 25 cm²-Kulturflasche mit Filterschraubkappe überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5,0 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Danach erfolgte der Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage.

Waren die Kulturflaschen dicht mit Zellen bewachsen, wurden die Zelllinien passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden wurden die Kulturflaschen mit 1 ml Versen für 10 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde zur vollständigen Ablösung der Zellen zu der Suspension noch 0,5 ml Trypsin-Lösung zugegeben und für weitere 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei Kulturflaschen verteilt und im Brutschrank kultiviert.

Für die Kryokonservierung der Zelllinien wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Versen und Trypsin abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 8 min bei 1000 upm zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen in 2 ml Einfriermedium (10% steriles DMSO verdünnt mit komplettem RPMI-Medium) aufgenommen. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und eingefroren. Das Einfrieren der Zelllinien erfolgte mit einer Einfrierhilfe, die die Proben langsam abkühlt. Nach 24 h wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

3.2.3 DNA-Isolierung aus Zelllinien

Material: 1x PBS

OLD-T Puffer: 40 mM Tris/HCI (pH7.5), 150 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH7,5) 10 mg/ml Proteinase K 20 % Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) Phenol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; CIA) 10 mM Tris/HCI (pH 8,5) 100 %, 70 % Ethanol

Die hier angegebene Methode bezieht sich auf eine DNA-Isolierung aus Zellen, die in einer 25 cm² Kulturflasche angezogen worden sind. Das Medium wurde aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen zweimal mit 2 ml 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden in der Anwesenheit von 2 ml 1x PBS abgeschabt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Zellsuspension ist bei 2500 upm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen worden. Die restlichen Zellen in der Kulturflasche wurden nochmals mit 1x PBS abgeschabt und mit dem Zellpellet erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen vollständig mit 500 µl OLD-T Puffer gelöst. Zu dieser Zellsuspension kamen 50 µl Proteinase K und 25 µl 20 % SDS. Zum enzymatischen Verdau wurden die Zellsuspension zunächst für einige Stunden bei 55°C inkubiert und danach je nach Fortschritt der Lyse nochmals Proteinase K zugegeben und über Nacht bei 55°C weit er inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension mit 1 Volumen (500 µl) Phenol extrahiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2500 upm kam der Überstand (wässrige Phase) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß. Dieser wurde mit einem ½ Volumen (250 µl) Phenol und ½ Volumen (250 µl) CIA extrahiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen (500 µl) CIA extrahiert. Nach der Zentrifugation wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus diesem Überstand wurde die DNA durch eine Ethanol-Fällung isoliert. Dazu wurden zu diesem Überstand 2 Volumina (1 ml) 100 % Ethanol gegeben. Die DNA erschien durch leichtes Schwenken als eine zarte Flocke, die durch Zentrifugation bei 13000 upm für 10 min getrennt wurde. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach der Trocknung des Pellets wurde die DNA in 50 – 100 µl 10 mM Tris/HCl Puffer gelöst.
3.2.4 Gewinnung genomischer DNA aus Paraffinschnitten

Material: Xylol

OLD-T Puffer: 40 mM Tris/HCI (pH7.5), 150 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH7,5) 10 mg/ml Proteinase K 20 % Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS) Phenol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; CIA) 10 mM Tris/HCI (pH 8,5) 100 %, 70 % Ethanol

Das Tumormaterial wurde von vier bis sechs 10 bis 15 µm dicken Paraffinschnitten mit einem sterilen Skalpell isoliert und in ein steriles 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Deparaffinierung erfolgte mit 1,5 ml Xylol für 5 min und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 8000 g. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Entfernt wurde das Xylol durch zweimaliges Waschen des Gewebepellets mit 1,5 ml 100 % Ethanol und Zentrifugation für 5 min bei 8000 g. Nach der letzten Zentrifugation wurde zur Entfernung des restlichen Ethanols das Gewebe in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Gewebe wurde anschließend vollständig in 500 µl OLD-T Puffer gelöst. Die Isolierung der DNA erfolgte in den weiteren Schritten wie im Kapitel 3.2.3 beschrieben.

3.2.5 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Material: Trizol-Reagenz (Invitrogen) Chloroform Isopropanol 75 % Ethanol RNase-freies H₂O (DEPC-H₂O)

Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen durch die Zugabe von 1 ml Trizol auf 10 cm² Kulturfläche lysiert. Durch häufiges Auf- und Abpipettieren des Trizol-Reagenz wurde die Lyse der Zellen verstärkt. Die Suspension wurde auf 1,5 ml Reaktionsgefäße (je 1 ml) verteilt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurden die Nukleinsäuren durch Phasentrennung mit Chloroform getrennt. Diese Phasentrennung erfolgte durch die Zugabe von 2 ml Chloroform auf 1 ml Trizol, Schütteln des Gemischs und anschließendes Zentrifugieren für 15 min bei 12000 upm und 4°C. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aus dieser wässrigen Phase wurde die RNA durch die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml eingesetztes Trizol präzipitiert. Die Fällung wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 min bei 12000 upm und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde die RNA in RNase-freiem H₂O gelöst.

3.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte im Spektralphotometer. Nach Abgleich des Photometers für die zu messenden Wellenlängen mit autoklaviertem MilliQ-Wasser wurde die mit dem selben Wasser verdünnte DNA im gleichen Bereich gemessen.

Für die Ermittlung der Qualität und Quantität der DNA waren folgende Wellenlängen wichtig:

260nm: Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren280nm: Absorptionsmaximum von Proteinen320nm: Absorptionsminimum von Nukleinsäuren

Eine OD von 1 bei einer Schichtdicke von 1cm entspricht 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 μ g/ml RNA. Das Verhältnis zwischen den Extinktionen (Extinktion = E) bei 260nm und 280nm gibt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren an und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

Die Konzentration der Nukleinsäure errechnet sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt:

Dabei ist: c = Konzentration

E = Extinktion

f = Verdünnungsfaktor

K = Konzentrationskoeffizient bei OD = 1 (μ g/ml)

3.2.7 cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase (RT-Reaktion)

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte durch die Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) und den mitgelieferten Reagenzien für die RT-Reaktion. Bei dem Enzym Superscript II handelt es sich um eine RNaseH negative reverser Transcriptase. Ansatz: 1x RT-Puffer 0,5 mM dNTPs 10 pmol Hexanukleotid Primer 5 pmol Oligo dT Primer 10 mM DTT 1 μg RNA ad 18 μl RNase freies H₂O

Die Bestandteile wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und kurz zentrifugiert. Die RNA wurde für 5 min bei 65°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Zu diesem Reaktionsgemisch wurden 40 Units RNasin (RNase-Inhibitor) und 200 Units Superscript II zugegeben. Die Umschreibung der mRNA erfolgte bei 42°C für 60 min. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C.

3.2.8 DNA-Amplifikation mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR lassen sich definierte DNA-Sequenzen millionenfach vermehren (Amplifikation) und nach Trennung durch Gelelektrophorese sowie Anfärbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Ethidiumbromid) sichtbar machen.

Der Prozeß der PCR wird in drei sich wiederholende Schritte unterteilt. Er beginnt mit der Auftrennung des doppelsträngigen DNA-Fragments (Template) bei 94°C in die beiden komplementären Einzelstränge (Denaturierung). Das Vorliegen der Einzelstränge ist Voraussetzung für den zweiten Schritt der PCR, das Anbinden der Primer. Dieser zweite Schritt wird als Annealing bezeichnet und findet bei Temperaturen zwischen 55-75℃ statt. Im dritten Schritt sind die 3'-Enden der Primer Startpunkte für eine thermostabile DNA-Polymerase, die die zwischen den Primern liegende Sequenz der Template-DNA in komplementäre DNA umschreibt. Diese Synthese einer komplementären DNA-Kopie wird möglich durch eine aus Thermus aquaticus isolierten DNA-Polymerase, der Taq-Polymerase, die bis 95℃ stabil ist. Entscheidend für die Polymerasewirkung ist neben der Temperatur auch die Mg²⁺-Konzentration. Sie hat Einfluß auf die Spezifität der Polymerase beim Finden der Primer. Die Taq-Polymerase hat ihr Syntheseoptimum bei einer Mg2+-Konzentration von 1,5mM. Dieser dritte Schritt wird als Extension oder Elongation bezeichnet und findet bei einer Temperatur von 70°C bis 72°C s tatt. Der neusynthetisierte DNA-Strang ist komplementär zu dem alten Strang, und beide Stränge können dann wiederum erneut denaturiert werden und einem neuen Zyklus zur Verfügung stehen. Daraus resultiert bei mehreren Zyklen ein exponentielles Ansteigen der Kopien. Die Zeiten für jeden Schritt richten sich nach der benutzten Polymerase und vor allem nach der Länge der zu synthetisierenden DNA-Abschnitte.

3.2.8.1 Ansatz der PCR

Für einen PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten auf Eis in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben:

Ansatz: 50 ng template DNA 1x PCR-Puffer 0,2 mM dNTPs 1,5 mM MgCl₂ 5 pmol forward Primer (Oligonukleotide) 5 pmol reverse Primer 0,5 Units Taq-Polymerase ad 20 µl Ampuwa

Nach dem Zusammengeben der Komponenten wurde gemischt und abzentrifugiert und die Proben in den Thermocycler mit einem beheizbaren Deckel gegeben.

3.2.8.2 PCR-Bedingungen

Für die einzelnen Amplifikationen gab es unterschiedliche Programme, die in den entsprechenden Abschnitten im Ergebnisteil beschrieben werden. Die Temperatur- und Zeitparameter der einzelnen PCR-Schritte ergaben sich aus der jeweiligen Sequenz der Oligonukleotide und der zu amplifizierenden Fragmentlänge. Als ein zeitliches Richtmaß galt, dass für die Amplifikation eines 1 kb großen Fragmentes eine Elongationszeit von 1 min nötig ist. Aus der Sequenz der Oligonukleotide ergibt sich die Temperatur des Schmelzpunktes dieser Basenfolge. Diese Temperatur ist wichtig für die Annealing-Temperatur, also das Anbinden der Primer an die zuvor denaturierte DNA. Als Richtmaß galt hier eine Annealing-Temperatur, die 1 bis 1,5°C unt er dem Schmelzpunkt der Oligonukleotide lag.

3.2.9 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese

Material: Agarose (Invitrogen)

1x TBE-Puffer Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) Gelladepuffer Blue-Juice; Orange G Basenpaarleiter als Marker: (100 bp-Leiter; 1 kb-Leiter je 0,1 μg/μl Stammlösung)

Die eingesetzte Agarosekonzentration richtete sich nach der erwarteten Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren. Sollte die DNA-Qualität nach einer Isolierung überprüft werden, so wurde die DNA in einem 1,0 % Agarosegel aufgetrennt. Bei PCR-Produkten mussten höhere Agarosekonzentrationen eingesetzt werden, um eine optimale Auftrennung auch kleiner DNA-Sequenzen zu erreichen. Kleine PCR-Produkte (bis 200 bp) wurden mit einem 1,8 % Agarosegel aufgetrennt, größere PCR-Produkte mit einem 1,5 % Agarosegel. Für das Gel wurde die entsprechende Menge Agarose (1,0 – 1,8 g Agarose) in 100 ml 1x TBE-Puffer durch Kochen in einem Mikrowellengerät gelöst. Das Kochen erfolgte solange, bis in der Lösung keine Schlieren beim Schwenken mehr sichtbar waren. Die auf ca. 50℃ abgekühlte Agarose wurde mit 10 µl Ethidiumbromidlösung gemischt und in die gesäuberte Gelkammer mit einem eingehängten Kamm für die Geltaschen gegossen. Nach dem Erhärten der Agarose wurde der Laufpuffer (1x TBE-Puffer) in die Elektrophoresekammer gegeben und der Kamm entfernt. Vor dem Auftragen der Proben sind diese mit 0,2 Volumen Ladepuffer (Gelladepuffer Orange G oder Blue-Juice) vermischt worden. Eine Geltasche wurde mit einem 0,5 µg Längenstandard (100 bp-Leiter oder 1 kb-Leiter) beschickt, die Gelkammer geschlossen und an das Netzgerät angeschlossen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 3 Volt/cm Gelgröße. Nach dem Lauf wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator fotografiert und dokumentiert.

3.2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Material: 40 % Acrylamid/Bisacrylamid 5x TBE-Puffer 10 % Ammoniumpersulfat (APS) Tetramethylethylendiamid (TEMED) Aqua dest.

Die nicht-denaturierende native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist zur Auftrennung von DNA-Protein-Hybriden eingesetzt worden. Dazu wurden 5 % Polyacryl-

amidgele in 0,5x TBE-Puffer verwendet. Zur Vorbereitung der Kammern waren die Glasplatten gründlich gesäubert und gegebenenfalls mit 70 % Ethanol abgewischt worden. Die Abstandshalter und der Abdichtungsstreifen wurden zwischen die Scheiben gelegt und befestigt. Für ein 5 % Polyacrylamidgel wurden in ein 50 ml Röhrchen 1,9 ml einer 40 % Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung gegeben und mit 1,5 ml 5x TBE-Puffer und 11,6 ml H₂O auf ein Endvolumen von 15 ml aufgefüllt. Nach dem Mischen wurden 35 µl TEMED und 150 µl 10 % APS (frisch hergestellt) zugegeben, nochmals kurz gemischt und die Lösung luftblasenfrei zwischen die mit Abstandshaltern versehenen Glasplatten gegossen. Der Kunststoffkamm wurde danach vorsichtig eingeschoben und das Gel zur Auspolymerisation etwa 30 min unter einen Abzug gestellt. Als Kontrolle der Auspolymerisation ist der Rest in dem 50 ml Gefäß verwendet worden. Nach der Polymerisation wurden der Kamm und der Abdichtungsstreifen vorsichtig herausgezogen und die Glasplatten mit dem Gel in der vertikalen Elektrophoresekammer befestigt. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE-Puffer. Vor dem Beladen des Gels erfolgte eine Spülung der Geltaschen mit einer Spritze. Nach Beendigung des Elektrophoreselaufs wurde das Gel mit einem Spatel von der hinteren Glasplatte getrennt.

3.2.11 Isolierung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen

Material: QiaEXII-Kit (Qiagen) 10 mM Tris/HCI (pH 8,5)

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Agaroseblöckchen wurde in ein zuvor abgewogenes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht des Agaroseblöckchens ist durch Abwiegen des Reaktionsgefäßes und Abzug des Leergewichtes bestimmt worden. Pro 100 mg Agaroseblöckchen wurden 300 µl QX1-Puffer (3 Volumen) und 10 µl QiaEXII-Matrix dazugegeben. Diese Suspension wurde für 10 min bei 50°C inkubiert und alle 2 min gevortext. Im Anschluss wurde die Suspension für 30 sec bei max. Drehzahl in einer Tischzentrifuge sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet nacheinander mit 500 µl QX1-Puffer und zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen. Danach ist das Pellet getrocknet und die DNA mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5 eluiert worden. Dazu wurde das Pellet mit 20 µl Tris resuspendiert und 10 min bei 50°C in kubiert. Die Trennung der DNA von der Matrix erfolgte durch Zentrifugation. Der wässrige Überstand enthielt die DNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.12 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR wurde mit dem Thermocycler iCycler der Firma Bio-Rad durchgeführt. Dieser Thermocycler war mit einem optischen Modul versehen, das aus einer Wolfram-Halogenlampe und den optischen Instrumenten für die Messung von Fluoreszenzintensitäten ausgestattet war.

Die Amplifikation der DNA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, einem DNAbindenden Fluorophor, dargestellt. Dieser Farbstoff interkaliert sequenzunabhängig mit doppelsträngiger DNA. Durch die Bindung von SYBR Green I an die DNA wird die Fluoreszenzemission um das 200fache verstärkt. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität erfolgte bei einer Wellenlänge von 530 nm. Durch die Bindungseigenschaften von SYBR Green I wurde die Fluoreszenzintensität während der Amplifikationszyklen immer am Ende der Elongationsphase, wenn die amplifizierte DNA doppelsträngig vorliegt, gemessen. Das Fluoreszenzsignal ist bei der Amplifikation der Template-DNA proportional der Menge an gebildetem PCR-Produkt.

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green eingesetzten kann auch eine Schmelzpunktanalyse des PCR-Produktes durchgeführt werden. Der Schmelzpunkt ist für jedes DNA-Fragment spezifisch. Bei einer spezifischen Temperatur denaturierten die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge und es kam zum Abfall der Fluoreszenzintensität. Der Punkt, bei dem 50 % der DNA einzelsträngig vorliegt, ist definitionsgemäß der Schmelzpunkt. Durch die Ermittlung des Schmelzpunktes ist es möglich, einen Rückschluss auf das amplifizierte PCR-Produkt zu führen. Besitzen alle PCR-Produkte den gleichen Schmelzpunkt, kann mit Sicherheit von einem identischen Amplifikat ausgegangen werden. Liegen bei einem PCR-Produkt zwei Schmelzpunkte vor, muss auf eine Verunreinigung des PCR-Ansatzes geschlossen werden. Allerdings können zwei Schmelzpunkte in einem PCR-Produkt auch auf eine heterozygote Mutation in der Template-DNA zurückzuführen sein. Wurde in der Negativkontrolle (PCR-Ansatz ohne DNA) ein Schmelzpunkt identisch zum Schmelzpunkt der PCR-Produkte gefunden, ist der PCR-Ansatz mit DNA verunreinigt. Andere Schmelzpunkte in der Negativkontrolle sind häufig auf Primerdimere zurückzuführen (Alex et al., 2002). Eine Bildung von Primerdimeren ist häufig auch in der graphischen Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten zu erkennen. Bei Primerdimeren kommt es nicht zu exponentiellen Anstiegen, sondern es ist ein späterer, nicht linearer Anstieg sichtbar.

3.2.12.1 Ansatz der Realtime-PCR

Material: 1x SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 5 pmol Forward Primer 5 pmol Reverse Primer 1 µl DNA-Template ad 25 µl Ampuwa

Die Bestandteile für die Realtime-PCR wurden in einem Mastermix gemischt und 24 µl luftblasenfrei in ein farbloses 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Als DNA-Template wurde 1 µl cDNA eingesetzt. Jeder PCR-Ansatz wurde zweimal angesetzt, um eine höhere Genauigkeit der Ergebnisse zu erreichen. Bei dem eingesetzten 2x SYBR Green Supermix handelt es sich um ein für den iCycler optimiertes System für die Realtime-PCR.

Als Kontrollgen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt. Die Sequenzen des forward-Primer lautet 5'TGGTATCGTGGAAGGACTCA3', sowie 5'ATGCCAGTGAGCTTCCCGTT3' für den reverse-Primer (Wieland et al., 1999).

3.2.12.2 Bedingungen der Realtime-PCR

Die Realtime-PCR-Bedingungen für die Amplifikation des Kontrollgens GAPDH wurden von den PCR-Bedinungen, die bei Wieland et al. (1999) beschrieben wurden, übernommen:

- 1. Denaturierung zu Beginn der Reaktion für 5 min bei 95°C
- 2. 60 Zyklen mit jeweils:

Denaturierung	45 sec bei 94℃
Annealing	45 sec bei 62℃
Elongation	45 sec bei 72 $^{\circ}$ (Messung der Fluoreszenz)

3. Bestimmung des Schmelzpunktes

Denaturierung für 45 sec bei 95°C

Abkühlung auf 50°C (Messung der Fluoreszenz)

90 Zyklen mit schrittweiser Erhöhung der Temperatur um 0,5℃ für 30 sec (Messung der Fluoreszenz)

3.2.12.3 Bestimmung der relativen DICE1-Genexpression

Durch die Verlagerung der Baseline in den linearen Anstieg (exponentielle Phase) der PCR wird der Threshold-Cycle (Ct-Wert) bestimmt. Der Ct-Wert einer Probe ist der Zyklus der PCR, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz des

gesamten PCR-Ansatzes ansteigt. Die richtige Lokalisierung des Ct-Werts ist wichtig, um Unterschiede in der Ausgangsmenge der analysierten mRNA im Testgewebe relativ zum Kontrollgewebe zu ermitteln. Bei jeder Realtime-PCR wurde der Ct-Wert der cDNA des untersuchten Gewebes jeweils zweimal ermittelt und der Mittelwert gebildet.

Die Ermittlung der DICE1-Expression erfolgte nach Livak und Schmittgen (2001) in Bezug auf die Expression der als Kontrollgen eingesetzten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dabei wurde zuerst die Differenz zwischen dem Ct-Wert des DICE1-Gens und dem GAPDH-Gen gebildet. Die relative DICE1-Expression wurde aus dem Vergleich von Testgewebe und normaler Prostata nach der folgenden Rechnung ermittelt:

relative DICE1-Expression $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$

 $\begin{array}{ll} \text{dabei ist} & \Delta Ct = Ct_{\text{DICE1}} \text{ - } Ct_{\text{GAPDH}} \\ \\ \text{und} & \Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{\text{Testgewebe}} - \Delta Ct_{\text{normale Prostata}} \end{array}$

3.2.13 Sequenzierung

Die hier durchgeführten Sequenzierungen erfolgten mittels Kettenabbruchmethode nach Sänger et al. (1977). Bei dieser Didesoxy-Sequenziermethode wurde ein Cy5-markierter Primer in der Sequenzierreaktion eingesetzt, der an der eingesetzten DNA als Matrize eine Einzelstrangsynthese initiiert. Die Kettenverlängerung während der Sequenzierreaktion fand unter Verwendung von vier Didesoxynukleotiden (ddNTP) statt. Unter dem Zusatz von geringen Mengen dieser ddNTP kommt es zu einem Kettenabbruch, wobei DNA-Fragmente entstehen, die eine unterschiedliche Länge haben. Die in der Sequenzierreaktion erzeugten DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in Sequenziergelen aufgetrennt. Dabei wurden die Fluoreszenzsignale durch den Laser induziert und über einen Computer gesammelt und ausgewertet.

Bei der Sequenzierung wurden für PCR-Produkte und Plasmid-DNA unterschiedliche Methoden angewandt.

3.2.13.1 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem Autoload TM Solid Phase Sequencing Kit der Firma Pharmacia. Dazu wurde eine PCR wie im Kapitel 3.2.8 beschrieben durchgeführt, mit der Einschränkung, dass ein biotinmarkierter Primer benutzt werden musste. Für jede Sequenzierung wurde ein 60 µl PCR-Ansatz benötigt. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel überprüft und die Konzentration überschlagen. Der Autoload-Kit basiert auf der Methode, dass das Biotin-markierte PCR-Produkt an einen streptavidinbeschichteten Kamm bindet. Durch Denaturierung und Waschen wurde der nichtmarkierte DNA-Strang entfernt und an dem markierten, am Kamm gebundenen DNA-Strang die Sequenzierreaktion durchgeführt.

Material: steriles MilliQ-Wasser

TE-Puffer 0,1 M NaOH Ampuwa-Wasser Autoload TM Solid Phase Sequencing Kit (Pharmacia) Cy5 markierter Sequenzierprimer (1 pmol/µl)

In einer Vertiefung einer 10 Well-Platte (Kit) wurden 80 µl B/W-Puffer mit dem restlichen PCR-Produkt (ca. 55 µl) vermischt. In diese Vertiefung wurde der Kamm gestellt und die Platte, zusammen mit dem Kamm, für 30 min bei 65°C inkubiert. Danach wurde der Kamm mit der gebundenen DNA zweimal für 30 sec in TE-Puffer gewaschen und anschließend die DNA in einer neuen 10 Well-Platte mit 120 µl 0,1 M NaOH für 5 min bei Raumtemperatur denaturiert. Im folgenden ist die DNA mit TE-Puffer und sterilem MilliQ-Wasser gewaschen worden. Zum Anbinden des Sequenzierprimers an den biotinmarkierten DNA-Einzelstrang wurden in einer neuen 10 Well-Platte 103 µl Ampuwa-Wasser mit 12 µl Annealing-Puffer und 5 µl Primer (Endkonzentration 5 pmol) gemischt und bei 65°C für ca. 1,5 min vorgewärmt. Für die Reaktion wurde der Kamm in die vorgewärmten Annealing-Mixe gestellt und 10 min bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die 10 Well-Platte für 10 min auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Für die Sequenzierreaktion wurden je Nukleotid (A, C, G bzw. T-Nukleotid) separate Ansätze, bestehend aus:

- 11 µl Ampuwa-Wasser
- 2 µl Annealing-Puffer
- 2 µI DMSO
- 1 µl Extension-Puffer
- 3 µl entsprechendes Nukleotid-Mix
- 1 μl verdünnte T7-Polymerase: 0,75 μl T7-Polymerase, 0,25 μl Dilution-Puffer

gemischt, und der gesamte Ansatz (20 µl) in die entsprechende Vertiefung einer 40 Well-Platte (Kit) gegeben und 1,5 min bei 37°C vorgewärmt. Kurz vor der Sequenzierreaktion wurde der Kamm aus dem Annealing-Mix genommen und mit sterilem MilliQ-Wasser gewaschen. Für die Sequenzierreaktion wurde die am Kamm gebundene DNA für 5 min bei 37°C in der 40 Well-Platte inkubiert. Zum Beenden d er Sequenzierreaktion wurde der Kamm in TE-Puffer gestellt und bis zum Gellauf gelagert. Für die Sequenzierung wurden in die Geltaschen der Longread-Gelmatrix 10 µl Stoppmix in jede Geltasche gegeben. Die Kämme wurden in die Taschen geschoben und 10 min einwirken lassen. Dabei sind die neusynthetisierten DNA-Stränge abgetrennt und die Kämme wieder entfernt worden. Laufbedingungen und Auswertung der Sequenzierung wurden im Kapitel 3.2.13.3 beschrieben.

3.2.13.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Auto Read Sequencing Kit (Pharmacia).

Material: 2 M NaOH

3 M NaAc pH4,8 Auto Read Sequencing Kit Ampuwa 100 % Ethanol Cy5-markierter Sequenzierprimer (5 pmol/µl)

8 µg Plasmid-DNA wurden mit Ampuwa-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 32 µl verdünnt. Die DNA wurde mittels 8 µl 2 M NaOH 10 min denaturiert. Anschließend wurde mit 7 µl 3 M NaAc, 4 µl Ampuwa und 120 µl Ethanol für 15 min bei –70°C gefällt und die Suspension für 30 min bei 15000 upm und 4°C zentrifugiert. Das Pel let ist mit 70 % Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet worden. Das Pellet wurde mit 10 µl Ampuwa gelöst und mit 2 µl Sequenzierprimer und 2 µl Annealing-Puffer (Kit) vermischt. Diese Lösung wurde 5 min bei 65°C, anschließend sofort für 10 min bei 37°C und für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Sequenzierreaktion. Dazu wurden in die Reaktionsgefäße mit den Annealingreaktionen 1 µl Extinktions-Puffer, 3 µl DMSO und 2 µl verdünnte T7-Polymerase (1 µl T7-Polymerase + 1,25 µl Enzyme Dilution Puffer) gegeben. Von dieser Suspension wurden je 4,5 µl in vier unterschiedliche Reaktionsgefäße verteilt, in die zuvor je 2,5 µl des A-, C-, G- bzw. T-Mixes (Kit) pipettiert worden sind. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 37°C inkubiert und danach die R eaktion mit 5 µl Stop-Mix abgebrochen. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden alle Proben für 3 min bei 85°C denaturiert.

3.2.13.3 Elektrophorese und Auswertung

Die PCR-Produkte wurden von der automatischen Sequenzieranlage Alfexpress aufgetrennt und ihre Sequenz abgelesen. Die Sequenzplatten sind mit Aqua bidest. gespült, dann mit 100 % Ethanol nachgespült und getrocknet worden. Als Gel für die Sequenzierung diente die Longread Fertigmatrix (Pharmacia). Aufgetrennt wurden die Ansätze in 48 cm langen Gelen mit einer Dicke von 0,5 mm bei 37 W über 15 Stunden mit 0,5x TBE-Puffer als Laufpuffer. Die Auswertung erfolgte mit der Software des Herstellers der Sequenzieranlage.

3.2.14 Ligation von PCR-Produkten in einen Vektor

Die Ligation von PCR-Produkten erfolgte in linearisierte Vektoren (pGEM-T Easy bzw. pBlue-TOPO) mit einem einzelnen Deoxythymidin-Nukleotid-Überhang. Eine Klonierung in diese Vektoren ist möglich, da die Taq-Polymerase mit ihrer terminalen Transferase ein einzelnes Deoxyadenosin an die beiden 3'-Enden des PCR-Produktes anbaut. Diese Überhänge ermöglichen eine schnelle und effiziente Ligation von PCR-Produkten. Für die Ligation wurden die PCR-Produkte mit dem QiaEXII-Kit (Qiagen) aus den Agaroseblöckchen isoliert.

3.2.14.1 Ligation in den pGEM-T Easy Vektor

Die Ligation von DNA erfolgte mit dem pGEM-T Easy Vektor Systeme (Promega). Dieser Kit beinhaltete neben dem pGEM-T Easy Vektor alle benötigten Enzyme und Puffer. Folgende Bestandteile wurden auf Eis in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gegeben:

> 5 μl 2x Rapid Ligation Puffer 0,5 – 1 μl pGEM-T Easy Vektor 1 μl T4 DNA-Ligase 2 bis 4 μl PCR-Produkt ad 10 μl Ampuwa

Die eingesetzte DNA-Menge richtete sich nach der abgeschätzten Konzentration des aufgereinigten PCR-Produktes. Die Menge eingesetzten Vektors richtete sich ebenfalls nach der Konzentration des PCR-Produktes. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 8℃. Anschließend wurde das Ligationsprodukt bei –20℃ a ufbewahrt.

3.2.14.2 Ligation in den pBlue-TOPO-Vektor

Dieser spezielle Vektor wurde für die Charakterisierung der in Frage kommenden Promotorregion des DICE1-Gens eingesetzt. Der pBlue-TOPO-Vektor besitzt die DNA-Sequenz des ß-Galaktosidase Gens (*lacZ*) aus *Escherichia coli* (*E. coli*) ohne einen Promotor. An dessen Stelle befindet sich die Klonierungsstelle. Der pBlue-TOPO-Vektor ist

kovalent mit der Topoisomerase I verbunden, die den Vektor aktiviert und die Ligation ermöglicht (Shuman, 1994).

Für die Ligation wurden die folgenden Komponenten des pBlue TOPO Cloning Kits (Invitrogen) auf Eis zusammengegeben:

μl Salt solution
 5 – 4 μl PCR-Produkt
 μl pBlue-TOPO-Vektor
 ad 6 μl Ampuwa

Das Reaktionsgemisch wurde gemischt und 10 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktion auf Eis bis zur Transformation gelagert.

3.2.15 Transformation in XL1-Blue-Zellen nach Hanahan (1986)

Material: SOB-Medium: 20 g Pepton, 5g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl, ad 1000 ml H₂O (pH 7,0); 10 mM MgCl₂
TFB-Puffer: 0,1 M KCl, 45 mM MnClx4H₂O, 10 mM CaCl₂x2H₂O, 3 mM HACoCl₂x4H₂O, 10 mM K-MES Puffer
DnD: 1 M Dithiothritol, 80% DMSO, 10 mM Kaliumacetat
0,1 M Isopropyl-ß-D-Thiogalactosid (IPTG)
2 % X-Gal in Dimethylformamid
LB-Amp Agarplatten (Ampicillinkonzentration 0,1mg/ml)

Am Vortag der Transformation wurden XL1-Blue-Zellen auf LB-Agar ohne Antibiotika ausgestrichen und die Agarplatten bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden 3 - 5 XL-1 Blue Kolonien in 12,5 ml SOB-Medium gegeben und dieses bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,3 erreicht war. Nach dem Erreichen dieser OD wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 12 min bei 2500 upm und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet in 3,75 ml T FB-Puffer resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation war das Zellpellet in 1 ml TFB-Puffer aufgenommen worden, unter Schwenken des Röhrchens wurden tropfenweise 35 μ l DnD dazugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zugabe von DnD wiederholt. Für die Transformation wurde der halbe Ligationsansatz mit 200 μ l Bakterien-Suspension gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit sind die Zellen für 90 sec einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort daran anschließend für 2 min auf Eis gestellt worden. Zum Transformationsansatz wurden 800 μ l SOB-Medium gegeben und für 60 min

bei 37℃ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet mit 100 µl SOB-Medium gelöst. Die Zellen wurden auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert. Zur Blau-Weiß-Selektion sind vor dem Ausplattieren der Zellen 50 µl IPTG und 20 µl X-Gal auf die Agarplatten aufgetragen worden.

3.2.16 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen wurden zwei Methoden angewandt. Die Wahl wurde beeinflusst von der Menge und der Konzentration der Plasmid-DNA, die erreicht werden musste. Für eine geringe Endkonzentration wurde eine Mini-Plasmid-Präparation, zum Erreichen einer höheren Konzentration eine Midi-Plasmid-Präparation durchgeführt.

3.2.16.1 Mini-Plasmid-Isolierung (nach Ausubel et al., 1992)

Material: Lösung I: 50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCI (pH 8,0); 10 mM EDTA Lösung II: 0,2 M NaOH; 1 % SDS Lösung III: 5 M K-Ac (14,5 ml Eisessig ad 100 ml 2,5 M K-Ac) 100 %, 70 % Ethanol TE-Puffer

Von den LB-Agarplatten wurden mit einer Einzelkolonie 2 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin in einem Schüttelröhrchen angeimpft und über Nacht bei 37℃ geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Übernachtkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 13000 upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl Lösung I resuspendiert, gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach kamen 200 µl Lösung II dazu. Durch Invertieren der Reaktionsgefäße wurde die Suspension gemischt und für die Lyse für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden weitere 150 µl eiskalte Lösung III dazugegeben, invertiert und 10 min auf Eis inkubiert. Der weißliche Niederschlag wurde bei 13000 upm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand, der frei von weißem Niederschlag sein sollte, wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 2 Volumen 100 % Ethanol gefällt und anschließend mit 1 Volumen 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde unter Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.16.2 Midi Plasmid Präparation

Material: QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) Isopropanol 70 % Ethanol 10 mM Tris/HCl pH 8,5

Mit einer Einzelkolonie wurden 50 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 3500 upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 4 ml Puffer 1 resuspendiert. Zu dieser Suspension kamen 4 ml Puffer 2, nach einer Inkubation von 5 min 4 ml Puffer 3. Nach jeder Zugabe wurde das Reaktionsgefäß durch Invertieren gemischt. Die Suspension wurde in die QIA-Filter-Cartridge überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die QIA-Säule wurde mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Nach dem Durchlaufen des QBT-Puffers wurde die Zellsuspension durch die Filter-Cartridge in die Säule gedrückt. Nach dem Binden der Plasmid-DNA an das Säulenmaterial wurde diese zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen. Eluiert wurde die DNA mit 5 ml QF-Puffer. Zu dem Eluat kamen 3,5 ml Isopropanol, und die gefällte DNA wurde bei 5500 upm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 – 100 µl 10 mM Tris/HCI-Puffer gelöst.

3.2.17 Transfektion von COS-7 Zellen

Die Transfektion von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Transfektionsreagenz GeneJammer (Stratagene).

Material: 1x PBS (steril)

DMEM/Ham's F12-Medium Fetales Kälberserum GeneJammer-Transfektionsreagenz Gentamycin

Mediumansatz: 100 ml DMEM Ham's F12 10 ml Fetales Kälberserum (Endkonzentration 10%) 0,5 ml Gentamycin (Endkonzentration 5 ng/ml) Am Vortag der Transfektion wurden 35 mm Petrischalen mit $1x10^5$ Zellen in 2 ml Kulturmedium (DMEM/Ham's F12, 10 % fetales Kälberserum, Gentamycin) beimpft und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h, bei einer Konfluenz von ca. 60 % wurden das Medium abgenommen, die Kulturen zweimal mit 2 ml 1x PBS gewaschen und die Zellen mit 900 µl Kulturmedium ohne Zusätze bis zur Transfektion gelagert.

Für die Transfektion wurden 100 μl Kulturmedium ohne Zusätze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 6 μl des GeneJammer-Transfektionsreagenz vermischt. Nach 10 min wurde 1 μg Plasmid-DNA bzw. Ampuwa, als Negativkontrolle, zu dem verdünnten Transfektionsreagenz gegeben und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Transfektions-Mixtur tropfenweise unter Schwenken in die Kulturschale mit den vorbereiteten Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurde 1 ml Medium mit der doppelten Konzentration an fetalem Kälberserum (20 %) und Gentamycin (10 ng/ml) zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium von den transfektierten Zellen abgenommen und durch frisches Medium mit 10 % fetalem Kälberserum und 50 ng/ml Gentamycin ersetzt. Nach drei Tagen wurden die Zellen für die weiteren Versuche isoliert.

3.2.18 ß-Galaktosidase-Nachweis

Der Nachweis der ß-Galaktosidase erfolgte mit dem ß-Galactosidase-Assay (Invitrogen). Material: 1x PBS

ß-Galactosidase-Assay (Invitrogen)

Das Medium der mit ß-Galactosidase-Konstrukten transfektierten COS-7-Zellen wurde abgenommen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Durch Abkratzten der Zellen mit einem sterilen Schaber wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Zellsuspension wurde bei 2000 upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl Lysis-Puffer gelöst. Die Lyse erfolgte durch Einfrieren der Zellen für je 5 min auf Trockeneis und schnelles Auftauen in einem 37℃ Wasserbad. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

10 µl des Zelllysats wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 20 µl sterilem H_2O verdünnt. Zu dieser Suspension kamen 70 µl ONPG und 200 µl Cleavage-Puffer mit ß-Mercaptoethanol. Dieser Ansatz wurde gemischt und 60 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion mit dem Zusatz von 500 µl Stop-Puffer beendet. Die Absorption wurde bei 420 nm in einem Spektrometer gemessen und gegen einen Nullwert (ONPG + Cleavage-Puffer) abgeglichen.

Die experimentelle Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte unter dem Gesichtspunkt, dass β-Galaktosidase die Hydrolyse von ortho-Nitrophenyl-β-

Galaktopyranosid (ONPG) katalysiert. Die Hydrolyse von ONPG zum ONP-Anion entwickelt eine gelbe Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm.

Für die Ermittlung der Hintergrundaktivität wurden bei jedem Experiment nicht transfektierte COS-7-Zellen mitkultiviert.

Im einzelnen mussten für die Berechnung der spezifischen β-Galaktosidase-Aktivität die folgenden Werte aufgenommen werden:

- 1. Quantifizierung der Hydrolyse von ONPG zu ONP bei 420 nm
- 2. Bestimmung der Gesamtproteinmenge des Lysats der transfektierten COS-7 Zellen

Aus diesen Werten erfolgte die Berechnung der spezifischen Aktivität der β-Galaktosidase nach der folgenden Gleichung:

spezifische Aktivität = mols an hydrolysierten ONPG t mg Protein

dabei sind nmols an hydrolysiertem ONPG = $\frac{(OD_{420}) \times (8 \times 10^5 \text{ nl})}{(4500 \text{ nl/nmoles x cm}) \times 1 \text{ cm}}$

Dabei ist : t = Zeit der Inkubation bei 37℃ (60 mi n)
mg Protein = Gesamtproteinmenge im Lysat der COS-7-Zellen
4500 = Extinktionskoeffizient
1 cm = Länge des Strahlenwegs durch die Messküvette

3.2.18.1 Proteinbestimmung nach Bradfort

Material: steriles MilliQ-Wasser Bio-Rad Protein Assay Bradfort-Reagenz

Die Proteinbestimmung der Proteinmenge der COS-7-Zellen erfolgte nach Bradfort (1976).

1 μ I Zell-Lysat wurde mit 800 μ I H₂O verdünnt, mit 200 μ I Farbstoff versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen und mit dem Leerwert abgeglichen.

Für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurde eine Proteineichkurve aufgenommen, anhand derer die Proteinmenge bestimmt werden konnte.

Zur Erstellung dieser Eichkurve wurde von definierten Mengen (1 – 25 μ g/ml) von Rinderserum-Albumin (BSA) der Extinktionswert bei 595 nm bestimmt. Aus den ermittelten

Werten wurde die Eichkurve errechnet (Abbildung 3.1). Jede Extinktionsmessung der einzelnen BSA-Konzentrationen erfolgte zweimal.



Abbildung 3.1: Proteineichkurve von Rinderserum-Albumin (BSA), aufgenommen im Konzentrationsbereich von 1 – 25 µg/ml.

3.2.19 Bandshift-Assay

Der Bandshift-Assay ist ein einfaches System zur Detektion von DNA-bindenden Proteinen (Ausubel et al., 1989). In dieser Arbeit kam der Gel-Shift-Assay der Firma Promega zur Anwendung. Jedoch wurde er nicht im eigentlichen Sinn der Detektion DNA-bindender Proteine, sondern zur Erkennung von DNA-Sequenzen, die Proteine binden können, eingesetzt. Als Proteingemisch diente ein Kernextrakt aus HeLa-Zellen, der reich an Transkriptionsfaktoren ist.

3.2.19.1 Radioaktive PCR

Radioaktiv markiert wurden die PCR-Produkte für den Bandshift-Assay mit a[³²P]-dCTP. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide erfolgte während der PCR. Als Primer wurden die Oligonukleotide für das Promotorfragment DICE1Prom6 eingesetzt (s. Tabelle 4.4) Material: 1x PCR-Puffer

0,2 mM dATP, dTTP, dGTP
0,01 mM dCTP
0,1 μCi α[³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia)
5 pmol Forward Primer
5 pmol Reverse Primer
1,5 mM MgCl₂
0,5 U Taq-Polymerase
5 % DMSO
50 ng DNA

Nach dem Mischen der PCR-Ansätze erfolgte die Amplifikation der DNA-Probe. Im ersten Schritt wurde die DNA für 5 min bei 95°C denaturier t. Anschließend folgten 36 Zyklen mit je 1 min Denaturierung bei 95°C, Primerannealing bei 59°C und Elongation bei 72°C. Die abschließende Elongation erfolgte für 10 min bei 72°C.

3.2.19.2 Herstellung der DNA-Protein-Hybridmoleküle

Material: Gel Shift Assay Systems (Promega) α [³²P]-dCTP-markiertes PCR-Produkt

Für die Herstellung der DNA-Protein-Hybridmoleküle wurden 2 μ I 5x Gel Shift Binding Puffer zusammen mit 1 μ I HeLa-Kernextrakt und 6 μ I H₂O gemischt. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Danach wurde 1 μ I α [³²P]-dCTP-markiertes PCR-Produkt dazugegeben und erneut 20 min inkubiert. Zuletzt musste die Reaktion durch die Zugabe von 2 μ I Gelladepuffer Blue Juice abgestoppt werden.

3.2.19.3 Nachweis der radioaktiv-markierten Hybridmoleküle

Nachgewiesen wurden die DNA-Protein-Hybridmoleküle durch die Auftrennung in einem nichtdenaturierenden PAGE-Gel (Kapitel 3.2.5). Der gesamte Ansatz (12 µl) wurde aufgetragen und solange aufgetrennt, bis das Bromphenolblau des Gelladepuffers die untere Gelgrenze erreicht hatte. Daraufhin wurde die Gelapparatur demontiert und das Gel für 60 min bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Detektiert wurden die Banden durch Exposition auf einem Röntgenfilm bei –70°C. Danach wurde der Röntgenfilm entwickelt durch 3

minütige Inkubation in Entwickler-Lösung, Spülen mit Wasser und Inkubation von 15 min in Fixierer-Lösung.

3.2.20 Restriktionsspaltung

Material: Restriktionsenzyme mit ihren entsprechenden Puffern 20x BSA Ampuwa-Wasser

Die Restriktionsspaltung von DNA erfolgte nach folgendem Ansatz:

1 μg DNA 10 units Restriktionsenzym 1x Restriktionsenzym-Puffer BSA (je nach Restriktionsenzym – Anleitung des Anbieters) ad 20 μl H₂O

Dieser Ansatz wurde gemischt und abzentrifugiert. Inkubiert wurden die Ansätze bei der entsprechenden Temperatur, die vom Anbieter für das Restriktionsenzym vorgeschrieben worden ist. Die Inkubation erfolgte für mindestens 3 Stunden. Nach der Restriktionsspaltung wurden die Enzyme durch Erhitzen für 5 min auf 70°C inaktiviert.

3.2.21 Southern-Blot

Material: 0,25 N HCl 0,4 M NaOH

2x SSC Hybond N+-Filter Filterpapier (Schleicher & Schüll GB 002 und 003) Zellstoff Blotapparatur

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zusammen mit einem Lineal fotografiert. Das Gel ist in einer Schale mit 0,25 N HCl bedeckt und 10 min bei Raumtemperatur auf einer Laborwippe inkubiert worden. Dieser Schritt diente der Depurinierung, bei der die DNA in kleinere Fragmente zerteilt wurde. Anschließend ist die DNA durch die Inkubation des Gels mit 0,4 N NaOH für 20 min denaturiert worden. Dieser

Denaturierungsschritt wurde einmal wiederholt. In der Zwischenzeit wurde die Blotapparatur vorbereitet. In die Blotwanne wurde eine Plexiglasbrücke gestellt, über die eine Lage Filterpapier (GB 002) so gelegt wurde, dass beide Enden in die Wanne reichten. Brücke und Wanne wurden mit 0,4 N NaOH gefüllt. Auf das Filterpapier kam das denaturierte Gel und das angrenzende Filterpapier wurde mit Plastikstreifen abgedeckt. Der Hybond N+-Filter wurde auf die Maße des Geles zugeschnitten, mit 0,4 N NaOH angefeuchtet und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Auf diesen Filterpapiere (GB 003) und ca. 10 cm Zellstoff. Auf diesen Zellstoff kamen eine Glasplatte und ein Gewicht (ca. 500 g). Am nächsten Tag wurde der Blotaufbau abgenommen, der Filter beschriftet und markiert. Die DNA wurde mit 2x SSC auf der Membran fixiert. Dazu ist der Filter mit der DNA-Seite nach oben in eine Schale mit 2x SSC für dreimal 2 min gelegt worden. Daraufhin konnte der Filter zwischen Filterpapier getrocknet und bis zur Hybridisierung gelagert werden.

3.2.22 Dig-Chemilumineszenz-Nachweis

Material: Blocking-Reagenz: 1% Blockingreagenz in 100mM Tris/HCI (pH7,5), 150mM NaCl 20x SSC 10 % Na – Laurylsarkosin 20 % SDS CSPD

Lösungsansatz: Waschlösung I : 2x SSC; 0,2 % SDS Waschlösung II: 50 mM Tris/HCI (pH 7,5); 75 mM NaCI; 0,3 % Tween 20 Waschlösung III: 50 mM Tris/HCI (pH 7,5); 75 mM NaCI

Das Blocking-Reagenz wurde in einer Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung kamen 7,5 ml 20x SSC (Endkonzentration 5x SSC), 300 µl 10 % Na-Laurylsarkosin (Endkonzentration 0,1 %) und 30 µl 20 % SDS (Endkonzentration 0,02 %) zu einem Endvolumen von 30 ml dazu. Diese Hybridisierungslösung wurde bei 42°C vorgewärmt. Für die Prähybridisierung wurden 15 ml der Lösung in eine Hybridisierungsflasche gegeben und der Blotfilter darin 2 Stunden inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und durch 10 ml neue Hybridisierungslösung ersetzt. Zu dieser Hybridisierungslösung kamen 100 pmol DIG-markiertes Oligonukleotid. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (ca. 17 h). Nach der Hybridisierung wurde der Filter für zweimal 10 min bei 42°C in Waschlösung I gewaschen, anschließend für 5 min bei Raumtemperatur in Waschlösung II.

Für die Chemilumineszenz kam der Filter für 30 min in 80 ml 0,1 % Blockingreagenz. Diese Waschlösung wurde durch 20 ml neues 0,1 % Blockingreagenz ersetzt und mit 2 µl Anti-Dig-AP-Antikörper (Verdünnung 1:10000) versehen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde der Filter für zweimal 15 min in Waschlösung II und für 5 min in Waschlösung III gewaschen. Der Filter wurde aus der Waschlösung genommen, leicht getrocknet und auf eine Frischhaltefolie gelegt. Auf den noch feuchten Filter wurde wenig CSPD verteilt und mit einer zweiten Folie bedeckt. Das CSPD konnte für 5 min im Dunkeln einwirken, bevor alle restliche Lösung aus den Folien herausgedrückt wurde. Die Folien wurden luftdicht verschlossen und für 15 min bei 37℃ in einer Röntgenfilmkassette inkubiert. Danach wurde der Röntgenfilm auf den Filter gelegt und bei 37℃ inkubiert.

Die Entwicklung der Filme erfolgte für 3 min in einer Entwickler-Lösung. Daraufhin wurde der Film kurz in Wasser gespült und 15 min in Fixierer-Lösung inkubiert.

3.2.23 Gewinnung von Gewebeproben durch Mikrodissektion

Für die Mikrodissektion wurden 10 µm dicke Kryoschnitte auf eine spezielle Membran aufgetragen, die über einen Objektträger gezogen war. Die Kryoschnitte wurden mit einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung angefärbt und bis zur Mikrodissektion bei –70℃ aufbewahrt. Die Mikrodissektion erfolgte mit Hilfe des UV-Laser-Mikrodissektionsmikroskops der Firma SL Microtest (Jena). Bei der Mikrodissektion wurden mindestens 100 Zellen gewonnen.

Das Mikrodissektat wurde in 50 µl Proteinase-K-Lösung (0,1 µg/µl Proteinase K in 10 mM Tris pH 9,0; 1,0 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % NP40) aufgenommen und bei 55℃ in einem Thermoschüttler für 1 h geschüttelt. Nachdem sich das Gewebe gelöst hatte, wurde die Proteinase K bei 95℃ für 10 min inaktiviert. Vor d er PCR wurden die Zelllysate bei 13000 upm für 1 min zentrifugiert und der Überstand für die Amplifikation eingesetzt.

3.2.24 LOH-Analyse

Die LOH-Analyse wurde am Mikrosatellitenmarker D13S284 durchgeführt. Die Bestimmung der Allelverteilung erfolgte über die Fragmentlängen-Analyse mittels PCR. Die PCR erfolgte wie bei Wieland et al. (2001) beschrieben. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte mit einem Formamid-Puffer (85 % Formamid, 0,1 % Dextranblau) verdünnt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte am Alfexpress (Amersham Pharmacia) mit der Fertiggelmatrix Highresolution (Amersham Pharmacia). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Allellink (Amersham Pharmacia).

3.2.25 Bestimmung des Methylierungsmusters mittels Bisulfitmodifizierung

Die Bisulfitmodifizierung von DNA erfolgte mit dem CpGenome DNA Modifikation Kit (Intergen).

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der spezifischen Umwandlung von nichtmethyliertem Cytosin in Uracil. Hingegen wird 5-Methylcytosin nicht verändert. Die Umwandlung erfolgt über zwei Schritte: erstens einer Sulfonisierung und Deaminierung der DNA sowie zweitens einer alkalischen Desulfonierung.

Material: 3 M NaOH (frisch hergestellt)

20 mM NaOH/90 % Ethanol 90 %, 70 % Ethanol Reagenzien des CpGenome DNA Modifikation Kit Lösung I: 0,227 g Reagenz I gelöst in 571 μl Ampuwa pH 5,0 (frisch hergestellt) Lösung II:1,35 g Reagenz II gelöst in 750 μl 70 μM β-Mercaptoethanol TE-Puffer

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 1 µg DNA in 100 µl Ampuwa gelöst und mit 7,0 µl 3 M NaOH für 10 min bei 50°C in einem Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße kurz abzentrifugiert und 550 µl der Lösung I zugegeben. Nach dem Mischen der Proben wurden diese bei 50°C für 16 h i nkubiert. Danach wurden 5 µl des Reagenz III und 750 µl der Lösung II zur Modifizierungsreaktion gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde die an das Reagenz III gebundene DNA für 15 sec bei 7000 upm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit je 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde nochmals bei 13000 upm für 2 min zentrifugiert, um das gesamte Ethanol zu entfernen. Als nächster Schritt erfolgte die Desulfonisierung durch Lösung des Pellets in 50 µl 20 mM NaOH/90 % Ethanol und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben erneut für 15 min bei 7000 upm abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 90 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet bis das gesamte Ethanol verdunstet war. Eluiert wurde die DNA mit 25 µl TE-Puffer für 15 min bei 50°C.

3.2.26 Kultivierung von Zelllinien in Anwesenheit von 5-Azacytidin

Material: 5-Azacytidin (0,5 mM in komplett RPMI 1640 Medium, sterilfiltriert; Sigma) komplettes RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES; 0532 g/l Glutamin (Biochrom) für Ansatz s. Kapitel 3.2.2

Das 5-Azacytidin inhibiert unter anderem die Methylierung von neu synthetisierter DNA während der Zellteilung. Durch diese Eigenschaft zeigt 5-Azacytidin allerdings auch einen zytostatischen Effekt. Daher müssen für den Wechsel des Methylierungsstatus niedrige Konzentrationen eingesetzt werden, bei denen die Zellen sich noch teilen können.

Zunächst erfolgte die Kultivierung der Zelllinien wie im Kapitel 3.2.2 beschrieben. Nach Erreichen einer genügenden Zelldichte wurde das Medium entfernt und durch 5 ml neues Medium ersetzt. In dieses Medium wurde das Volumen 5-Azacytidin zugegeben, um eine Endkonzentration von 1,0 (10 μ l) bzw. 5,0 μ M (50 μ l) zu erreichen. In den folgenden Tagen wurde das Medium jeden Tag gewechselt und die entsprechende Menge frisch hergestelltes 5-Azacytidin zugegeben. Die Zellen wurden 4 Tage mit 1,0 bzw. 5,0 μ M 5-Azacytidin kultiviert. Eine Kultuvierung der Zelllinien über 10 Tage war nur bei Anwesenheit von 1,0 μ M 5-Azacytidin möglich.

4. Ergebnisse

4.1 FISH-Analyse des Androgenrezeptor-Gens bei Patienten mit Prostatakarzinom

Für die FISH-Analyse des Androgenrezeptor-(AR)-Gens wurden aus den Zellen von paraffineingebetteten Prostatakarzinom-Gewebeschnitten die Zellkerne isoliert. Anhand dieser Prostatakarzinome sollte die Anzahl der Kopien des AR-Gens in Bezug auf das X-Chromosom mittels Interphase-FISH untersucht werden (Zweifarben-FISH). Dabei ist die Bestimmung der Anzahl von Signalen für das AR-Gen bzw. für das Zentromer des X-Chromosoms an den isolierten Zellkernen durchgeführt worden.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit Prostatektomie-Proben von 80 Patienten mit unbehandeltem Prostatakarzinom unterschiedlicher pathologischer Stadien untersucht. Diese Prostatektomie-Proben wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bereitgestellt. Die klinischen Daten zu den Patienten mit Prostatakarzinom wurden im Kapitel 2.6.1 beschrieben.

Zur Kontrolle der Ergebnisse der Zweifarben-FISH wurden die auffälligen Prostatakarzinome nochmals mit einem Sondenmix aus zentromerspezifischen Sonden für die Chromosomen X, Y und 18 untersucht (Dreifarben-FISH).

4.1.1 Interphase-FISH mit Sonden für das AR-Gen und einer zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom (Zweifarben-FISH)

4.1.1.1 Evaluierung der FISH-Sonden an Nichttumorgewebe von Prostatakarzinom-Patienten

Für die Evaluierung der eingesetzten FISH-Sonden wurden tumorfreie Bereiche der Prostata von Prostatakarzinom-Patienten genommen.

Von insgesamt 17 Patienten mit Prostatakarzinom konnten Zellkerne aus dem Nichttumor-Anteil für die Interphase-FISH-Analyse isoliert werden. Von allen 17 Nichttumorgeweben wurden FISH-Analysen mit den Sonden für das AR-Gen und das Zentromer des X-Chromosoms durchgeführt. Die Ergebnisse der Interphase-FISH sind für jedes untersuchte Nichttumorgewebe in Tabelle 1 im Anhang aufgelistet. Die Zusammenfassung der Ergebnisse für die einzelnen Sonden ist in Tabelle 4.1 angegeben.

Tabelle 4.1:	Zusammenfassung	der FISH	I-Ergebni	isse für	die eir	ngesetzte	AR-Gen-	bzw.	Х-
	zentromerspezifisch	e Sonde	(CEPX) o	der 17 u	ntersu	chten Nich	ttumorgev	vebe	а

Sonde	1 Signal	0 Signale	2 Signale	≥3 Signale	
	normal	auffällige Signalverteilung			
AR-Gen	90,5±3,6 %	2,1±1,6 %	6,5 ± 2,4 %	0,6±0,7 %	
	(82,0-95,5 %)	(0,0-5,0 %)	(2,5 – 10,5 %)	(0,0-2,0 %)	
CEPX	93,4±2,8 %	0,0 %	5,9 ± 2,3 %	0,4±0,6 %	
	(88,0 – 97,0 %)	(0,0 %)	(3,0 – 10,5 %)	(0,0 – 2,0 %)	

^a) Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung der analysierten Zellkerne von allen untersuchten Nichttumorgeweben. In Klammern der jeweilige Bereich.

Wurden die FISH-Ergebnisse der beiden Sonden zusammen betrachtet, ergaben sich folgende Signalmuster: Eine normale Signalverteilung mit je einem Signal für das X-Chromosom und einem Signal für das AR-Gen wurde in durchschnittlich 89,9 % aller analysierten Zellkerne (Standardabweichung 4,2 %) gefunden. Zusätzliche Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom wiesen durchschnittlich 5,7 % der ausgewerteten Zellkerne (Standardabweichung 1,9 %) auf. Der Anteil an Zellkernen mit zusätzlichen Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom reichte bei den untersuchten Nichttumorgeweben von 3,0 bis maximal 9,0 % der analysierten Kerne (siehe Tabelle 1 im Anhang).

Aus diesen FISH-Ergebnissen wurde der Cut-off-Wert für die Zweifarben-FISH der Prostatakarzinome auf 20 % der analysierten Zellkerne festgelegt. Diese Festlegung basierte auf der höchsten Anzahl auffälliger Zellkerne bei den untersuchten Nichttumorgeweben und der dritten Standardabweichung. FISH-Analysen mit mindestens 20 % der analysierten Kerne mit 2 oder mehr Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom wurden somit als auffällig bewertet.

4.1.1.2 Interphase-FISH an Prostatakarzinom-Gewebeproben

Die eingesetzte Zweifarben-FISH mit den Sonden für das AR-Gen und X-Zentromer war bei allen untersuchten 80 Prostatektomie-Proben erfolgreich. Von jedem Prostatakarzinom wurden mindestens 200 Zellkerne analysiert und die jeweiligen Signale für das AR-Gen und das X-Zentromer dokumentiert. Die einzelnen Ergebnisse der Zweifarben-FISH sind für jeden einzelnen Patienten mit Prostatakarzinom in Tabelle 2 (Anhang) aufgelistet worden. Bei 44 der 80 untersuchten Prostatakarzinome (55,0 %) wurden in weniger als 10% der analysierten Kerne 2 oder mehr Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom gefunden. 27 Prostatakarzinome (33,7 %) zeigten in 10 bis 20% der Kerne und 9 Prostatakarzinome (11,3 %) in mehr als 20% der untersuchten Zellkerne zusätzliche Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom. Bis zu vier Signale für das AR-Gen oder das X-Chromosom konnten bei den FISH-Analysen der Prostatakarzinome gefunden werden (Abbildung 4.1; Tabelle 2 im Anhang).



Abbildung 4.1: FISH-Analyse mit Sonden für das AR-Gen (rot) und mit der zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom (grün). a) normaler männlicher Zellkern: 1 Signal für das AR-Gen und das X-Chromosom. b-d) aberrante Signalmuster: b) 2 Signale für das AR-Gen und 1 Signal für das X-Chromosom. c) je 2 Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom. d) je 4 Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

Auf Grund der FISH-Analysen mit der zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom konnte in einer Subpopulation von Patienten mit Prostatakarzinom eine Polysomie des X-Chromosoms festgestellt werden. Da in den untersuchten Zellkernen mit 2 oder mehr Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom die einzelnen Signale für das AR-Gen und das Zentromer des X-Chromosoms in räumlicher Nähe lagen, konnte davon ausgegangen

werden, dass in diesen Zellen die zusätzlichen Kopien des X-Chromosoms auch das zusätzliche AR-Gen enthielten (Abbildung 4.1).

Die Anzahl auffälliger Zellkerne mit einer Polysomie des X-Chromosoms reichte bei den untersuchten Prostatakarzinomen von 1,0 bis 46,5 %. Durchschnittlich zeigten 11,8 % der analysierten Zellkerne zwei oder mehr Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom. Die Standardabweichung betrug dabei 9,3 %.

Bei 9 Patienten mit Prostatakarzinom wurden in mehr als 20 % der analysierten Kerne zusätzliche Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom festgestellt. Der Vergleich des untersuchten Tumorgewebes mit dem Nichttumorgewebe zeigte, dass diese Polysomie des X-Chromosoms auf den Tumoranteil der Prostata beschränkt war (Abbildung 4.2). Im Nichttumorgewebe dieser Patienten sank der Anteil der Zellkerne mit zusätzlichen X-Chromosomen auf 3 bis 9 % der analysierten Kerne ab. Das entspricht einem Abfall um 72 bis 92 % in Bezug auf die Anzahl auffälliger Zellkerne im Tumorgewebe.



 Abbildung 4.2: Vergleich der 9 auffälligen Prostatakarzinome mit den jeweiligen Nichttumorgeweben. Die Mittelwerte von allen 17 Tumor- bzw. Nichttumorgeweben sind in den letzten beiden Säulengruppen zusammengefasst. Tu: Tumorgewebe; NT: Nichttumorgewebe; je ■ 2 Signale, ■ 3 Signale und je ■ 4 Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom.

Neben diesen Zellkernen mit zusätzlichen Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom wurden noch andere auffällige Signalmuster in den Karzinomzellen gefunden (siehe Tabelle 2 im Anhang). Bei einigen Prostatakarzinomen konnte in bis zu 15,0 % der Zellkerne eine

zusätzliche Kopie des AR-Gens bei nur einem Signal für das Zentromer des X-Chromosoms gezeigt werden. Bei den 17 untersuchten Nichttumorgeweben wurden im Gegensatz dazu nur in bis zu 4,0 % der Zellkerne zwei Signale für das AR-Gen und ein Signal für das X-Chromosom gefunden (siehe Tabelle 1 im Anhang). Ein Verlust des AR-Gens konnte bei den Prostatakarzinom-Patienten in bis zu 12,0 % der analysierten Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung: 2,4 \pm 2,5 %) festgestellt werden. Bei den Nichttumorgeweben zeigten durchschnittlich 2,1 % (Standardabweichung 1,6 %) einen Verlust des AR-Gens (Tabelle 4.1). Maximal wurde bei den Nichttumorgeweben in bis zu 5,0 % der Zellkerne kein Signal für das AR-Gen gefunden.

4.1.2 Interphase-FISH mit zentromerspezifischen Sonden für die Chromosomen X, Y und 18 (Dreifarben-FISH)

Zur Kontrolle der FISH-Ergebnisse der Zweifarben-FISH wurden alle 9 auffälligen Prostatakarzinome mit zusätzlichen Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom bei mehr als 20 % der analysierten Zellkerne mit dem Mix aus zentromerspezifischen Sonden der Chromosomen X, Y und 18 (Dreifarben-FISH) überprüft. Dazu wurden noch weitere 8 Prostatakarzinome untersucht, die mit der Zweifarben-FISH in weniger als 20 % der Zellkerne zusätzliche Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom zeigten. Von allen 17 getesteten Prostatakarzinomen wurde auch das Nichttumorgewebe mit dieser Dreifarben-FISH analysiert.

Bei der Auswertung der FISH-Analysen wurde für jeden Zellkern das Signalmuster der einzelnen Sonden notiert, so dass für alle untersuchten Kerne das genaue Verhältnis der Signale ermittelt werden konnte. Dabei wurde eine Vielzahl von möglichen Signalmustern ermittelt (Abbildung 4.3). Zur besseren Übersicht wurden für jedes untersuchte Prostatakarzinom die Ergebnisse der Dreifarben-FISH einzeln für jede Sonde in Tabelle 3 im Anhang aufgelistet.



Abbildung 4.3 FISH-Analyse mit zentromerspezifischen Sonden für die Chromosomen X (grün), Y (rot) und 18 (aqua). a) normaler männlicher Zellkern, b) Zellkerne mit einem zusätzlichen X-Chromosom, c) tetraploide Zelle mit zwei X- und zwei Y-Chromosomen sowie vier Chromosomen 18, d) Zellkern mit zwei zusätzlichen X-Chromosomen. Zellkerne wurden gegengefärbt mit DAPI.

4.1.2.1 FISH-Analyse an Nichttumor-Zellkernen mit dem Dreifarben-Sondenmix

Wie für das AR-Gen und die zentromerspezifische Sonde für das X-Chromosom wurden auch für den Dreifarben-Sondenmix verschiedene Nichttumorzellen von Prostatakarzinom-Patienten getestet. Diese erste Analyse war wichtig, um die Fehlsignale der einzelnen Sonden in Bezug auf das untersuchte Prostatagewebe zu ermitteln.

Für die einzelnen getesteten Chromosomen wurden die Ergebnisse aller FISH-Analysen an den Nichttumorgeweben in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Die Ergebnisse der einzelnen untersuchten Nichttumorgewebe sind in Tabelle 3 (Anhang) mit den Ergebnissen der Tumorgewebe zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Verteilung der Signale mit den zentromerspezifischen Sonden für die Chromosomen X (CEPX-Sonde), Y (CEPY-Sonde) und 18 (CEP18-Sonde) bei den untersuchten Nichttumorgeweben^{a)}

Sonde	1 Signal	0 Signale	2 Signale	≥3 Signale	
	normal	auffällige Signalverteilung			
CEPX	93,6 ± 4,3 %	0,4 ± 0,8 %	4,8 ± 2,1 %	0,1 ± 0,3 %	
	(84,5 – 98,5 %)	(0,0 – 2,5 %)	(1,0 – 14,0 %)	(0,0 – 1,5 %)	
CEPY	90,0 ± 5,2 %	3,1 ± 2,1 %	6,0 ± 4,2 %	0,2 ± 0,6 %	
	(79,5 – 98,5 %)	(0,0 – 8,5 %)	(1,0 – 15,0 %)	(0,0-2,5 %)	
	2 Signale	1 Signal	3 Signale	≥4 Signale	
CEP18	89,6 ± 5,8 %	6,1 ± 5,0 %	1,8 ± 2,4 %	2,1 ± 1,9 %	
	(78,0 – 97,5 %)	(1,0-20,0 %)	(0,0 – 8,5 %)	(0,0-6,5 %)	

^a) Angegeben ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung der analysierten Zellkerne von allen untersuchten Nichttumorgeweben. In Klammern der jeweilige Bereich.

4.1.2.2 FISH-Analyse der Prostatakarzinome mit dem Dreifarben-Sondenmix

Bei allen 17 untersuchten Prostatakarzinomen war die FISH-Analyse mit dem Dreifarben-Sondenmix des Tumor-Gewebes erfolgreich.

Die FISH-Analysen mit der zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom des Dreifarben-Sondenmixes bestätigte das Ergebnis der Zweifarben-FISH für die 9 auffälligen Prostatakarzinome, die in mehr als 20 % der analysierten Zellkerne zusätzliche Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom zeigten. Die Anzahl der Signale für jede der drei Sonden ist in Tabelle 3 im Anhang aufgelistet und in Abbildung 4.4 dargestellt. Der Verlust eines Chromosoms X, Y oder 18 wurde nur selten im Tumorgewebe als auch im Nichttumorgewebe gesehen. Ein Verlust des X-Chromosoms wurde in durchschnittlich 1,7 % der analysierten Zellkerne im Tumorgewebe bzw. in 0,3 % der Zellen des Nichttumorgewebes gefunden. Das Y-Chromosom war im Tumorgewebe in 3,1 % der analysierten Zellen. Der Verlust eines Chromosoms 18 wurde in durchschnittlich 8,1 % der Zellen des Tumorgewebes festgestellt. Im Nichttumorgewebe zeigten durchschnittlich 5,8 % der Zellen nur ein Chromosom 18. Auffallend bei der Auswertung der FISH-Analysen war

das Prostatagewebe des Patienten 2. Dieser Patient zeigte in der Zweifarben-FISH keine Auffälligkeiten mit den Sonden für das AR-Gen und dem Zentromer des X-Chromosoms. Dieses Ergebnis wurde durch die Zentromersonde des X-Chromosoms der Dreifarben-FISH bestätigt. Allerdings wurde in vielen Zellen ein Verlust des Y-Chromosoms und eines Chromosoms 18 festgestellt. In 20,0 % der analysierten Zellkerne des Tumorgewebes konnte kein Y-Chromosom dargestellt werden, dagegen in nur 8,0 % der Zellen des Nichttumorgewebes. Ein Chromosom 18 ging in 41,0 % der analysierten Tumorzellen verloren. Das Nichttumorgewebe zeigte eine Monosomie des Chromosoms 18 in 20,0 % der analysierten Zellkerne.

Die am häufigsten gefundenen Signalmuster aller drei Sonden wurden in Abbildung 4.5 graphisch dargestellt. Ein zusätzliches Signal für das X-Chromosom, bei sonst normalem Signalmuster für die Chromosomen Y und 18, wurde in 1,0 bis 13,0 % der analysierten Zellkerne im Tumorgewebe gefunden. Das Nichttumorgewebe zeigte in bis zu 3,5 % der Zellkerne dieses Signalmuster. Dagegen waren in den untersuchten Prostatakarzinomen nur selten zusätzliche Y-Chromosomen (Mittelwert 1,8 %; Bereich 0 bis 6,0 %) bzw. zusätzliche Chromosomen 18 (Mittelwert 1,0 %; Bereich 0 bis 3,5 %) bei Anwesenheit von nur einem X-Chromosom zu finden. Dabei waren keine Unterschiede zum Nichttumorgewebe in Bezug auf den Mittelwert und den Bereich sichtbar.

Ein tetraploides Signalmuster (2 Signale für das X- und das Y-Chromosom und vier Signale für das Chromosom 18) wurde in durchschnittlich 8,3 % (Bereich von 0 bis 19,5 %) der analysierten Zellkerne gefunden. Das Nichttumorgewebe zeigte in durchschnittlich 1,9 % (Bereich von 0 bis 5,5 %) der Zellkerne dieses Signalmuster. Tetraploidie wurde bei 6 der 17 analysierten Prostatakarzinome (35,0 %) in mehr als 10 % der analysierten Zellkerne gefunden. Fünf der sechs Prostatakarzinome mit einer Tetraploidie waren in der Zweifarben-FISH mit der Sonde für das AR-Gen und der X-Zentromerprobe auffällig. Diese 5 Prostatakarzinome zeigten in 10,5 bis 19,5 % der analysierten Zellkerne das tetraploide Signalmuster. Das Nichttumorgewebe dieser 5 Patienten zeigte in 0,5 bis 3,5 % tetraploide Zellkerne. Unter den Kernen mit zwei X-Chromosomen waren 13,0 bis 50,0 % der Zellen tetraploid.

In den restlichen Zellkernen mit zwei X-Chromosomen, zeigten die Chromosomen Y und 18 vorwiegend I) ein Chromosom Y bzw. 18, II) zwei Chromosomen Y bzw. 18 oder III) ein Y-Chromosom und vier Chromosomen 18. Kerne mit drei X-Chromosomen wurden bei 11 der 17 Prostatakarzinome gefunden, die mit dem Sondenmix untersucht worden sind. Im Nichttumorgewebe waren nur bei 2 Patienten in sehr wenigen Kernen drei X-Chromosomen zu finden.



 Abbildung 4.5: Häufige FISH-Ergebnisse mit dem Sondenmix für die Zentromere der Chromosomen X, Y und 18, die bei den 9 auffälligen Patienten gefunden wurden. Die beiden letzten Säulengruppen bilden den Mittelwert aller 17 analysierten Prostatakarzinome. X: X-Chromosom; Y: Y-Chromosom; 18: Chromosom 18; Tu: Tumorgewebe; NT: Nichttumorgewebe.

In einem Fall konnte das Ergebnis der ersten FISH-Analyse nicht mit dem Sondenmix bestätigt werden. Das Karzinomgewebe dieses Patienten zeigte in 19,5% der Kerne zwei oder mehr Signale für das X-Chromosom. Dagegen wiesen nur 11,5% der Zellkerne zusätzliche Signale für das X-Chromosom mit der Zweifarben-FISH auf.

Abbildung 4.4: Vergleich des Tumor- und des Nichttumorgewebes der 9 Prostatakarzinom-Patienten mit auffälligem Signalmuster in der Zweifarben-FISH. Die beiden letzten Säulengruppen bilden den Mittelwert aller 17 analysierten Prostatakarzinome. der **FISH-Analyse** mit a) Ergebnis der zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom; b) FISH-Analyse mit der zentromerspezifischen Sonde für das Y-Chromosom; c) FISH-Analyse der zentromerspezifischen Sonde für das Chromosom 18.



4.2 Molekulare Charakterisierung des DICE1-Gens

Das DICE1-Gen ist in der LOH- (*loss of heterozygosity*)-kritischen Chromosomenregion 13q14.3 lokalisiert (Wieland et al., 1999; Wieland et al., 2001). Die DICE1-mRNA wird beim Menschen in Herz, Lunge, Leber, Gehirn, Niere, Plazenta, Prostata und Skelettmuskulatur exprimiert. Dabei konnte in einigen Lungentumoren eine verminderte DICE1-Expression festgestellt werden (Wieland et al., 1999). Dies unterstützte die Vermutung, dass das DICE1-Gen als ein Tumorsuppressor-Gen wirkt und somit in die Tumorgenese eingreift (Wieland et al., 2004). Um diese verminderte Expression erklären zu können, wurde der Promotor des DICE1-Gens identifiziert und nach differenten Methylierungsmustern untersucht.

Bei Patienten mit Prostatakarzinom wird ebenfalls häufig eine LOH in der kritischen Chromosomenregion 13q14 gefunden. Dabei wurde die höchste LOH-Rate mit dem Mikrosatellitenmarker D13S284 beobachtet, der mit dem DICE1-Gen kolokalisiert (Wieland et al., 2001; Yin et al., 2001).

4.2.1 Sequenz-Analyse der DNA-Sequenz im 5'-Bereich des DICE1-Gens

Durch Sequenzvergleiche der DICE1-mRNA mit Genbank-Datenbasen konnte die DNA-Sequenz mit der Genbank Accession No. AL354820.4 auf dem menschlichen Chromosom 13 identifiziert werden. Diese DNA-Sequenz enthält die ersten Exons des DICE1-Gens und die vor dem Transkriptionsstartpunkt liegende DNA-Sequenz von 2289bp. Da die Sequenz AL354820.4 nur eine Entwurfsfassung war, musste sie mittels Sequenzierung überprüft werden. Insgesamt wurden durch die Sequenzierung des DNA-Bereiches vor dem DICE1-Gen 844 Basenpaare (bp) überprüft. Dabei wurde überwiegend eine Übereinstimmung mit der Datenbanksequenz AL354820.4 gefunden.

Bei der Analyse der Sequenzdaten wurde eine 13-bp-Deletion (CGCGCCGGGGCGG) im Bereich –618 bis –630 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt festgestellt (siehe Abbildung 4.6). Der Bereich dieser 13-bp-Deletion zeigt einerseits einen sehr hohen Anteil an C- und G-Nukleotiden. Andererseits liegt in diesem Bereich eine Repeatstruktur (CGCGCCGGGGGGGG)₂ vor. Durch die Deletion kam es zu einem Verlust der Wiederholung (siehe Abbildung 4.6). Weiterhin wurde in zwei Fällen die Substitution eines Cytosins zu einem Thymidin festgestellt. Die eine Substituion wurde 306 bp und die andere 534 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt gefunden.

Auffallend bei der Auswertung der Sequenzierungen und der Datenbanksequenz war ein hoher Anteil von G- und C-Nukleotiden und viele CpG-Dinukleotide im unmittelbaren 5'-Bereich vor dem Transkriptionsstartpunkt.

Die DNA-Sequenz unmittelbar vor dem DICE1-Gen wurde mittels des "Promoter Search Program" des Sanger Centers (www.genomic.sanger.ac.uk) nach möglichen Promotorsequenzen durchsucht. Insgesamt wurde eine DNA-Sequenz von 1020 Nukleotiden, davon 985 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt, in das Computerprogramm eingegeben. Durch dieses Programm konnten in dem untersuchten DNA-Bereich zwei Promotoren vorhergesagt werden. Promotor 1 wurde in dem Sequenzbereich von -456 bis -161 bp und Promotor 2 im Bereich -804 bis -604 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt lokalisiert (Abbildung 4.6). Der Promotor 1 beinhaltet eine vorhergesagte TATA box, die 175 bp vor dem cDNA-Startpunkt des DICE1-Gens liegt. Der Enhancer wurde in dem Bereich von -375 bis -85 vor dem Transkriptionsstartpunkt identifiziert.

GTCCAACTCC CACCTCTCGT GGCTCCCCCG AGGCCGAGCG AGGCTCCGTG CGAGGACAGC -804 -744 CCCTCAACCG CACTCCCCAG AGGGAGCGCT GGGACTCGCG GAGGAGATTA GTCCCCGGTC -684 ATAAACAACC TCTCACTTCC CCTCCCCCGC CCGCGCCCGC TCGCGCCGGG GCGGCGCCC GGGGCGGCCC TCCGAGGCCC AGGAACCTCC TCCGGCGCCC GCGAGGCCCC GAGTCCTCCT -624 -564 CCGGAGGGCG GCTGCGGGCC TGCCCTCTTC TCCTAACCAG GTGTTTGTCC ACTTTACTCA -504 ACCCTTCTTA CTCGTCCACG CTACGGCCAC CTCACAGGGG CGGCTGACGC CAGCCCCTTT TTCCCTCCCC TCGACCCCTA TCACCTCCAA CAGCCAAGGA GAGGCCGGCG GCCCTGACGC -444 -384 GCAGGCTCAC CGCCGCGGCC GCCCGCGCG CGCGGACGCG GCCCCGCCC CCACCTCGCG -324 GTCCTTCCGC AGTCCGGCCC CGCCCCTTCC CGAAGCCCGC CTCCGGGTCG GCCCGCCCGC -264 CCGCTCGCGC GCACCCGACG CCCCGCCTCT GCGCGTGCTC AATAACTGTC CCCGGAGCCG -204 GCCTACAAGC TTCCCCCGCC CCTGAGCTCT TTAAATATGC TAATGAAAGG ATAGGGCCTG -144 ACCAGTAGAA CGGCGAGGCG GTGTATCACG TGGCTCGGGG ACGTGTCAGG GGCGGAGCCT CCGCAGCCCC TGCCCGAGTT AAAACCGGAG TGTGAGAGAG AAAAGCGCTT CAGTAGCGAG -84 -24 AGGGGCTGAG AAAGTGGTGA CACCGCCGGG GTGCGGAGGG AGTCCCTGAA ACTTCTCCCA

Abbildung 4.6: Die DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen. Die vorhergesagten Promotor-Regionen durch das "Promoter Search Program": Promotor 1 hervorgehoben durch rote Buchstaben und Promotor 2 durch grüne Buchstaben. Die 13-bp-Deletion ist durch einen schwarzen Rahmen markiert. Die vorhergesagte TATA-Box des Promotors 1 ist grau markiert. Der Transkriptionsstartpunkt ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

Durch das Computerprogramm "Transcription Element Search Program" (TESS; www.cbil.upem.edu) konnte in der analysierten DNA-Sequenz eine Vielzahl von spezifischen Bindungssequenzen von Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Bei dieser Analyse wurde eine Häufung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Bereich von -80 bis -400 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt festgestellt. In den vorhergesagten Promotorsequenzen des DICE1-Gens wurden Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SP1, AP1, NF1, GATA1, Oct, EGR2, CBF1, ETF, Isl-1, CP-1 und GFII identifiziert (Abbildung 4.7).

Ebenfalls konnte in dem untersuchten DNA-Bereich eine Vielzahl an Schnittstellen methylsensitiver Restriktionsenzyme erkannt werden. Methylsensitive Restriktionsenzyme
erkennen eine spezifische DNA-Sequenz mit einem CpG-Dinukleotid. Ist das Cytosin dieses Dinukleotids nicht methyliert, kann das methylsensitive Restriktionsenzym die DNA spalten. Wie bei den Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wurde für die methylsensitiven Restriktionsenzyme eine Häufung von Schnittstellen im Bereich von 100 bis 300 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt festgestellt (Abbildung 4.7).

-427	<u>ctatca</u> cctc GATA1	caac <u>agccaa</u> NF -1	ggagaggccg Nae	gcggccctga I	cgcgcaggct	caccgccgcg SacII
-367	g <u>ccgccc</u> cgc SP1	gcgcgcggac	gcggcccccg EGR2	<u>ccccc</u> acctc AP1	gcggtccttc	cgcagtcc <u>gg</u>
-307	<u>ccccgcccc</u> t <u>SP1</u> EGR2	tcccgaagcc	cgcctccggg NciI	tcg <u>gcccgcc</u> SP1	_cgcccgctcg	cgcgcacccg
-247	acgccccgcc SP1 BsaHI	<u>tc</u> tgcgcgtg	ctcaataact	gtccccggag Ncil M	ccggcctaca NaeI	agcttccccc <u>Aci</u> I
-187	gcccctgagc	tgtttaaata 	tgctaatgaa Isl-1 Oct4A Oct4B Oct1	aggatagggc	ctgaccagta	gaacggcgag —
-127	gcggtgt <u>atc</u> SP1 <u>(</u> PmlI (<u>acgtg</u> gctcg <u>CBF1</u> GFII	gggacg tgtc	agggggcggag SP1 ETF CP-1	_cctccgcagc	c <u>cctgcc</u> cga SP1

- -67 gttaaaaccg gagtgtgaga gagaaaagcg cttcagtagc gagagggggct gagaaagtgg HpaII CfoI
- -7 tgacacdgcc ggggtgcgga gggagtccct gaaacttctc ccaacagccc cagggccaat
- Abbildung 4.7: DNA-Sequenz des vorhergesagten Promotors 1 mit einer Auswahl von Transkriptionsfaktor-Bindestellen (unterstrichen) und Schnittstellen methylsensitiver Restriktionsenzyme (fett geschrieben). Der DICE1-Transkriptionsstartpunkt ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

4.2.2 Analyse der CpG-Inseln in der DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen

Die DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen zeigt einen hohen Anteil an G- und C-Nukleotiden (Abbildung 4.5). Die DNA-Sequenz von 804 bp, in der die beiden Promotorsequenzen durch das Computerprogramm erkannt werden konnten, wurde näher auf den GC-Gehalt und auf CpG-Inseln untersucht. Die Identifizierung der CpG-Inseln erfolgte nach Gardiner-Garden und Frommer (1987). Eine CpG-Insel wurde definiert als eine DNA-Region größer 200 bp, die einen mittleren Gehalt an G- und C-Nukleotiden über 50 % und ein Verhältnis von beobachteten gegen statistisch erwarteten CpG-Dinukleotiden größer als 0,6 zeigt (Gardiner-Garden und Frommer, 1987).

Bei der Anwendung dieser Definition nach Gardiner-Garden und Frommer wurde eine DNA-Region von 681 bp ermittelt, die einen Durchschnitt an G- und C-Nukleotiden von 70 % und ein Verhältnis von beobachteten gegen statistisch erwarteten CpG-Dinukleotiden größer 0,8 zeigt (Abbildung 4.8).



Abbildung 4.8: Analyse der CpG-Inseln und des G- und C-Nukleotidgehalts in der DNA-Sequenz des DICE1-Gens. Der Nukleotid-spezifische Durchschnitt von Gund C-Nukleotiden (graue Linie) und das Verhältnis von ermittelten gegen statistisch erwarteten (Obs vs. Exp) CpG-Dinukleotiden (schwarze Linie) wurden errechnet nach Gardiner-Garden und Frommer (1987). Die Angabe der Nukleotid-Position erfolgte in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt, der mit +1 angegeben ist.

4.2.3 Verteilung der 13-bp-Deletion im DICE1-Promotor in der Normalbevölkerung

Bei der Überprüfung des DICE1-Promotors ist im Bereich des vorhergesagten Promotors 2 eine 13-bp-Deletion gefunden worden (s. Kapitel 4.2.1). Definitionsgemäß wird von einem Polymorphismus gesprochen, wenn eine allelische Variante in einer Häufigkeit von mindestens 1 % in einer Population vorkommt (Passarge, 1994).

Zur Ermittlung der Häufigkeit der 13-bp-Deletion im DICE1-Promotor wurden 201 nichtverwandte Personen (100 weibliche und 101 männliche Kontrollpersonen) mittels Fragmentlängen-Analyse hinsichtlich der Allelverteilung untersucht (siehe Tabelle 4.3). Dabei wurden die Sequenz der Genbank-Nr. AL354820.4 als Wildtyp-Allel und die mutierte DNA-Sequenz als 13-bp-Deletions-Allel bezeichnet.

Kontrollpersonen	Anzahl Personen	homozygot Wildtyp	Wildtyp / 13 bp Deletion	homozygot 13 bp Deletion	P-Wert ^b
weibliche	100	71 (71,0 %)	27 (27,0 %)	2 (2,0 %)	0,211
männliche	101	65 (64,3 %)	29 (28,7 %)	7 (6,9 %)	
alle	201	136 (67,7 %)	56 (27,9 %)	9 (4,5 %)	

Tabelle 4.3: Verteilung der 13 bp Deletion in der Normalbevölkerung ^a

^a) Angegeben sind jeweils der absolute und der prozentuale Wert.

^b) Chi-Quadrat-Test

In dem untersuchten Kollektiv war das Allel mit der Deletion bei den weiblichen Kontrollpersonen weniger anzutreffen als bei den männlichen. Jedoch konnte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (P = 0,211) keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

Aus der Verteilung der beiden Allele wurde der Polymorphismus-Informationsgehalt (*polymorphism information content*, PIC) berechnet. Polymorphismen mit einem hohen PIC-Wert können als sogenannte DNA-Marker, z.B. bei Kopplungsanalysen zur Lokalisierung eines defekten Gens, eingesetzt werden. Bei einem Diallelpolymorphismus kann jedoch der PIC-Wert niemals höher als 37,5 % sein. Für das gesamte Kontrollkollektiv wurde ein PIC-Wert von 25,0 % berechnet (für die weiblichen Kontrollpersonen 23,0 % und für die männlichen 28,0 %). Diese PIC-Werte sprechen eher für einen geringen Informationsgehalt des Polymorphismus. Bei Polymorphismen mit hohem Informationsgehalt, wie z.B. dem DNA-Marker D13S284, der ebenfalls mit dem DICE1-Gen kolokalisiert, liegen beide Allele mit gleicher Häufigkeit vor, d.h. der PIC-Wert geht gegen den maximalen Wert von 37,5 % (Strachan und Read, 1996).

4.2.4 Funktionelle Charakterisierung des DICE1-Promotors

Die funktionelle Überprüfung des vorhergesagten DICE1-Promotors erfolgte in zwei verschiedenen Experimenten.

- Die mögliche Promotorsequenz wurde in einen promotorlosen β-Galaktosidase-Expressionsvektor kloniert, der dann in die COS-7 Zelllinie transfektiert wurde. Im Anschluß wurde die Aktivität der β-Galaktosidase ermittelt und damit ein Rückschluß auf die Promotoreigenschaften der eingefügten DNA-Sequenz ermöglicht. Durch Deletionen dieser klonierten Sequenz konnte der mögliche Promotorbereich weiter eingegrenzt werden.
- 2. Im zweiten Experiment wurde ein Teil der in Frage kommenden Promotorregion mit Kernproteinen von HeLa-Zellen untersucht. Dieser Protein-Mix ist reich an Transkriptionsfaktoren. Können diese Transkriptionsfaktoren binden, ist dies ein Beweis für das Vorliegen von Transkriptionsfaktor-Bindestellen in der eingesetzten DNA-Sequenz. Diese Bindestellen werden besonders häufig in Promotorregionen gefunden, da Transkriptionsfaktoren die Transkription der DNA regulieren.

4.2.4.1 Herstellung der β-Galaktosidase-Konstrukte für die Promotoranalyse

Für die Analyse der Promotoraktivität wurden die 800 bp der 5'-DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen in 8 überlappende Bereiche unterteilt (s. Abbildung 4.9). Diese 800 bp beinhalten die zwei Promotoren, die mittels eines Computerprogramms vorhergesagt wurden.



Abbildung 4.9: β-Galaktosidase-Konstrukte für die Analyse der Promotoraktivität der 5´-DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen. Weißer Balken: DNA-Fragment des vorhergesagten Promotors. Schwarzer Balken: β-Galaktosidase-Gen. Die Nukleotidpositionen wurden über den Konstrukten angegeben, in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt (Position +1). Für die funktionelle Überprüfung der vorhergesagten Promotorbereiche wurden Oligonukleotid-Paare bestimmt, die spezifische 5'-Bereiche vor dem DICE1-Gen amplifizieren. Die Oligonukleotide (Primer) für die entsprechenden Konstrukte sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Tabelle 4.4: Primersequenzen und Primerpositionen der Konstrukte für die Bestimmung der Promotoraktivität des DICE1-Promotors.

DICE1- Fragment	forward Primer Sequenz	reverse Primer Sequenz	Position im 5 ⁻ Bereich des DICE1-Gens in bp ^a	Annealing- Temperatur in ℃
DICE1Prom1	TCCAACTCCCACCTCTCGTG	GGGGCTGTTGGGGAGAAGTTTCAG	-804 - +42	60°C
DICE1Prom2	TCCAACTCCCACCTCTCGTG	GCCTCTCCTTGGCTGTTGG	-804401	60°C
DICE1Prom3	ТСССССССТСАТАААСААССТС	GTGGACAAACACCTGGTTAGGAG	-694514	59°C
DICE1Prom4	CACCTCCAACAGCCAAGGAG	ACCGCCTCGCCGTTCTAC	-425124	60°C
DICE1Prom5	CACCTCCAACAGCCAAGGAG	GGGGCTGTTGGGGAGAAGTTTCAG	-425 - +42	60°C
DICE1Prom6	CTCTGCGCGTGCTCAATAAC	GGGGCTGTTGGGGAGAAGTTTCAG	-239 - +42	59°C
DICE1Prom7	CTCTGCGCGTGCTCAATAAC	ACCGCCTCGCCGTTCTAC	-239124	59°C
DICE1Prom8	GGAGTGTGAGAGAGAAAAGC	GGGGCTGTTGGGGAGAAGTTTCAG	-62 - +42	℃ 00

^a) Angegeben sind die Sequenzpositionen der forward bzw. reverse Primer in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt, der mit +1 definiert wurde.

Da die DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen einen sehr hohen Anteil an G- und C-Nukleotiden zeigte, war die Amplifikation der entsprechenden Sequenzbereiche schwierig. Umgangen wurde dieses Problem durch den Einsatz von c7dGTP (7-Deaza-2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat) und einer Hot-Start-Taq-DNA-Polymerase mit dem zugehörigen PCR-Puffer sowie der Q-Solution der Firma Qiagen. Mit den Primerpaaren aus Tabelle 4.6 wurde eine PCR-Amplifikation mit den folgenden Bestandteilen durchgeführt:

50 ng DNA (männliche Kontroll-DNA) 1x PCR-Puffer inkl. 1,5 mM MgCl₂ (Qiagen) 5 pmol forward Primer 5 pmol reverse Primer 0,2 mM dNTP-Mix mit c7dGTP 1x Q-Solution (Qiagen) 0,5 U HotStarTaq-Polymerase (Qiagen) ad 20 μl H₂O Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 4. Denaturierung zu Beginn der Reaktion für 15 min bei 95℃
- 5. 35 Zyklen mit jeweils:

Denaturierung	60 sec bei 95℃
Annealing	60 sec (Annealing-Temperaturen s. Tabelle 4.6)
Elongation	60 sec bei 72℃

- 6. Abschließende Elongation der DNA-Stränge für 10 min bei 72°C
- 7. Abkühlung der Ansätze auf 20℃

Im Anschluß wurden die PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarosegel überprüft. Wenn die Größe der PCR-Produkte den Erwartungen entsprach, wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die amplifizierte DNA aus den Agarosegelblöckchen isoliert.

Diese gereinigten PCR-Produkte wurden in den promotorlosen Expressionsvektor pBlue-TOPO kloniert. Anschließend wurden XLI-Blue *E. coli*-Bakterien mit diesen Konstrukten transformiert und die richtige Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

4.2.4.2 β-Galaktosidase-Nachweis zur funktionellen Überprüfung der fraglichen Promotorregion

Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität als Maß für die Promotoreigenschaften der hergestellten β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte erfolgte in COS-7-Zellen. Dabei erfolgte das experimentelle Vorgehen zur Ermittlung der ß-Galaktosidase-Expression nach folgendem Muster:

- 1. Transfektion der COS-7-Zellen mit den β-Galaktosidase-Expressions-Konstrukten
- 2. Isolierung der COS-7-Zellen und Lyse
- 3. Experimentelle Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität
- 4. Berechnung der β-Galaktosidase-Aktivität und Abgleich mit der Gesamtproteinmenge.

Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde durch die katalytische Eigenschaft des Enzyms bei der Hydrolyse von ortho-Nitrophenyl- β -Galaktopyranosid zu ortho-Nitrophenyl ermittelt. Dies erfolgte durch Messung der Absorption bei 420 nm. Die Berechnung der β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge des Lysats der COS-7-Zellen.

Jede Transfektion eines Plasmids erfolgte in zweifacher Ausführung und wurde mindestens einmal wiederholt. Die einzelnen Messwerte von jeder Transfektion sind in Tabelle 4 im Anhang aufgelistet. Von jedem berechneten Aktivitätswert wurde die Hintergrundaktivität nichttransfektierter COS-7-Zellen abgezogen. Normalisiert wurden diese spezifischen Aktivitätswerte mit der β-Galaktosidase-Aktivität des frühen SV40-Promotors, die daher bei jedem Experiment ermittelt werden musste. Zusammengefasst wurden die berechneten relativen Aktivitätswerte in Tabelle 4.5 und Abbildung 4.10.

Konstrukte ^a	rel	relative Aktivität der Konstrukte ^b				
DICE1Prom1	125,0 %	127,0 %	126,0 %	129,0 %	121,0 %	125,6 ± 3,0 %
DICE1Prom2	0,0 %	0,0 %				0,0 ± 0,0 %
DICE1Prom3	0,0 %	3,0 %				1,5 ± 2,1 %
DICE1Prom4	14,0 %	9,4 %	9,7 %			11,0 ± 2,6 %
DICE1Prom5	50,0 %	56,0 %	53,5 %			53,2 ± 3,0 %
DICE1Prom6	80,0 %	86,0 %	81,0 %	84,0 %		82,8± 2,8 %
DICE1Prom7	1,0 %	2,0 %				1,5 ± 0,7 %
DICE1Prom8	1,0 %	0,0 %				0,5 ± 0,7 %
SV40-Kontrolle	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %

Tabelle 4.5: Relative Aktivität der β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte

- ^a) Bezeichnung der β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte nach den DICE1-Fragmenten in Tabelle 4.4
- ^b) angegeben sind die relativen Aktivitätswerte, abgeglichen mit der jeweiligen β-Galaktosidase-Aktivität des SV40-Expressionskonstruktes (100%)
- ^{c)} Mittelwert ± Standardabweichung



Abbildung 4.10: Relative β-Galaktosidase-Aktivität der Promotorkonstrukte. Abgeglichen wurden die ermittelten Werte der β-Galaktosidase mit der jeweiligen Aktivität des SV40-Expressionskonstruktes.

Aus diesen Werten ergibt sich, dass in den drei untersuchten Sequenzbereichen DICE1Prom1, DICE1Prom5 und DICE1Prom6 eine Promotoraktivität von über 50 % gefunden wurde. Die höchste Promotoraktivität von 125,6 % in Bezug auf die Promotoraktivität des frühen SV40-Promotors ist in dem Fragment DICE1Prom1 gefunden worden, welches die gesamten 804 bp vor dem DICE1-cDNA-Startpunkt beinhaltet. Dieses Fragment enthält somit die vorhergesagten Promotoren 1 und 2 (siehe Abbildung 4.6).

4.2.4.3 Einfluss der Methylierung des DICE1-Promotors auf die Promotor-Aktivität

Um den Einfluss einer Methylierung des DICE1-Promotors auf die Promotor-Aktivität zu die β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte DICE1Prom1 untersuchen, wurden und DICE1Prom6 in vitro mit der Sssl-Methylase methyliert. Die in-vitro-Methylierung des DICE1Prom1-Fragmentes, welches die 804 bp DNA-Sequenz dem vor Transkriptionsstartpunkt beinhaltet, führte zu einer Verminderung der Promotor-Aktivität um 96 % in den COS-7-Zellen. Nach der Methylierung des DICE1Prom6-Fragmentes, welches einen Teil der DNA-Sequenz des vorhergesagten Promotors 1 kodiert, war keine β-Galaktosidase-Aktivität mehr messbar (siehe Tabelle 4.6; Abbildung 4.11). Die einzelnen Werte für die Berechnung der
ß-Galaktosidase-Aktivität sind in Tabelle 4 im Anhang aufgelistet.

Um darzustellen, dass die Verminderung der Promotor-Aktivität nicht durch die Methylierung der gesamten β -Galaktosidase-Expressionskonstrukte entstand, wurde ebenfalls das Kontrollkonstrukt mit dem frühen SV40-Promotor methyliert. Die *in-vitro*-Methylierung dieses Konstruktes führte zu einer Verminderung der β -Galaktosidase-Aktivität um 19 %. Die Ergebnisse der Methylierung des Kontrollkonstruktes mit dem frühen SV40-Promotor demonstrierten, dass die Verminderung der β -Galaktosidase-Aktivität in den methylierten DICE1- β -Galaktosidase-Expressionskonstrukten nicht auf eine Methylierung von anderen Sequenzabschnitten des pBlue-TOPO Vektors zurückgeführt werden kann.

Konstrukte ^a	relative Aktivität	Mittelwert ^c	
DICE1Prom1	127,0 %	126,0 %	126,5 ± 3,0 %
DICE1Prom1 methyl.	4,9 %	4,8 %	4,9 ± 0,1 %
DICE1Prom6	81,0 %	84,0 %	82,5 ± 2,8 %
DICE1Prom6 methyl.	0,0 %	0,0 %	0,0 ± 0,0%
SV40	100,0 %	100,0 %	100,0 %
SV40 methyl.	80,1 %	81,9 %	81,0 ± 1,3 %

Tabelle 4.6: Relative Aktivität der in vitro methylierten Promotorkonstrukte

- ^a) Bezeichnung der β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte nach Tabelle 4.6
- ^b) Angegeben sind die relativen Aktivitätswerte, abgeglichen mit der jeweiligen β-Galaktosidase-Aktivität des SV40-Kontrollpromotorkonstruktes.
- ^c) Mittelwert ± Standardabweichung



Abbildung 4.11: Einfluss der *in-vitro*-Methylierung der β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte auf die Promotoraktivität. Abgeglichen wurde die ermittelte β-Galaktosidase-Aktivität mit der Aktivität des SV40-Expressionskonstruktes.

4.2.4.4 Einfluss der 13-bp-Deletion auf die DICE1-Promotoraktivität

Bei der Überprüfung der DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen wurde eine 13-bp-Deletion an der Position -619 bp vor dem cDNA-Startpunkt festgestellt. Diese 13-bp-Deletion wurde ebenfalls auf eine mögliche Veränderung der Promotoraktivität getestet.

Das Promotorfragment DICE1Prom1 wurde mit der 13-bp-Deletion hergestellt und die β -Galaktosidase-Aktivität mit der Wildtypsequenz verglichen. Die Ergebnisse der

Aktivitätsmessungen sind in Tabelle 4 im Anhang aufgelistet und in Tabelle 4.7 und Abbildung 4.12 zusammengefasst.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich für das DICE1Prom1-Fragment mit der 13-bp-Deletion eine relative β -Galaktosidase-Aktivität von 111,5 % im Gegensatz zur β -Galaktosidase-Aktivität der normalen DNA-Sequenz von 125,0 %. Dies zeigt, dass in COS-7-Zellen die 13-bp-Deletion zu einer um 10,8 % verminderten β -Galaktosidase-Aktivität führt.

Tabelle 4.7: Einfluss der 13-bp-Deletion im DICE1-Promotor auf die β-Galaktosidase-Aktivität

Konstrukte ^a	relative Aktivität	Mittelwert	
DICE1Prom1	129,0 %	121,0 %	125,0 ± 5,7 %
DICE1Prom1 13bp-Del	114,0 %	109,0 %	111,5 ± 3,5 %

- ^a) Bezeichnung der β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte nach Tabelle 4.4
- ^b) angegeben sind die Aktivitätswerte, abgeglichen mit der jeweiligen β-Galaktosidase-Aktivität des SV40-Kontrollpromotorkonstruktes (100 %).
- ^c) Mittelwert ± Standardabweichung



Abbildung 4.12: Einfluss der 13-bp-Deletion auf die Promotoraktivität des DICE1Prom1-Konstruktes, abgeglichen mit der jeweiligen β-Galaktosidase-Aktivität des SV40-Expressionskonstruktes (100%).

4.2.4.5 Methylierungsstatus ausgewählter CpG-Dinukleotide des DICE1-Promotors

Anhand verschiedener Zelllinien mit unterschiedlicher DICE1-Expression (Wieland et al., 1999) wurden zur weiteren Charakterisierung des Promotors ausgewählte CpG-Stellen des DICE1-Promotors hinsichtlich ihres Methylierungsstatus verglichen, um zu erkennen, ob Methylierungen des DICE1-Promotors der Grund für die verminderte Expression sein könnten. Dazu wurde DNA von vier nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien (Calu3, SK-MES1, SK-LC12 und SW-900), sowie von zwei primären Lungenkarzinomen (P4 und P2) und einem normalen Lungengewebe (P17) mit methylsensitiven Restriktionsenzymen

gespalten und der Methylierungsstatus verglichen. Methylsensitive Restriktionsenzyme erkennen die entsprechende Schnittstelle nur, wenn die CpG-Dinukleotide nicht methyliert sind, und spalten dann die spezifische Erkennungssequenz.

Diese Analyse bestand aus den folgenden Experimenten:

- 1. Spaltung der DNA mit methylsensitiven Enzymen
- 2. PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für den DICE1-Promotor
- 3. Transfer der PCR-Produkte auf eine Nylon-Membran (Southern-Blot)
- 4. Nachweis der PCR-Produkte mittels digoxygeninmarkierter Sonden

Bei der PCR konnten nur die DNA-Stränge amplifiziert werden, die nicht gespalten wurden. Ein PCR-Produkt war daher nur bei methylierter Restriktionsschnittstelle zu erwarten. Die Primer für die PCR sind in Tabelle 4.8 aufgelistet.

Tabelle 4.8: Primersequenzen für die PCR zum Nachweis des Methylierungsstatus

	forward Primer	reverse Primer	Annealing- Temperatur
PCR1	CACCTCCAACAGCCAAGGAG	ACCGCCTCGCCGTTCTAC	℃ 00
PCR2	CTCTGCGCGTGCTCAATAAC	ACCGCCTCGCCGTTCTAC	59°C
PCR3	CTCTGCGCGTGCTCAATAAC	GGGGCTGTTGGGGAGAAGTTTCAG	59°C

Mit diesen Primerpaaren wurde eine PCR-Amplifikation mit den folgenden Bestandteilen durchgeführt:

50 ng DNA (nach Restriktionsspaltung) 1x PCR-Puffer inkl. 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen) 5 pmol forward Primer 5 pmol reverse Primer 0,2 mM dNTP-Mix mit c7dGTP 5 % DMSO 0,5 U Taq-Polymerase (Invitrogen) 0,1 U Perfect Match (Stratagene) ad 20 μl H₂O Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 1. Denaturierung zu Beginn der Reaktion für 7 min bei 95°C
- 2. 27 Zyklen mit jeweils:

Denaturierung	60 sec bei 94℃
Annealing	60 sec (Annealing-Temperaturen siehe Tabelle 4.8)
Elongation	60 sec bei 72℃

- 3. Abschließende Elongation der DNA-Stränge für 10 min bei 72℃
- 4. Abkühlung der Ansätze auf 20℃

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mit einer Digoxygenin-markierten DNA-Sonde mit der Sequenz 5'GCTCAATAACTGTCCCCGGAGCCGGAGCCG3'. Alle Bestimmungen wurden zweimal durchgeführt und immer mit der entsprechenden ungespaltenen DNA verglichen.

Die Ergebnisse der analysierten Zelllinien und Lungengewebe sind in der Abbildung 4.13 aufgelistet. Bei den vier analysierten Zelllinien wurde ein Methylierungsmuster gefunden, das mit der DICE1-Expression korreliert. Calu3 und SK-MES1 zeigten eine stark verminderte DICE1-Expression und alle analysierten CpG-Dinukleotide waren methyliert. SK-LC12 zeigte eine moderate DICE1-Expression. Bei dieser Zelllinie waren 3 der 11 analysierten CpG-Dinukleotide nicht methyliert. Die drei nichtmethylierten CpG-Dinukleotide liegen im Bereich (bis 200 bp) vor dem Transkriptionsstartpunkt. Die weiter entfernten CpG-Dinukleotide waren alle methyliert. SW900 zeigte nur eine wenig verminderte DICE1-Expression. Bei dieser Zelllinie waren DICE1-Expression. Bei dieser Hyliert. Die drei nichtmethylierten DICE1-Expression. Bei dieser Zelllinie waren tur 4 CpG-Dinukleotide methyliert. Die weiter entfernten DICE1-Expression. Bei dieser Zelllinie waren nur 4 CpG-Dinukleotide methyliert. Bei der Analyse von weiteren vier CpG-Dinukleotiden konnte eine schwache PCR-Bande gefunden werden. Dies verweist auf eine Hypomethylierung des Cytosins bei diesen vier CpG-Dinukleotiden.

Die Analyse der DNA von normalem Lungengewebe (P17) zeigt eine Hypomethylierung der DICE1-Promotorregion. Von den 11 analysierten CpG-Dinukleotiden waren 6 nichtmethyliert, 3 hypomethyliert und 1 methyliert. Im Gegensatz zum normalen Lungengewebe wurde bei zwei Lungenkarzinomen eine Hypomethylierung gefunden. Dabei zeigte die DNA von Patient P4 eine stärkere Methylierung als Patient P2. Bei P2 waren 5 der 11 analysierten CpG-Dinukleotide hypomethyliert. Bei P4 konnte im analysierten Bereich des DICE1-Promotors kein nichtmethyliertes CpG-Dinukleotid gefunden werden.

_ 4	100		-300		-	200		-	100		+1
—	R	R	h	7	VK	+	Z	1	+ /	7	
	NaeI	SacII	NciI	BsaHI	NciI	NaeI	AciI	PmlI	HpaII	CfoI	HpaII
Calu3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SK-MES1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SK-LC12	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
SW-900	+	0	0	0	0	-	-	-	+	-	+
P4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P2	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0
P17	0	0	-	0	-	+	-	0	-	-	-

Abbildung 4.13: Methylierungsstatus des DICE1-Promotors in den nichtkleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien mit verminderter DICE1-Expression (Calu3, SK-MES1, SK-LC12) im Gegensatz zur DICE1-exprimierenden Zelllinie SW-900, sowie zwei primäre Lungenkarzinome (P4 und P2) und ein normales Lungengewebe (P17). Die obere Skala gibt die Position der Schnittstellen in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt (+1) wieder. + methylierte; 0 hypomethylierte; - nichtmethylierte Restriktionsschnittstelle.

4.2.4.6 Bandshift-Assay zum Nachweis von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren

Diese Analyse wurde durchgeführt, um in der DNA-Sequenz im 5'-Bereich des DICE1-Gens Bindestellen von Transkriptionsfaktoren nachzuweisen. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die Transkription der Gene regulieren, indem sie die RNA-Polymerase an den richtigen Transkriptionsstartpunkt führen. Im 5'-Bereich des DICE1-Gens sind mittels Computeranalysen eine Vielzahl von Transkriptionsfaktor-Bindestellen gefunden worden (siehe Abbildung 4.6).

Bei dem angewandten Bandshift-Assay wird sich die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Erkennungssequenzen in der DNA-Sequenz zu nutze gemacht, um einen möglichen Promotor nachzuweisen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- 1. Die entsprechende DNA-Sequenz wurde radioaktiv markiert.
- Ein Gemisch von nukleären Proteinen (Kernextrakt von HeLa-Zellen), das besonders reich an Transkriptionsfaktoren ist, wurde mit dem radioaktiv markierten PCR-Produkt gemischt.
- Durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Erkennungssequenzen in der DNA kam es zu einer veränderten Laufgeschwindigkeit der Protein-DNA-Hybridmoleküle während der Gelelektrophorese (*band shift*). Der Nachweis der radioaktiv markierten DNA erfolgte durch einen Röntgenfilm.

Dieser Bandshift-Assay wurde mit dem Promotorfragment DICE1Prom6 (siehe Tabelle 4.4) durchgeführt. Das mit α[³²P]-dCTP radioaktiv markierte DICE1Prom6-PCR-Fragment wurde mit dem Kernextrakt vermischt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei kam es zu einer Verschiebung der Bande des DNA-Protein-Gemisches im Gegensatz zu dem radioaktiv markierten PCR-Produkt ohne Kernextrakt (siehe Abbildung 4.14 A: Spur 1 und 2). Dies beweist, dass Proteine des Kernextrakts an die DNA-Sequenz des DICE1Prom6 Fragments gebunden haben und so den *band shift* verursachen.



Abbildung 4.14: Bandshift Assay des DICE1Prom6-Fragments mit dem HeLa-Kernextrakt.
 Inkubationszeit des Röntgenfilms 13³/₄ h (A) bzw. 72 h (B). 1) ³²P-dCTP markiertes DICE1Prom6; 2) ³²P-dCTP markiertes DICE1Prom6 mit HeLa-Kernextrakt vermischt; 3) nichtmarkiertes und ³²P-dCTP-markiertes DICE1Prom6 mit HeLa-Kernextrakt.

In einem parallelen Experiment wurde der Kernextrakt vor der Zugabe des radioaktiv markierten DICE1Prom6-Fragments mit einem nicht radioaktiv markierten DICE1Prom6-PCR-Produkt vermischt. nichtmarkierte PCR-Produkt Das bindet ebenfalls Transkriptionsfaktoren, ist allerdings nicht auf dem Röntgenfilm nachweisbar. Nach der Zugabe des radioaktiv markierten PCR-Produktes dürften nicht mehr genügend Transkriptionsfaktoren für eine Bindung an die DNA vorhanden sein, und es müsste nur ein geringer band shift sichtbar sein. Diese Konkurrenz der beiden DICE1Prom6-Fragmente um die Transkriptionsfaktoren war allerdings nur schwach nachweisbar (siehe Abbildung 4.14 A; Spur 3). Erst nach einer Inkubationszeit von 72 h war eine Bande von der Größe der ungebundenen DNA zu erkennen (siehe Abbildung 4.14 B; Spur 3).

4.2.5 Molekulare Charakterisierung der Promotoraktivität des DICE1-Gens in Prostatakarzinom-Zellen

4.2.5.1 DICE1-Expressionsanalysen bei Prostatakarzinom-Zelllinien

Die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 wurden auf die Expression des DICE1-Gens untersucht. Dafür wurde die DICE1-cDNA mittels Realtime-PCR mit dem iCycler der Firma Bio-Rad amplifiziert und die relative DICE1-Expression ermittelt.

Die Ergebnisse der Realtime-PCR mit der cDNA der Zelllinien LNCaP und DU-145 in Bezug auf die cDNA aus normalem Prostatagewebe sind in der Abbildung 4.15 für das DICE1-Gen und in Abbildung 4.16 für das GAPDH-Gen dargestellt. In Tabelle 4.9 wurden die Werte der relativen DICE1-Expression berechnet.

Die Ergebnisse der Realtime-PCR demonstrieren, dass in den Prostatakarzinom-Zelllinien das DICE1-Gen relativ zur normalen Prostata eine verminderte DICE1-Expression zeigt. In den nächsten Kapiteln soll dieser Expressionsverlust geklärt werden. Dafür wurde einerseits die Methylierung des DICE1-Promotors analysiert. Andererseits wurden die Zelllinien in der Anwesenheit von 5-Azacytidin, einem Inhibitor der Methyltransferase, kultiviert und die Expression des DICE1-Gens mit den unbehandelten Zelllinien verglichen.

Tabelle 4.9: Ermittlung der relativen DICE1-Expression der Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145^a.

	Ct DICE1 ^b	Ct GAPDH ^b	ΔCt	Δ(ΔCt)	2 ^{-Δ(ΔCt)}	%
Prostata ^c	22,6	17,8	4,8	0	1,000	100
LNCaP	21,3	13,9	7,4	2,6	0,165	16,5
DU-145	21,7	12,3	9,4	4,6	0,041	4,1

^a) DICE1-Expression in Bezug auf das Kontrollgen GAPDH und relativ zum normalen Prostatagewebe

^b) Durchschnittlicher Ct-Wert von zwei Realtime-PCR-Analysen (s. Abbildung 4.15 und 4.16)

^c) normales Prostatagewebe



	1. Ct-Wert	2. Ct-Wert	Ct DICE1 ^a
Normale Prostata	22,6	22,7	22,6 ± 0,07
LNCaP	21,4	22,1	21,7 ± 0,49
DU-145	21,4	21,2	21,3 ± 0,14

Abbildung 4.15: Graphische Darstellung der Realtime-PCR von DICE1 mit cDNA aus normalem Prostatagewebe sowie aus den Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145. A) Amplifikationsprofil; B) Schmelzkurve (blaue Linie: Leerwert); C) Threshold Cycle (Ct-Wert); ^a Mittelwert ± Standardabweichung.



С

	1. Ct-Wert	2. Ct-Wert	Ct GAPDH ^a
Normale Prostata	18,0	17,6	17,8 ± 0,28
LNCaP	14,0	13,8	13,9 ± 0,14
DU-145	12,6	12,0	12,3 ± 0,42

Abbildung 4.16: Graphische Darstellung der Realtime-PCR von GAPDH mit cDNA aus normalem Prostatagewebe sowie aus den Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145. A) Amplifikationsprofil; B) Schmelzkurve (blaue Linie: Leerwert); C) Threshold Cycle (Ct-Wert); ^a Mittelwert ± Standardabweichung

4.2.5.2 Analyse des Methylierungsstatus der Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 im Vergleich zu normalem Prostatagewebe

Die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 wurden mittels methylsensitiver Restriktionsenzyme und der Bisulfitmethode auf den Methylierungsstatus des DICE1-Promotors untersucht.

Für die Analyse der Promotorregion mit den methylsensitiven Restriktionsenzymen wurde der gleiche Ansatz wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben eingesetzt. Weiterführend wurden bei den Prostatakarzinom-Zelllinien auch die weiter 5' gelegenen CpG-Dinukleotide mit methylsensitiven Restriktionsenzymen untersucht. Für diese zusätzlichen Analysen wurden Primer und Digoxygenin-markierte Sonden eingesetzt, die in Tabelle 4.10 aufgelistet sind. Der Ansatz und die PCR-Bedingungen erfolgten wie in Kapitel 4.2.4.5 beschrieben.

Tabelle 4.10:	Primersequenzen fü	r den	Methylierungsnachweis	im	Bereich	-800	bis	-400
	vor dem Transkriptio	nssta	rtpunkt					

	forward Primer	reverse Primer	Annealing- Temperatur
PCR4	CCTAACCAGGTGTTTGTCCAC	GCCTCTCCTTGGCTGTTGG	58°C
PCR5	CAGGAACCTCCTCCGGCG	GTGGACAAACACCTGGTTAGGAG	61°C
PCR6	TCCCCGGTCATAAACAACCTC	CGCCGGAGGAGGTTCCTG	59°C
PCR7	TCCAACTCCCACCTCTCGTG	GGAAGTGAGAGGTTGTTTATGAC	℃ 00

Die Sequenzen der DNA-Sonden zum Nachweis der einzelnen PCR-Produkte lauten: für PCR4 5'CCTAACCAGGTGTTTGTCCAC3', für PCR5 5'CGCCGGAGGAGGTTCCTGGGC-CTC3', für PCR6 und PCR7 5'GAGGGGAAGTGAGAGGGTTGTTTATGACCGG3'.

Als Kontrolle wurde DNA aus einem normalen Prostatagewebe eingesetzt. Die Ergebnisse der Restriktionsspaltungen sind in Abbildung 4.17 aufgelistet.

Die Ergebnisse zeigen auch für die Prostatakarzinom-Zelllinien ein differentes Methylierungsmuster zwischen der normalen DNA und den Prostatakarzinom-Zelllinien mit verminderter DICE1-Expression. Während in den 400 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt, im Bereich des vorhergesagten Promotors 1, bei den Prostatakarzinom-Zelllinien bei 10 der 11 analysierten CpG-Dinukleotide eine Methylierung gefunden wurde, war im Bereich des vorhergesagten Promotors 2 keine Unterscheidung in der Methylierung zwischen Zelllinien und normalem Prostatagewebe möglich.



Abbildung 4.17: Methylierungsmuster der Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 sowie der normalen Prostata (n. Pros.). Die obere Skala und die Pfeile geben die Position der Schnittstellen in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt (+1) wider. + methylierte; 0 hypomethylierte; - nichtmethylierte CpG-Dinukleotide.

Der einzige Unterschied zu den im Kapitel 4.2.4.5 untersuchten Lungenkarzinom-Zelllinien wurde bei dem CpG-Dinukleotid am Transkritptionsstartpunkt mit dem methylsensitiven Restriktionsenzym Hpall gefunden. Dort waren die wenig exprimierenden Lungenkarzinom-Zelllinien Calu3 und SK-MES1 methyliert. Bei beiden untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien konnte jedoch bei dem CpG-Dinukleotid am Transkriptionsstartpunkt keine Methylierung gefunden werden. Alle anderen CpG-Dinukleotide waren bei beiden Prostatakarzinom-Zelllinien methyliert (s. Abbildung 4.17).

Zur Abklärung dieses Unterschiedes wurde die Sequenz um den Transkriptionsstartpunkt durch die Bisulfitmethode näher untersucht.

Diese Analyse bestand aus den folgenden Methoden:

- 1. Umwandlung der nichtmethylierten Cytosine in ein Uracil (Bisulfitmodifizierung)
- 2. Amplifikation des DICE-Promotors mittels PCR
- 3. Klonierung der PCR-Fragmente in den pGEM-Teasy Vektor
- 4. Plasmid-Isolierung
- 5. Sequenzierung der Plasmide

Durch die Bisulfitmethode und die anschließenden Sequenzierungen wurde eine Folge von 16 CpG-Dinukleotiden im Bereich des Transkriptionsstartpunktes analysiert. Insgesamt wurde die DNA-Sequenz von –120 bis +60 um den Transkriptionsstartpunkt untersucht (s. Abbildung 4.18 A).

Da alle nichtmethylierten Cytosine bei der PCR als ein Thymidin in der DNA-Sequenz erschienen, mussten die PCR-Primer der umgewandelten bisulfitmodifizierten DNA-Sequenz angepasst werden. Weiterhin sollten keine spezifischen Primer, weder für methylierte noch für nichtmethylierte CpG-Dinukleotide, für die PCR eingesetzt werden. Daher war es nötig, DNA-Sequenzen auszusuchen, die im 3'-Bereich keine CpG-Dinukleotide enthielten. Jedoch mussten die Sequenzen genügend Cytosine besitzen, die durch die Bisulfitreaktion umgewandelt wurden. Mit diesen Primern sollte es möglich sein, spezifisch nur die umgewandelten DNA-Stränge zu amplifizieren, aber keine Selektion zwischen methylierten und nichtmethylierten CpG-Dinukleotiden zu treffen. Die Primersequenzen lauteten für den forward Primer TTTAAATATATGTTAATGAAAGGATAG und für den reverse Primer CCGATACAAAAATAAAAACCTAAAAAC. Mit diesen Primern wurde der Promotorbereich von –175 bis +109 amplifiziert. Die Bedingungen für die PCR lauteten:

- 1. Denaturierung zu Beginn der Reaktion für 7 min bei 95°C
- 2. 40 Zyklen mit jeweils:

Denaturierung	60 sec bei 94°C
Annealing	60 sec bei 56℃
Elongation	60 sec bei 72℃

- 3. Abschließende Elongation der DNA-Stränge für 10 min bei 72℃
- 4. Abkühlung der Ansätze auf 10℃

Die Klonierung des PCR-Produktes mit der anschließenden Sequenzierung der Plasmide ergab ein unterschiedliches Methylierungsmuster bei LNCaP, DU-145 und bei dem normalen Prostatagewebe. Die Ergebnisse der Plasmidsequenzierung nach der Bisulfitmodifizierung sind in Abbildung 4.18 B zusammengefasst.

Mit diesen Ergebnissen bestätigt sich die Aussage, dass auch bei den Prostatakarzinom-Zelllinien die verminderte DICE1-Expression auf eine Promotormethylierung zurückführbar ist. Weiterhin konnte durch die Bisulfitmethode im unmittelbaren Bereich vor dem Transkriptionsstartpunkt ein Unterschied in der Methylierung der Zelllinie LNCaP und DU-145 gefunden werden. Bei der Zelllinie DU-145 konnte am analysierten CpG-Nukleotid Nummer 4 das Ergebnis der Restriktionsspaltung mit dem methylsensitiven Restriktionsenzymen PmII nicht bestätigt werden (s. Abbildung 4.18 B).

A -1	37	gaa CG g CG a CpG 1 2	ıg g CG 3	gtg	ıtat	.c a P	a CG t 4 MmlI	ggc	t CG 5	aa	ga C 6	Gtgi	CC a	aggo	gg CG 7	gag	cct	20 00 8	cag	C
_	77	ccctgcc CG CpG 9	l a gtt	caaa	ac C 1 Hpa	:G g 10 II	jagt	gtg	aga	ga	gaaa	aag (Cf	CG (11 IoI	ctto	cagt	ag C 1	G ag 2	gagg	laac	t
_	17	gagaaagtg CpG	ıg tga	acac	2 CG 13 H	2 C 14 pal	I Jaaa	tg C 1	G ga 5	gg	gagi	tcc	ct g	gaaa	actt	ctc	CCa	aaca	ıgcc	C
+ B	43	cagggccaa CpG	it ctt	caac	tca	.g c	cca	ctc	ccc	tc	tt C(1	G CC8 6	ag (ctco	ccag	gtc	cco	cact	cct	9
								a	naly	siert	e Cp	oG-E	Dinul	kleot	tide					
			Klon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
		LNCaP	1	М	М	М	М	М	М	М	М	М	М	М	U	U	U	U	U	
			2	М	М	М	М	U	М	М	М	М	М	М	U	U	U	U	U	
			3	М	М	М	М	U	М	М	М	М	М	М	U	U	U	U	U	
			4	М	М	М	М	М	М	М	М	М	М	М	U	U	U	U	U	
		DU-145	1	М	М	М	U	М	М	U	М	М	М	М	U	U	U	М	U	
			2	М	М	М	U	М	М	U	М	М	М	М	U	U	U	М	U	
			3	М	М	М	U	М	М	U	М	М	М	М	U	U	U	М	U	
			4	М	М	М	U	М	М	U	U	М	М	М	U	U	U	М	U	
			5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
		normale	1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
		Prostata	2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
			3	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
			4	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
			5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
			6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
			7	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	
			8	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	

Abbildung 4.18: Ergebnis der Bisulfit-Sequenzierung. A) Position der analysierten CpG-Dinukleotide mit der Bisulfit-Methode und den Schnittstellen der methylsensitiven Restriktionsenzyme, die in diesem Bereich eingesetzt wurden (s. Abbildung 4.7; 4.17). Der schwarze Pfeil gibt die Position des Transkriptionsstartpunktes (Position +1) an. B) Ergebnis der Bisulfit-Sequenzierung der Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 sowie der normalen Prostata (M: methyliert; U: nichtmethyliert).

4.2.5.3 DICE1-Expressionsanalyse nach Einwirkung von 5-Azacytidin bei der Kultivierung von Prostatakarzinom-Zelllinien

Das 5-Azacytidin wurde eingesetzt, um bei der Kultivierung der Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 die Methylierung der Cytosine zu blockieren. Ist die Verminderung der DICE1-Expression in unbehandelten Zelllinien auf eine Promotormethylierung zurückzuführen, so müsste die relative Expression durch die Einwirkung von 5-Azacytidin im Verhältnis zur normalen Prostata ansteigen.

Die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 wurden über vier Tage mit 1,0 μ M bzw. 5,0 μ M 5-Azacytidin behandelt. Als dritter Ansatz wurden beide Zelllinien 10 Tage mit 1,0 μ M 5-Azacytidin kultiviert. In allen Zellkulturen war ein zytotoxischer Einfluss des 5-Azacytidins zu erkennen. Nach Ablauf der Kultivierungszeit von 4 bzw. 10 Tagen wurde aus den Zellen RNA isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde für die Realtime-PCR eingesetzt. Die Ergebnisse der Realtime-PCR für die Expression des DICE1- bzw. des GAPDH-Gens sind in den Tabellen 4.11 und 4.12 aufgelistet.

	1. Ct-Wert	2. Ct-Wert	3. Ct-Wert	4. Ct-Wert	Ct DICE1 ^a
normale Prostata	23,2	22,5	23,3	23,6	$23,2 \pm 0,47$
LNCaP unbehandelt	20,6	21,9	21,1	21,5	21,3 ± 0,56
LNCaP 4d; 1,0 µM 5-Aza⁵	21,2	20,4	21,1	20,5	20,8 ± 0,41
LNCaP 4d; 5,0 µM 5-Aza ⁵	23,1	22,2	21,4	22,2	22,2 ± 0,69
LNCaP 10d; 1,0 µM 5-Aza ^b	21,0	19,1	21,0	20,3	20,3 ± 0,94
DU-145 unbehandelt	24,2	23,1	23,5	22,1	23,2 ± 0,88
DU-145 4d; 1,0 µM 5-Aza ^b	20,2	21,2	21,4	23,1	21,5 ± 1,20
DU-145 4d; 5,0 µM 5-Aza ^b	21,6	20	21,7	22,2	21,4 ± 0,95
DU-145 10d; 1,0 µM 5-Aza⁵	23,7	23,4	22,8	23,1	23,3 ± 0,39

Tabelle 4.11: Threshold Cycle (Ct-Wert) der DICE1 Realtime-PCR.

^a) Mittelwert ± Standardabweichung

^b) Eingesetzte Konzentrationen des 5-Azacytidins (5-Aza), sowie Kultivierungszeitraum (d: Tage)

	1. Ct-Wert	2. Ct-Wert	3. Ct-Wert	4. Ct-Wert	Ct GAPDH ^a
normale Prostata	17,6	16,8	18,0	17,6	17,5 ± 0,50
LNCaP unbehandelt	13,1	13,7	13,0	13,2	13,3 ± 0,31
LNCaP 4d; 1,0 µM 5-Aza [♭]	13,1	13,5	13,0	12,8	13,1 ± 0,29
LNCaP 4d; 5,0 µM 5-Aza ⁵	15,3	15,0	14,9	14,8	15,0 ± 0,22
LNCaP 10d; 1,0 µM 5-Aza⁵	13,2	13,0	12,8	12,9	13,0 ± 0,17
DU-145 unbehandelt	12,7	12,3	12,3	12,4	12,4 ± 0,19
DU-145 4d; 1,0 µM 5-Aza ^b	13,8	14,1	14	14,1	$14,0 \pm 0,14$
DU-145 4d; 5,0 µM 5-Aza ^b	14,1	14,5	14,2	14,1	14,2 ± 0,19
DU-145 10d; 1,0 µM 5-Aza⁵	15,2	17,6	16,1	16,2	16,3 ± 0,99

Tabelle 4.12: Threshold Cycle (Ct-Wert) der GAPDH Realtime-PCR.

^a) Mittelwert ± Standardabweichung

^b) Eingesetzte Konzentrationen des 5-Azacytidins (5-Aza), sowie Kultivierungszeitraum (d: Tage)

Aus diesen Werten wurde die relative DICE1-Expression berechnet (Tabelle 4.13). Bei beiden Zelllinien war nach der Kultivierung mit 5-Azacytidin ein deutlicher Anstieg der DICE1-Expression erkennbar. Diese Erhöhung der DICE1-Expression ist abhängig von der eingesetzten Konzentration des 5-Azacytidins und der Dauer der Kultivierung.

Tabelle 4.13: Relative DICE1-Expression in unbehandelten und mit 5-Azacytidinbehandelten LNCaP und DU-145 Zellen

	Ct DICE1 ^a	Ct GAPDH ^b	ΔCt	$\Delta(\Delta Ct)$	2-Δ(ΔCt)	%
normale Prostata	23,2	17,5	5,7	0,0	1,000	100,0
LNCaP unbehandelt	21,3	13,3	8,1	2,4	0,189	18,9
LNCaP 4d; 1,0 µM 5-Aza ⁵	20,8	13,1	7,7	2,0	0,250	25,0
LNCaP 4d; 5,0 µM 5-Aza ⁵	22,2	15,0	7,2	1,5	0,354	35,4
LNCaP 10d; 1,0 µM 5-Aza ^b	20,3	13,0	7,3	1,6	0,330	33,0
DU-145 unbehandelt	23,2	12,4	10,8	5,1	0,029	2,9
DU-145 4d; 1,0 µM 5-Aza ^b	21,5	14,0	7,5	1,8	0,287	28,7
DU-145 4d; 5,0 µM 5-Aza ^b	21,4	14,2	7,2	1,5	0,354	35,4
DU-145 10d; 1,0 µM 5-Aza⁵	23,3	16,3	7,0	1,3	0,406	40,6

^a) Mittelwerte der ermittelten Threshold Cycles (Ct-Werte) aus Tabelle 4.11

^b) Mittelwerte der ermittelten Threshold Cycles (Ct-Werte) aus Tabelle 4.12

^c) Eingesetzte Konzentrationen des 5-Azacytidins (5-Aza) und Kultivierungsdauer (d: Tage)

4.2.6 DICE1-Promotormethylierung bei primären Prostatakarzinomen

Für die Charakterisierung des DICE1-Promotors bei primären Prostatakarzinomen wurden einerseits der Heterozygotenstatus des Mikrosatellitenmarkers D13S284, der mit dem DICE1-Gen kolokalisiert, bestimmt (LOH-Analyse) und die Methylierung des DICE1-Promotors untersucht (Bisulfitmethode).

Für die LOH-Analysen wurde die DNA aus Mikrodissektaten isoliert. Bei der Bisulfitmethode war diese Methode nicht anwendbar. Hier erfolgte die DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten.

4.2.6.1 LOH-Analyse bei Prostatakarzinomen mit dem Mikrosatellitenmarker D13S284

Für die LOH-Analyse wurden Tumor- bzw. Nichttumorgewebeproben von 14 Patienten mit Prostatakarzinom mittels Mikrodissektion gewonnen. Aus den Zellen der Mikrodissektate wurde die DNA isoliert und der Mikrosatellitenmarker D13S284 untersucht. Die Gewebeproben, die mittels Mikrodissektion gewonnen wurden, sind exemplarisch für 8 Prostatakarzinome in der Abbildung 4.19 abgebildet. Diese 8 Prostatakarzinome wurden für die Bisulfitmodifikation zur Analyse der Promotormethylierung eingesetzt.





Patient 1



Patient 2



Patient 6



Abbildung 4.19: Mikrodissektion von Tumorgewebe (links) und Nichttumorgewebe (rechts) bei 8 Patienten mit einem Prostatakarzinom. Der rote Pfeil kennzeichnet die jeweils gewonnenen Tumorproben.

Die Amplifikate der Mikrosatelliten-PCR wurden mit Dye-Auftragungspuffer verdünnt und in einem Mikrosatelliten-Gel im Sequenziergerät Alf-Express elektrophoretisch aufgetrennt. Das Nichttumorgewebe war bei 10 der 14 untersuchten Prostatakarzinome heterozygot. Von diesen 10 analysierten Prostatageweben wies das Karzinom bei 5 Fällen eine LOH auf (Abbildung 4.20). Bei einem weiteren Patienten wurde eine Verschiebung in der Anzahl der CA-Dinukleotide gefunden, was auf eine fragliche Mikrosatelliteninstabilität (MSI) hindeuten könnte (s. Abbildung 4.20 Patient 3).

B	Patient 1 Tu	LOH
	Patient 1 NT	
	, Patient 2 Tu	LOH
	Patient 2 NT	
	Patient 3 Tu	MSI
	Patient 3 NT	
		NI
	Patient 4 NT	NI
	Patient 5 Tu Patient 5 NT	
	Patient 6 Tu	
	, Patient 6 NT	
	Patient 7 Tu	<u>LOH</u>
	Patient 7 NT	
	Patient 8 Tu	
	Patient 8 NT	
	Patient 9 Tu	LOH
	Patient 9 NT	
	Patient 10 Tu	LOH
	Patient 10 NT	
	Patient 11 Tu	NI
	Patient 11 NT	NI
	Patient 12 Tu	
	Patient 12 NT	
	Patient 13 Tu	NI
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Patient 13 NT	NI
8	Patient 14 Tu	NI
	Patient 14 NT	NI

Abbildung 4.20: LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D13S284 bei 14 Patienten mit Prostatakarzinom. LOH: loss of heterozygosity; NI: nicht informativ; MSI: Mikrosatelliteninstabilität.

4.2.6.2 Methylierungsstatus bei Prostatakarzinomen

Von den Karzinomen, die auf eine LOH des Mikrosatellitenmarkers D13S284 untersucht wurden, wurden acht Prostatakarzinome ausgewählt und mit der Bisulfitmethode analysiert. Da es, methodisch bedingt, nicht möglich war, die DNA-Proben der Mikrodissektate für die Bisulfitreaktion einzusetzen, war es nötig, DNA aus Paraffinschnitten zu isolieren. Für die Analyse des Methylierungsstatus des DICE1-Promotors wurden die gleichen PCR-Bedingungen eingesetzt, die im Kapitel 4.2.5.2 beschrieben worden sind. Bei dieser Analyse wurden die selben CpG-Dinukleotide untersucht, wie bereits bei den Prostatakarzinom-

Zelllinien beschrieben (s. Abbildung 4.18 A). Von jedem Patienten wurden 7 bis 10 Klone der amplifizierten, bisulfitmodifizierten DNA sequenziert und der Methylierungsstatus der 16 CpG-Dinukleotide ausgewertet (Tabelle 4.14).

Die Auswertung der einzelnen Klone ergab bei 4 der 8 analysierten Prostatakarzinome eine Methylierung des DICE1-Promotors. Bei einem weiteren Patienten (Patient 1) wies das Prostatakarzinom in einem sequenzierten Klon eine Methylierung eines einzelnen CpG-Dinukleotids (analysiertes CpG-Dinukleotid Nummer 4) auf. Bei Patient 3 wurde ein Klon identifiziert, der nicht methyliert war.

		Analy.		Analysierte CpG-Dinukleotide ^a														
	LOH	Klone	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Patient 1	ja	9	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc		\bigcirc											
Patient 2	ja	10				\bigcirc			\bigcirc			\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc		\bigcirc
Patient 3	MSI?	8				\bigcirc			\bigcirc			\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc		\bigcirc
Patient 4	NI	8				\bigcirc			\bigcirc			\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc		\bigcirc
Patient 5	nein	9	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc
Patient 6	nein	10	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc
Patient 7	ja	7	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc
Patient 9	ja	9				\bigcirc			\bigcirc			\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc	\bigcirc		\bigcirc

Tabelle 4.14: Methylierungsstatus des DICE1-Promotors im Tumorgewebe von 8 Patienten mit Prostatakarzinom

 a) Nummer des analysierten CpG-Dinukleotids bezieht sich auf die Nummerierung in Abbildung 4.18. LOH: loss of heterozygosity; MSI: Mikrosatelliteninstabilität; NI: nicht informativ; alle CpG-Dinukleotid methyliert, alle CpG-Dinukleotid nichtmethyliert, nicht vollständig methyliertes CpG-Dinukleotid, hypomethyliertes CpG-Dinukleotid

5. Diskussion

Die molekulargenetischen molekularzytogenetischen Untersuchungen und von Prostatakarzinomen erbrachten wesentliche Erkenntnisse über die genetischen Veränderungen bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms (Bova und Isaacs, 1996; Brothman, 2002). Dabei geht die Tumorgenese des Prostatakarzinoms insbesondere mit dem Verlust von genetischem Material (loss of heterozygosity; LOH) einher, was als ein Hinweis auf die Anwesenheit bzw. die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gewertet werden kann (Knudson, 1984). Eine der häufigsten allelischen Deletionen wurde bei Prostatakarzinomen in der Chromosomenregion 13g14 beschrieben (Ueda et al., 1999; Yin et al., 1999; Latil et al., 2002). Die höchste LOH-Rate wurde mit dem Mikrosatellitenmarker D13S284 gefunden (Ueda et al., 1999; Yin et al., 1999). Dieser Mikrosatellitenmarker kolokalisiert mit dem DICE1-Gen (Wieland et al., 2001). Bei nichtkleinzelligen Lungentumoren und Ösophaguskarzinomen konnte eine verminderte DICE1-Expression dargestellt werden, was darauf hinweist, dass es sich bei dem DICE1-Gen um ein Tumorsuppressorgen handelt (Wieland et al., 1999; Li et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung des Tumorsuppressorgens DICE1 bei der Entstehung des Prostatakarzinoms untersucht werden.

Beim Prostatakarzinom konnten bisher Amplifikationen bei den Genen c-myc, HER2/neu, CyclinD1 und beim AR-Gen dargestellt werden (Latil et al., 1994; Fournier et al., 1995; Visakorpi et al., 1995a; Jenkins et al., 1997; Koivisto et al., 1997; Ross et al., 1997; Han et al., 1998; Kaltz-Wittmer et al., 2000). Eine Amplifikation des AR-Gens wurde bisher nur bei sekundär hormonresistenten Prostatakarzinomen gefunden, dagegen nicht in unbehandelten primären Tumoren (Koivisto et al., 1997). Die genetischen Veränderungen, die zu einer primären Resistenz gegen eine Antiandrogentherapie führen, sind dagegen noch weitgehend unklar. Im Rahmen dieser Arbeit sollten primäre Prostatakarzinome auf die Anzahl der AR-Genkopien analysiert werden, und die Ergebnisse mit den pathologischen Tumorklassifikationen in Korrelation gebracht werden.

5.1 Bedeutung des Androgenrezeptor-Gens beim Prostatakarzinom

Bei der Mehrzahl der Patienten mit einem Prostatakarzinom ist das Wachstum des Tumors ein androgenabhängiger Prozess. Das AR-Gen ist auf dem Chromosom Xq12 (Wieacker et al., 1987) lokalisiert und kodiert den Androgenrezeptor, durch welchen die Androgene intrazellulär das Wachstum der Prostata und die Zelldifferenzierung regulieren. Die kurative Therapie des Prostatakarzinoms ist die radikale Prostatektomie. Bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen ist jedoch eine radikale Entfernung der Prostata oft nicht möglich. In diesen Fällen ist die Antiandrogentherapie eine wichtige palliative Behandlungsmethode, wobei allerdings 25 % der Prostatakarzinom-Patienten bereits primär nicht auf diese Therapieform ansprechen.

Zielsetzung dieses Teils der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zum möglichen genetischen Hintergrund der primären Antiandrogenresistenz beim Prostatakarzinom. Dazu wurde Prostatagewebe von Patienten mit unbehandeltem primärem Prostatakarzinom mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit einer spezifischen Sonde für das AR-Gen in Kombination mit der zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom (Zweifarben-FISH) untersucht. Auffällige Ergebnisse dieser FISH-Analysen sollten mit einem Sondenmix aus zentromerspezifischen Sonden für das Chromosom X, Y und 18 (Dreifarben-FISH) überprüft werden.

5.1.1 Interphase-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) an isolierten Zellkernen

Die Interphase-FISH-Analyse ist eine wichtige molekularzytogenetische Arbeitsmethode für das Erkennen von Chromosomenaberrationen und numerischen Veränderungen von Chromosomen oder einzelnen Genen (Stumm et al., 1999). Dabei ist die Auswertung einzelner Zellen ein großer Vorteil der FISH gegenüber molekularen Arbeitsmethoden. Weiterhin erlaubt die FISH-Analyse auch einen Vergleich des untersuchten Gewebes mit anderen prognostischen Faktoren, die mit dem Prostatakarzinom assoziiert sind (Alcaraz et al., 1994; Takahashi et al., 1994; Henke et al., 1998).

Für die FISH-Analyse paraffineingebetteter Gewebeschnitte gibt es zwei Möglichkeiten. Einerseits die Analyse des gesamten Gewebeschnittes (Henke et al., 1994) und andererseits die Analyse einzelner Zellen, die aus den Paraffinschnitten isoliert wurden (Liehr et al., 1995).

In dieser Arbeit wurden Zellen mittels FISH-Analyse ausgewertet, die aus Paraffinschnitten von Prostatakarzinomen isoliert worden sind. Vorteil dieser Methode gegenüber der FISH-

Analyse gesamter Gewebeschnitte ist eine höhere Genauigkeit, da die Zellen einzeln vorliegen und durch eine richtige Verdünnung kaum Überlagerungen zu finden sind. Dadurch ist eine bessere quantitative Aussage bei den einzelnen Prostatakarzinomen möglich (Qian et al., 1996). Nachteil dieser Methode ist, dass vor der Kernisolierung der Tumoranteil an einem Hämatoxylin-Eosin-(HE)-gefärbten Schnitt korrekt lokalisiert werden muss. Dieser Bereich muss dann genau auf die nichtgefärbten Paraffinschnitte übertragen werden, um eine Kontamination mit Nichttumorgewebe zu vermeiden.

5.1.2 Ermittlung des Cut-off-Wertes

In der Literatur gibt es keine einheitlichen Cut-off-Werte für FISH-Sonden bei der Untersuchung des Prostatakarzinoms. In verschiedenen Publikationen werden Cut-off Werte von 10 % oder 20 % genannt (Baretton et al., 1994; Brothman et al., 1994; Brown et al., 1994; Henke et al., 1994; Erbersdobler et al., 1997; Miyoshi et al., 2000; Edwards et al., 2001). Allerdings ist der Vergleich dieser Studien schwierig. Zum einen wurden in den Studien beide o.g. Methoden für die FISH-Analyse eingesetzt. Bei der FISH-Analyse von ganzen Gewebeschnitten sind viel häufiger Überlagerungen von Zellen zu finden, die bei falscher Beurteilung zu einem falsch-positiven Ergebnis führen können. Andererseits werden bei dieser FISH-Methode dünnere Gewebeschnitte (5 μ m) eingesetzt. Dies führt zu einem höheren Anteil angeschnittener Zellkerne, durch die eine Kopie eines Chromosoms verloren gehen kann. Ein anderer Punkt, der den Vergleich der Studien schwierig macht, sind die verschiedenen eingesetzten FISH-Sonden. Bei den Analysen wurden sowohl indirekt als auch direkt markierte Sonden für die FISH eingesetzt. Jedoch auch identisch markierte Sonden von verschiedenen Anbietern unterscheiden sich in ihrer Sensitivität.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Cut-off-Wert für die untersuchten Prostatakarzinome und die angewandte FISH-Methode neu ermittelt. Zu diesem Zwecke wurde von insgesamt 17 Prostatakarzinomen der Nichttumor-Anteil untersucht. Dabei wurden in durchschnittlich 5,7 ± 1,9 % der analysierten Zellkerne zwei oder mehr Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom gefunden. Der höchste Anteil an Zellen mit zusätzlichen Fluoreszenzsignalen lag bei 9,0 %. Der Cut-off-Wert wurde daraufhin für diese Arbeit auf 20 % festgelegt. Dieser Wert liegt über dem höchsten Anteil auffälliger Zellkerne beim Nichttumorgewebe plus der dritten Standardabweichung, was einen Wert von 15 % ergibt. Der in dieser Arbeit höher gelegene Cut-off-Wert von 20 % sollte gewährleisten, dass möglichst wenige falsch-positive Fälle erfasst wurden.

Für diese Analysen wurde das Nichttumorgewebe von Prostatakarzinom-Patienten eingesetzt. Es ist möglich, dass dadurch bei einem Teil der untersuchten Gewebe methodisch bedingt wenige Tumorzellen mit analysiert worden sind. Da die Zellen von

Gewebeschnitten isoliert wurden, die z.T. einige Schnittdicken vom HE-gefärbten Kontrollschnitt entfernt lagen, ist eine Kontamination des Nichttumorgewebes mit Tumorzellen nicht auszuschließen.

5.1.3 Bestimmung der Anzahl der AR-Genkopien bei Prostatakarzinomen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Prostatektomie-Proben von 80 Patienten mit Prostatakarzinom ohne eine präoperative Hormontherapie untersucht. Die Auswahl der analysierten Prostatakarzinome spiegelt ungefähr die Verteilung der Tumorstadien wider, die im Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf zwischen 1994 und 1998 untersucht worden sind.

Das am häufigsten gefundene Ergebnis der FISH-Analyse waren zwei bis vier zusätzliche Signale sowohl mit der lokusspezifischen Sonde für das AR-Gen, als auch mit der zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom. Andere Ergebnisse, wie eine zusätzliche Kopie des AR-Gens bei nur einem X-Zentromer, Verlust des AR-Gens, oder zwei X-Zentromere bei nur einem analysierten AR-Gen wurden nur in wenigen Zellen nachgewiesen.

Von den 80 untersuchten Patienten zeigten 71 Prostatakarzinome (88,7 %) in weniger als 20 % (Cut-off-Wert) der analysierten Zellkerne zusätzliche Fluoreszenz-Signale für die beiden eingesetzten Sonden auf. 9 Prostatakarzinome (11,3 %) wiesen in über 20 % der analysierten Zellkerne zusätzliche Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom auf. Die FISH-Ergebnisse lassen bei diesen Patienten auf eine Polysomie (Disomie bis Tetrasomie) des X-Chromosoms schließen. Dabei wurde in den untersuchten Zellkernen mindestens soviel Material des X-Chromosoms vervielfältigt, wie mit den beiden Sonden der Zweifarben-FISH getestet worden ist. Dies entspricht der Region des X-Chromosoms, welche von dem Zentromer des X-Chromosoms (Xq10) einerseits und dem AR-Gen (Xq12) andererseits eingegrenzt ist. Damit kann in diesen Fällen nicht von einer Amplifikation des AR-Gens gesprochen werden, da definitionsgemäß für eine Amplifikation im Durchschnitt mehr als 5 Signale pro Zellkern vorliegen müssen (Koivisto et al., 1997).

Prostatakarzinome mit zusätzlichen Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom wurden in allen pathologischen Tumorstadien und Gleason Scores gefunden (Tabelle 5.1). Die beobachtete Polysomie des X-Chromosoms korreliert jedoch signifikant mit der pathologischen Tumorklassifikation (P = 0,016). Ebenso signifikant korreliert die Polysomie mit dem Gleason Score (P = 0,015).

PSA-Bestimmungen nach der Prostatektomie wurden bei 70 Patienten durchgeführt. Hiervon war bei 27 Patienten ein Anstieg der PSA-Serumkonzentration von über 0,1 ng/ml nachweisbar. Patienten mit einer positiven PSA-Nachuntersuchung wiesen in

durchschnittlich 14,3 % der analysierten Zellkerne zusätzliche Kopien des AR-Gens und des X-Chromosoms auf. Dagegen zeigten Patienten ohne nachweisbaren PSA-Anstieg nach der Prostatektomie in durchschnittlich 10,3 % der ausgewerteten Kerne zusätzliche Fluoreszenzsignale. Insgesamt wurden bei 19 % der Patienten mit positiven PSA-Konzentrationen in mehr als 20 % der Kerne zusätzliche Signale für das AR-Gen und das X-Chromosom gefunden, aber dagegen nur bei 7 % der Patienten ohne PSA-Anstieg (Tabelle 5.1). Jedoch konnte für die FISH-Ergebnisse keine Signifikanz zu den PSA-Nachuntersuchungen (P = 0,03) gefunden werden.

	Anzahl der Pro das AR-0	Anzahl der Prostatakarzinome mit ≥ 2 Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom in								
	<10% der Kerne (n = 44)	10–20% der Kerne (n = 27)	≥20% der Kerne (n = 9)	P-Wert ^b						
Pathologische Tumorstadien				0,016						
pT2a, 2b: n = 38 (47%)	23 (61 %)	13 (34 %)	2 (5 %)							
pT3a, 3b: n = 35 (44%)	19 (54 %)	13 (37 %)	3 (9 %)							
pT4: n = 7 (9%)	2 (28 %)	1 (14 %)	4 (57 %)							
Gleason Score				0,015						
5, 6: n = 34 (42%)	21 (62 %)	11 (32 %)	2 (6 %)							
7: n = 43 (54%)	23 (53 %)	14 (32 %)	6 (14 %)							
9: n = 3 (4%)	0 (0 %)	2 (67 %)	1 (33 %)							
PSA-Nachuntersuchung ^c				0,197						
negativ: n = 43	25 (58 %)	15 (35 %)	3 (7 %)							
positiv: n = 27	12 (44 %)	10 (37 %)	5 (19 %)							
Tumorvolumen (cm ³) ^d	7,7 ± 5.8	$6,5\pm6,3$	16,2 ± 17,8	0,03						

Tabelle 5.1: Ergebnisse der FISH-Analyse von 80 Prostatakarzinomen mit Sonden für das AR-Gen und das Zentromer des X-Chromosoms^a.

^a) Angegeben ist die jeweilige Anzahl (Prozentwert) der analysierten Prostatakarzinome;

^b) P-Wert ermittelt mit Kruskal-Wallis-Test oder dem generalisierten Fisher-Exakt-Test

^c) 70 untersuchte Prostatakarzinome

^d) Mittelwert ± Standardabweichung

Prostatakarzinome mit zusätzlichen Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom wiesen signifikant häufiger ein höheres Tumorvolumen auf (P = 0,03; Tabelle 5.1). Karzinome mit über 20% auffälligen Zellkernen zeigten ein Durchschnittsvolumen von 16,2 cm³. Dagegen wurde ein durchschnittliches Tumorvolumen von 7,2 cm³ bei Prostatakarzinomen mit weniger als 20 % auffälligen Kernen gefunden.

Die klinischen Daten der 9 auffälligen Patienten sind in der Tabelle 5.2 zusammengefasst. Von diesen Patienten wurde auch der Nichttumor-Anteil der Prostata untersucht, wobei zwischen 71,9 bis 92,5% weniger auffällige Zellkerne mit zusätzlichen Kopien für das AR-Gen und X-Zentromer gefunden wurden, als die Ergebnisse aus den Karzinomen zeigten.

Tabelle 5.2: Klinische Daten der Patienten mit Prostatakarzinomen mit mehr als 20% auffälliger Kerne mit zusätzlichen Signalen für das AR-Gen und das X-Chromosom^a.

Patient	Zellkerne mit zusätzlichen Signalen	Tumor- stadium	Gleason Score	Alter (Jahre)	Tumor- volumen (cm ³)	PSA [♭] (ng/ml)	PSA Nachunter- suchung
4 ^c	38,5%	pT4,pN1	4+3	59	9,3	38,8	pos.
8	31,5%	pT3b,pN0	4+3	59	16,2	5,5	neg.
17	20,0%	pT4,pN0	4+3	61	34,1	7,2	pos.
21	30,5%	pT2b,pN0	3+4	62	7,9	21,7	pos.
32	31,5%	pT3a,pN0	3+4	62	2,4	3,2	k.A.
40	32,0%	pT3a,pN0	3+2	62	7,9	10,3	neg.
46	46,5%	pT2a,pN0	4+3	59	0,9	9,1	neg.
55	45,5%	pT4,pN0	5+4	55	58,1	k.A.	pos.
69	21,5%	pT4a,pN0	2+4	67	8,9	16,8	neg.

^a k.A.: keine Angaben

^c Patient verstorben

Eine Polysomie des X-Chromosoms wurde bereits in publizierten Studien beschrieben (Baretton et al., 1994; Brothman et al., 1994; Brown et al., 1994; Henke et al., 1994; Erbersdobler et al., 1997; Miyoshi et al., 2000; Edwards et al., 2001). In diesen Studien wurde eine Polysomie des X-Chromosoms in 0 bis 44 % der untersuchten Prostatakarzinome gefunden. Jedoch ist auch hier der Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den genannten Publikationen aus den im Kapitel 5.1.2 (Cut-off-Level) genannten Gründen schwierig. Ein weiteres Problem stellen die z.T. kleinen publizierten Patientenkollektive (20 bis 40 Fälle) dar, die eine genaue statistische Aussage nicht immer ermöglichen.

^b PSA-Konzentration vor der Operation

5.1.4 Dreifarben-FISH mit zentromerspezifischen Sonden für die Chromosomen X, Y und 18

Der Einsatz der Dreifarben-FISH mit zentromerspezifischen Sonden für die Chromosomen X, Y und 18 sollte der Überprüfung der auffälligen Ergebnisse der ersten FISH-Analyse mit den beiden Sonden für das AR-Gen und das X-Zentromer dienen. Insgesamt wurden bei der ersten FISH-Analyse bei 9 Prostata-Karzinomen zusätzliche X-Chromosomen und AR-Gene in mehr als 20 % der analysierten Zellkerne gefunden. Das Tumorgewebe dieser 9 Patienten wurde zusätzlich mit dem Sondenmix aus den drei zentromerspezifischen Sonden untersucht. Um ein größeres Spektrum zu testen, wurden 8 weitere Prostatakarzinome untersucht, die ebenfalls mit der Sonde für das AR-Gen und der zentromerspezifischen Sonde des X-Chromosoms getestet worden sind, aber unter dem Cut-off-Wert lagen. Von allen 17 Prostatakarzinomen wurde auch das Nichttumorgewebe mit den drei Zentromer-Sonden analysiert.

Der Vorteil der Dreifarben-FISH liegt in der parallelen Auswertung der drei eingesetzten Sonden. Dabei wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen Signalmustern gefunden, was die Auswertung der Ergebnisse der Dreifarben-FISH schwierig machte. Da einige Signalmuster nur in wenigen Zellkernen gefunden wurden, ist der Vergleich von Tumor- und Nichttumorgewebe und zwischen den untersuchten Prostatakarzinomen schwer.

Die FISH-Analysen mit der zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom aus der Zweifarben-FISH zeigte bei den meisten Patienten eine Übereinstimmung sowohl im Tumorals auch im Nichttumorgewebe mit der Dreifarben-FISH (s. Tabelle 5.3). Es ist auffallend, dass bei einigen Patienten die Dreifarben-FISH eine geringere Anzahl an Kernen zusätzlicher X-Chromosomen aufwies. Weiterhin zeigte die Dreifarben-FISH in mehr Kernen keine X-Chromosomen als die Zweifarben-FISH. Lediglich bei Patient 8 konnten im Tumorgewebe in 42,5 % der analysierten Zellen zusätzliche Signale für das X-Chromosom mit der Zweifarben-FISH gefunden werden. Die Dreifarben-FISH wies dagegen nur in 30,5 % der analysierten Zellen zusätzliche X-Chromosomen auf.

Die Beurteilung der Ergebnisse aus beiden Sondensystemen zeigte, dass die Überprüfung der Ergebnisse aus der Zweifarben-FISH mit der Dreifarben-FISH eine wichtige Kontrolle war. Die geringen Unterschiede (außer Patient 8) können methodisch bedingt sein, da die Dreifarben-FISH immer nach dem Abschluss der Zweifarben-FISH erfolgte. Das zeitliche Problem war bei der verwendeten Methode der Kernisolierung nach Liehr et al. (1995) sehr groß, da nach wenigen Wochen in der Zellsuspension keine Kerne mehr nachweisbar waren. Diese Problematik kann die Unterschiede in den FISH-Ergebnissen erklären, da in einigen Fällen weniger Zellen mit zwei X-Chromosomen als auch weniger Zellen mit drei oder mehr X-Chromosomen gefunden worden sind. Von diesem Standpunkt aus kann auch die höhere

Zahl von Zellen mit keinem X-chromosomenspezifischen Signal bei der Dreifarben-FISH erklärt werden.

Tabelle 5.3: Gegenüberstellung der FISH-Ergebnisse mit der zentromerspezifischen Sonde für das X-Chromosom aus der Zweifarben-FISH und der Dreifarben-FISH bei Patienten mit zusätzlichen X-Chromsomen in mehr als 20 % der analysierten Zellkerne

Patient		Auswertung CEPX-Sonde Zweifarben-FISH (AR/CEPX)			Auswertung CEPX-Sonde Dreifarben-FISH (CEPX/Y/18)		
		0x X	1x X	≥2x X	0x X	1x X	≥2x X
4	Tu	0,0%	58,0%	41,0%	2,0%	63,0%	36,5%
	NT	0,0%	88,0%	10,5%	0,0%	92,5%	7,5%
8	Tu	1,0%	59,0%	42,5%	3,0%	66,0%	30,5%
	NT	0,0%	89,0%	8,0%	2,5%	89,0%	8,5%
17	Tu	0,0%	80,5%	20,0%	0,0%	76,0%	24,5%
	NT	0,0%	96,5%	3,5%	0,0%	96,0%	3,5%
21	Tu	0,5%	69,5%	31,0%	0,5%	68,5%	31,5%
	NT	0,0%	92,0%	6,0%	0,0%	93,5%	6,5%
32	Tu	0,5%	70,0%	34,5%	1,0%	63,5%	35,5%
	NT	0,0%	94,0%	6,0%	0,0%	94,5%	5,5%
40	Tu	0,0%	70,0%	32,0%	1,5%	63,0%	34,5%
	NT	0,0%	91,0%	9,0%	0,0%	92,5%	6,5%
46	Tu	0,0%	53,0%	47,0%	2,0%	54,5%	43,0%
	NT	0,0%	97,0%	3,5%	0,0%	96,0%	4,5%
55	Tu	0,0%	53,5%	45,5%	0,0%	53,5%	46,5%
	NT	0,0%	91,5%	8,5%	0,0%	91,5%	8,5%
69	Tu	0,0%	78,5%	21,5%	0,5%	81,0%	21,0%
	NT	0,0%	94,5%	5,5%	0,0%	97,0%	3,5%

Bei der Auswertung der Dreifarben-FISH stellte sich heraus, dass die Polysomie des X-Chromosoms nicht allein auf eine Tetraploidie der Zelle zurückzuführen ist. Zellen mit zwei Signalen für das X-Chromosom zeigten die folgenden Signalmuster für die Chromosomen Y und 18: (1) ein Chromosom Y und zwei Chromosomen 18 (Disomie des X-Chromosoms), (2) zwei Chromosomen Y und vier Chromosomen 18 (Tetraploidie), (3) je ein Chromosom Y
bzw. 18, (4) je zwei Chromosomen Y bzw. 18 und (5) ein Chromosom Y und vier Chromosomen 18.

Ein tetraploides Signalmuster in mehr als 10 % der analysierten Zellkerne wurde bei 6 der 17 analysierten Prostatakarzinome gefunden. Alle 6 Karzinome, bei denen ein tetraploides Signalmuster gefunden wurde, hatten Gleason Scores von 7 oder 9. Fünf der sechs Patienten mit Tetraploidie hatten einen positiven PSA-Anstieg nach der Prostatektomie, bei dem sechsten Patienten wurden keine PSA-Messungen nach der Operation durchgeführt. Dagegen scheint der Verlust eines der untersuchten Chromosomen X, Y oder 18 ein eher seltenes Ereignis zu sein und wurde sowohl im Tumor- als auch im Nichttumorgewebe gefunden. Es ist möglich, dass diese Verluste ein genetisches Ereignis darstellen, aber auch durch eine schlechte Hybridisierung oder angeschnittene Zellkerne entstanden sein könnten.

5.1.5 Statistische Auswertung der FISH-Ergebnisse

Prostatakarzinome mit einer Polysomie des X-Chromosoms wurden in allen pathologischen Stadien und Gleason Scores gefunden. Dabei korreliert das Auffinden der Polysomie des X-Chromosoms mit der pathologischen Tumorklassifikation (P = 0,016), Gleason Score (P = 0,015) und dem Tumorvolumen (P = 0,03). Allerdings ist die statistische Auswertung der FISH-Ergebnisse mit den klinischen Daten schwierig, da die Anzahl an Patienten mit seltenen Tumorstadien (pT2a und pT4) oder hohen Gleason Scores (Gleason Score 8 und 9) niedrig war.

Keine statistische Signifikanz wurde zwischen den FISH-Analysen und den Ergebnissen der PSA-Nachuntersuchung gefunden (P = 0,197). Einen positiven PSA-Anstieg nach der Prostatektomie wurde bei 27 der 70 untersuchten Patienten mit einer PSA-Nachuntersuchung gefunden. 43 Patienten zeigten keinen PSA-Anstieg nach der Entfernung der Prostata. Das untersuchte Karzinomgewebe stammte von Patienten, die zwischen 1994 und 1998 behandelt wurden. Möglicherweise war in einigen Fällen die Zeit der Nachuntersuchung noch zu kurz, so dass Patienten mit einem späteren PSA-Anstieg noch nicht erfasst werden konnten.

5.1.6 Auswirkung der Polysomie des X-Chromosoms

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sind zusätzliche X-Chromosomen bei einer Gruppe von primären Prostatakarzinomen vor einer Antiandrogentherapie zu finden. Die FISH-Analysen konnten weiterhin zeigen, dass diese zusätzlichen X-Chromosomen auch das AR- Gen enthalten. Da anzunehmen ist, dass die zusätzlichen X-Chromosomen aktiv sind, müssten ebenfalls weitere X-chromosomale Gene exprimiert werden.

Es ist möglich, dass Patienten, deren primäres Prostatakarzinom bereits zusätzliche X-Chromosomen einschließlich des AR-Gens besitzt, schlecht auf eine Antiandrogentherapie ansprechen könnten, und es zu einer erneuten Progression des Prostatakarzinoms kommt. Bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen wurden in bis zu 60 % der untersuchten Karzinome zusätzliche X-Chromosomen gefunden (Visakorpi et al., 1995b; Bubendorf et al., 1999; Koivisto et al., 1997; Gregory et al., 1998; Miyoshi et al., 2000; Kaltz-Wittmer et al., 2000; Linja et al., 2001). Durch die Antiandrogentherapie, z.B. nach einer Orchiektomie, wird die Androgen-Konzentration stark vermindert. Allerdings werden auch von der Nebennierenrinde Androgene gebildet, die den AR aktivieren können. Da das Prostatakarzinom in seinem Wachstum stark androgenabhängig ist, kann vermutet werden, dass Prostatakarzinome mit einer Polysomie des X-Chromosoms möglicherweise einen Wachstumsvorteil auch bei sehr geringen Androgenkonzentrationen aufweisen. Um diese Theorie zu bestätigen, wäre es nötig, eine höhere Anzahl von Prostatakarzinomen zu untersuchen. die bereits primär eine Antiandrogenresistenz zeigten. Bei diesen Prostatakarzinomen müsste zur Bestätigung dieser Theorie in einem höheren Prozentsatz eine Polysomie des X-Chromosoms gefunden werden. Amplifikationen des AR-Genlokus wurden bisher nur bei Patienten mit sekundärer Resistenz gegenüber der Antiandrogentherapie, nicht jedoch bei Prostatakarzinomen mit primärer Hormonresistenz gefunden (Montgomery et al., 2001). Allerdings schließt wie o.g. die Amplifikation eines Gens nicht die Polysomie des gesamten Chromosoms mit ein. Jedoch muss im Fall einer Polysomie des X-Chromosoms auch von zusätzlichen Kopien des AR-Gens ausgegangen werden, die exprimiert werden können und somit zu einem erhöhten AR-Proteinlevel führen würden.

5.2 Das DICE1-Gen

Eine der häufigsten Veränderungen bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen sind allelische Deletionen (loss of heterozygosity; LOH) in der Chromosomenregion 13q14. In dieser Region ist das Retinoblastom-prädisponierende Gen 1 (RB1) lokalisiert. Eine Inaktivierung des RB1-Gens wurde bei einer Vielzahl von Tumoren beschrieben (Goodrich und Lee, 1993). Neuere LOH-Untersuchungen der Chromosomenregion 13q14 bei Prostata-, Lungenund Ovarialkarzinomen weisen aber darauf hin, dass diese Region zusätzlich zum RB1-Gen weitere Tumorsuppressorgene beherbergt (Li et al., 1998; Afonso et al., 1999; Ueda et al., 1999; Yin et al., 1999; Chen et al., 2001). Durch LOH-Analysen wurden die Gene LEU1 und LEU2 identifiziert, die als Tumorsuppressorgene vorgeschlagen wurden und in der Entwicklung von chronischen myeloischen Leukämien (CML) eine entscheidende Rolle spielen (Liu et al., 1997). Durch genomische Differenzklonierung und positionelle Klonierung konnte weiterhin das DICE1-Gen in der kritischen LOH-Region 13q14 isoliert werden (Wieland et al. 1999). Das DICE1-Gen besitzt ebenfalls eine Tumorsuppressor-Funktion, wie an verschiedenen Lungenkarzinomen festgestellt werden konnte (Wieland et al., 1999; Wieland et al., 2001).

Bei Prostatakarzinomen wurde seltener eine LOH an dem Mikrosatellitenmarker D13S272 in dem Bereich des LEU1- und LEU2-Gens gefunden (Simpson et al., 1999; Ueda et al., 1999; Yin et al., 1999). Daher ist es nicht eindeutig, ob diese beiden Gene als Tumorsuppressor-Gene beim Prostatakarzinom wirken. Prostatakarzinome zeigen dagegen häufig eine LOH mit dem Mikrosatellitenmarker D13S284, der distal von den Mikrosatellitenmarkern D13S153 (RB1-Gen) liegt (Ueda et al., 1999; Yin et al., 1999). Mit Hilfe von YAC-Klonen konnte die Kolokalisierung dieses Mikrosatellitenmarkers mit dem DICE1-Gen dargestellt werden (Wieland et al., 2001).

Aufgabe dieses Teils der Arbeit war die Klärung der molekularen Rolle des DICE1-Gens in Prostatakarzinom-Zellen. Dazu sollte der DICE1-Promotor identifiziert und der Einfluss der Promotormethylierung auf die DICE1-Expression untersucht werden. Die DICE1-Expression bei Prostatakarzinomen sollte analysiert werden und mit normalem Prostatagewebe verglichen werden. In diese Untersuchungen wurden auch Prostatakarzinom-Zelllinien eingeschlossen. Bei einer verminderten DICE1-Expression sollte der Methylierungsstatus des DICE1-Promotors mittels der Bisulfitmethode und anschließender Sequenzierung überprüft werden.

5.2.1 Identifizierung des DICE1-Promotors

Bei der Überprüfung der DNA-Sequenz konnte im unmittelbaren Bereich vor dem DICE1-Gen ein hoher Anteil an G- und C-Nukleotiden erkannt werden. Insgesamt zeigte die 846bp lange analysierte DNA in 340 Positionen ein Cytosin und in 247 Positionen ein Guanosin. Daraus ergibt sich für diesen 846bp-Bereich ein Gehalt an G- und C-Nukleotiden von 69,4%. Dieser hohe G- und C-Nukleotid-Anteil ließ auf eine mögliche Promotorfunktion der untersuchten DNA-Sequenz schließen, da Promotorsequenzen einen höheren Anteil an Gund C-Nukleotiden und den sogenannten CpG-Dinukleotiden (Abkürzung für ein C-Nukleotid, das über eine 3'-5' Phosphordiesterbindung an ein G-Nukleotid gebunden ist) aufweisen als die restliche DNA (Josse et al., 1961; Swartz et al., 1962). CpG-Dinukleotide sind selten im menschlichen Genom zu finden (Bird, 1980). Allerdings enthält das menschliche Genom Bereiche, in denen es zu einer Ansammlung von CpG-Dinukleotiden kommt, die als CpG- Inseln bezeichnet werden (Bird, 1986; Takai und Jones, 2002). Das menschliche Genom enthält schätzungsweise 45000 dieser CpG-Inseln, die meist in Verbindung mit einem Promotor stehen (Antequera und Bird 1993; Costello et al., 2000). Als CpG-Insel wird definitionsgemäß eine DNA-Sequenz bezeichnet, die einen Gehalt an G- und C-Nukleotiden von mehr als 50 % und ein Verhältnis von beobachteten gegen statistisch erwarteten CpG-Dinukleotiden größer 0,5 zeigt (Gardiner-Garden und Frommer, 1987). Innerhalb der untersuchten DNA-Sequenz vor dem DICE1-Gen wurde ein 681 bp großes Fragment isoliert, das im Durchschnitt einen Anteil an G- und C-Nukleotiden von 70 % und ein Verhältnis von beobachteten gegen statistisch erwarteten CpG-Dinukleotiden größer 0,8 zeigte. Damit kann dieser Bereich als eine CpG-Insel bezeichnet werden.

Der DNA-Bereich, der unmittelbar vor dem DICE1-Gen liegt, wurde mittels des Computerprogramms "Promotor Search Program" (www.genomic.sanger.ac.uk) analysiert. Dieses Computerprogramm analysiert die vorgegebene DNA-Sequenz nach konservierten Sequenzen, die in eukaryotischen Promotoren gefunden werden. Solche konservierten DNA-Sequenzen sind die TATA-Box mit der Consensus-Sequenz TATAAA, GC-Boxen (Consensus-Sequenz GGGCGG) und CAAT-Boxen (Consensus-Sequenz CCAAT). Eine TATA-Box muss nicht in allen Promotoren gefunden werden. Z.B. zeigen die Promotoren von Haushaltsgenen (housekeeping genes) keine TATA-Boxen, dafür aber GC-Boxen (Strachan und Read, 1996). Durch das "Promotor Search Program" wurden in dem untersuchten DNA-Bereich vor dem DICE1-Gen zwei Sequenzen identifiziert, die eine mögliche Promotoreigenschaft besitzen. Der Promotor 1 wurde in dem Sequenzbereich von -456 bis -161 bp und der Promotor 2 im Bereich -804 bis -604 bp vor dem cDNA-Start lokalisiert. Im Promotor 1 wurde eine TATA-Box -167 bis -175 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt identifiziert. Beide Promotoren zeigen einen hohen Anteil an G- und C-Nukleotiden und an CpG-Dinukleotiden.

Durch ein weiteres Computerprogramm, das "Transcription Element Search Program" (TESS; www.cbil.upenn.edu), konnte in der analysierten DNA-Sequenz eine Vielzahl von potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen identifiziert werden. Die Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen im unmittelbaren Bereich vor dem DICE1-Gen ist ein Hinweis auf einen möglichen Promotor, da Transkriptionsfaktoren zusammen mit anderen Proteinen den transkriptionsaktivierenden Komplex bilden, der die Transkription der DNA in die RNA initiieren.

5.2.2 Identifizierung eines 13-bp-Deletionspolymorphismus im DICE1-Promotor

Bei der Sequenzierung der 5' vor dem DICE1-Gen liegenden Sequenz ist eine 13-bp-Deletion im Bereich von -619 bis -631 bp vor dem cDNA-Startpunkt des DICE1-Gens aufgefallen. Dabei wurde die Wiederholung der Repeatstruktur (CGCGCCGGGGCGG)₂ ausgeschnitten. Der Bereich, in dem die Deletion gefunden wurde, zeigt einen sehr hohen Anteil an G- und C-Nukleotiden. Zur Ermittlung der Häufigkeit der 13-bp-Deletion wurden insgesamt 201 nichtverwandte Personen (101 Männer und 100 Frauen) untersucht. Dabei zeigte sich bei der Verteilung der Allele ein geringer Unterschied zwischen Männern und Frauen. Bei Männern wurde häufiger das Allel mit der 13-bp-Deletion gefunden als bei Frauen (21,3 % bei Männern vs. 15,5 % bei den Frauen). Dies könnte von funktioneller Bedeutung sein, hinsichtlich eines erhöhten Tumorrisikos bei Männern (Cahill et al., 1999). Jedoch konnte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (P = 0,211) als auch des Likelihood-Quotienten (P = 0,195) keine statistische Signifikanz zwischen den untersuchten weiblichen und männlichen Kontrollpersonen bestimmt werden. Allerdings ist die Anzahl der Kontrollpersonen, die auf beiden Allelen die 13-bp-Deletion zeigten, bei beiden Geschlechtern gering, so dass die Aussage, besonders des Chi-Quadrat-Tests schwierig ist. Eine Erhöhung beider Kontrollgruppen auf jeweils 200 Personen könnte hier ein statistisch sichereres Ergebnis liefern.

Shin et al. (2004) konnten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine Mutation im Promotor des E-cadherin-Gens feststellen. Bei der Untersuchung von 260 Patienten und 147 Kontrollpersonen konnte bei Patienten mit der Promotormutation ein um das 1,75fache erhöhtes Risiko für ein kolorektales Karzinom festgestellt werden. Eine funktionelle Promotoranalyse ergab bei den mutierten Promotoren eine verminderte Aktivität im Verhältnis zur normalen Promotorsequenz des E-cadherin-Gens (Shin et al., 2004).

5.2.3 Funktionelle Charakterisierung des DICE1-Promotors

Durch das Promotor Search Program wurden im 5'-Bereich vor dem DICE1-Gen zwei mögliche Promotoren identifiziert. Diese Vorhersage musste funktionell überprüft werden. Für die Überprüfung wurden zwei verschiedene Testsysteme eingesetzt, einerseits der β-Galaktosidase Reporter Assay, mit dem acht Fragmente des vorhergesagten Promotors analysiert wurden, andererseits der *band shift* Assay, mit dessen Hilfe Bindestellen von Transkriptionsfaktoren nachgewiesen wurden. Als dritte Methode zur funktionellen Charakterisierung des Promotors wurde der Methylierungsstatus von Zelllinien mit unterschiedlicher DICE1-Expression (Wieland et al., 1999) untersucht.

5.2.3.1 Nachweis der Promotoraktivität mit dem β-Galaktosidase Reporter Assay

Eine Möglichkeit der funktionellen Überprüfung bietet der β-Galaktosidase Reporter Assay. Bei diesem Assay handelt es sich um ein Reportersystem, bei dem der Vektor vor dem E. coli β-Galaktosidase-Gen lacZ keinen Promotor hat. Anstelle des Promotors befindet sich vor dem lacZ-Gen eine Klonierungsstelle für die zu untersuchende DNA-Sequenz. COS-7-Zellen wurden mit diesen β-Galaktosidase-Konstrukten transfektiert und die Expression des lacZ-Gens durch die Hydrolyse von ortho-Nitrophenyl-β-Galaktopyranosid (ONPG) zu ortho-Nitrophenyl gemessen. Kommt es durch die klonierten DNA-Fragmente zu einer Expression des *lacZ*-Reportergens, wird die Hydrolyse durch die β-Galaktosidase katalysiert. Daher lässt sich von der Expression des lacZ-Gens auf die Promotoraktivität des klonierten DNA-Fragments schließen. Untersucht wurden acht überlappende Fragmente der 5'-flankierenden Sequenz des DICE1-Gens. Durch diesen Assay konnte bei dem β-Galaktosidase-Konstrukt, das den gesamten untersuchten DICE1-Promotor von 804 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt enthält, eine β-Galaktosidase-Aktivität festgestellt werden. Diese 804 bp enthalten beide durch das Computerprogramm "Promoter Search Program" vorhergesagten Promotoren. Durch Deletionen dieses 804-bp-Fragmentes konnte die DNA-Sequenz, die eine β-Galaktosidase-Aktivität zeigte, weiter eingegrenzt werden. Dabei konnte nur im Bereich des vorhergesagten Promotors 1 (Sequenzbereich -456 bis -161 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt) eine Promotoraktivität festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte im vorhergesagten Promotor 2 (Sequenzbereich -804 bis -604 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt) keine β -Galaktosidase-Aktivität gefunden werden. Das kleinste Fragment, das eine β-Galaktosidase-Aktivität von über 50 % zeigte, war das Fragment DICE1Prom6 (Sequenzbereich -239 bis +42 bp vor bzw. nach dem cDNA Startpunkt). In diesem primären Promotor wurde eine β-Galaktosidase-Aktivität von 82,8 % in Bezug auf die β-Galaktosidase-Aktivität des frühen SV40-Promotors gemessen. In dem Promotorfragment DICE1Prom5, das den primären Promotor und zusätzlich 180 bp 5' von DICE1Prom6 enthält, reduziert sich die β-Galaktosidase-Aktivität des primären Promotors um 36 % auf 53,2 % der β-Galaktosidase-Aktivität des frühen SV40-Promotors. DICE1Prom 5 enthält den Bereich von -425 bis +42 bp vor bzw. nach dem cDNA-Startpunkt und somit einen großen Anteil des vorhergesagten Promotors 1. Die verminderte
ß-Galaktosidase-Aktivität lässt auf mögliche Sequenzelemente schließen, die einen negativen Einfluss auf die Transkription ausüben. Der Unterschied des primären Promotors DICE1Prom6 zur Gesamtsequenz DICE1Prom1 mit einer β-Galaktosidase-Aktivität von 82,8 % bzw. 125,6 % (jeweils in Bezug auf den frühen SV40-Promotor) demonstriert, dass die Sequenz vor dem primären Promotor möglicherweise Enhancer-Elemente enthält, die die Promotoreigenschaft des primären Promotors DICE1Prom6 verstärken. Ein Kandidat für dieses Enhancer-Element wäre die

Bindungssequenz für die Transkriptionsfaktoren ATF1 und CREB an der Position –453 bis – 460 vor dem Transkriptionsstartpunkt. ATF1-Homodimere oder ATF1/CREB-Heterodimere können an cAMP-responsive Elemente (CRE) in Promotorsequenzen binden und die Transkription der Zielgene aktivieren (Leeet al., 1993; Liu et al., 1993).

Der 13-bp-Deletion-Polymorphismus, der im Rahmen der Sequenzüberprüfung der 5' vor dem DICE1-Gen liegenden DNA-Sequenz gefunden wurde, führt zu einer Verminderung der β -Galaktosidase-Aktivität des DICE1Prom1-Fragmentes um 10% in den untersuchten COS-7-Zellen. In dem Bereich der 13-bp-Deletion, die in einer Repeatstruktur liegt, wurden Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren CP1, SP1 und ETF lokalisiert. Darauf ist die Verminderung der Promotoraktivität möglicherweise zurückzuführen. Ebenfalls wären Enhancer, die an diesen Sequenzabschnitt binden könnten, für die Herabsetzung der β -Galaktosidase-Aktivität in der deletierten DNA verantwortlich. Allerdings wurden durch das eingesetzte Computerprogramm in diesem DNA-Bereich keine Enhancer-Bindestellen gefunden.

Eine verminderte Genexpression wird assoziiert mit einer Methylierung der CpG-Dinukleotide im Promotorbereich, da dadurch die Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können (Deng et al., 2001). Zur Überprüfung, ob auch bei den untersuchten DICE1-β-Galaktosidase-Konstrukten eine verminderte β-Galaktosidase-Aktivität durch Methylierung gefunden wird, wurden die Fragmente DICE1Prom1, das Promotorfragment mit dem gesamten DICE1-Promotor und der primäre DICE1-Promotor (DICE1Prom6) in vitro mit der Sssl-Methylase methyliert. Bei den beiden methylierten DICE1-β-Galaktosidase-Konstrukten wurde eine stark verminderte β-Galaktosidase-Aktivität gemessen. Das methylierte DICE1Prom6-Konstrukt zeigte keine β-Galaktosidase-Aktivität. DICE1Prom1 wies nach der Methylierung nur noch eine Restaktivität der β-Galaktosidase von 4,9% auf. Als Kontrolle wurde auch das SV40-Promotor-Konstrukt analog der DICE1-Konstrukte methyliert. Dabei wurde für das methylierte Kontrollkonstrukt eine um 18 % verminderte β-Galaktosidase-Aktivität in Bezug auf die β-Galaktosidase-Aktivität des nichtmethylierten SV40-Promotors gefunden. Im frühen SV40-Promotor sind nur wenige CpGs vorhanden. Daher kann mit diesem Kontrollexperiment ausgeschlossen werden, dass eine Methylierung auch anderer Bereiche des pBlue-TOPO-Vektors einen Einfluss auf die β-Galaktosidase-Expression zeigt. Ahnliche Werte wurden auch in der Literatur von Deng et al., 2001 und Mancini et al., 2001 beschrieben.

5.2.3.2 Nachweis von Transkriptionsfaktor-Bindestellen im DICE1-Promotor

Als zweite Methode zur funktionellen Überprüfung des DICE1-Promotors wurde der *band shift* Assay (Promega Corporation; Madison, USA) angewandt. Dabei macht man sich die

Eigenschaft von Promotorsequenzen zu Nutze, Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu haben. So wurden im Promotor des DICE1-Gens, wie bereits beschrieben, verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindestellen gefunden. Bei dem band shift Assay kommt es durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotorsequenzen zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität der DNA-Protein-Komplexe (Ausubel et al. 1989). Die DNA-Protein-Komplexe laufen auf Grund ihrer veränderten räumlichen Struktur langsamer durch ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel als ungebundene doppelsträngige DNA. Bei der Überprüfung des DICE1-Promotors war es durch den hohen Anteil von G- und C-Nukleotiden nicht möglich, einen kleinen Bereich des Promotors zu amplifizieren. Daher wurde Promotorfragment DICE1Prom6 amplifiziert und das auf mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen untersucht. Das DICE1Prom6 PCR-Produkt ist das kleinste untersuchte Fragment, welches auch im β-Galaktosidase-Assay eine Promotoraktivität zeigte. DICE1Prom6 wurde radioaktiv mit α[³²P]-dCTP markiert, mit dem HeLa-Kernextrakt inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei konnte auf dem Röntgenfilm zwischen den Spuren mit DNA ohne Kernextrakt und den Spuren mit Kernextrakt ein erheblicher Unterschied, also ein "band shift", festgestellt werden. In diesen Spuren hatten sich DNA-Protein-Hybride gebildet, die zu der veränderten Laufeigenschaft im Polyacrylamid-Gel führten. Durch die Größe des PCR-Produktes von 281 bp sind in diesem Fragment viele unterschiedliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu erwarten, die vom Kernextrakt erkannt werden. Das Experiment mit radioaktiv nicht markiertem und α[³²P]-markiertem DICE1Prom6 zeigte nur eine schwache Bande im Bereich der ungebundenen DNA, wie sie bei der Negativkontrolle aus of³²P]-markiertem DICE1Prom6 ohne HeLa Kernextrakt gefunden wurde. Die unmarkierte DNA müsste einen großen Anteil der Transkriptionsfaktoren binden, die somit nicht mehr für das radioaktiv markierte DICE1Prom6-Fragment zur Verfügung stehen. Auf Grund der Größe des untersuchten Promotorfragments DICE1Prom6 und der großen Menge an verschiedenen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in diesem Fragment konnten scheinbar immer noch genügend Transkriptionsfaktoren aus dem HeLa-Kernextrakt an dem g³²P]-markierten DICE1Prom6 binden und den auf dem Röntgenfilm sichtbaren band shift auslösen. Ausgelegt ist der eingesetzte band shift Assay von der Firma Promega auf den Nachweis von Transkriptionsfaktoren mit definierten Oligonukleotiden, die nur eine spezifische Erkennungssequenz von Transkriptionsfaktoren besitzen. Er wurde auf das für diese Arbeit nötige Protokoll umgestellt.

5.2.3.3 Promotormethylierung bei Verlust der DICE1-Expression

Wieland et al. (1999) konnten darstellen, dass das DICE1-Gen in den nichtkleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien Calu3, SK-MES1 und SK-LC12 eine verminderte Expression zeigt, wogegen SW-900 eine ähnliche DICE1-Expression aufweist, wie das normale Lungengewebe. Diese vier Zelllinien wurden ausgewählt, um den DICE1-Promotor auf CpG-Methylierungen zu untersuchen. Des weiteren wurde DNA aus Gewebe von zwei Lungenkarzinomen und einer normalen Lunge analysiert. Ca. 56% der menschlichen Gene besitzen in ihrem 5'-Promotor CpG-Inseln, die gewöhnlicherweise nicht-methyliert vorliegen (Antequera und Bird 1993; Santini et al., 2001). Eine Methylierung von CpG-Dinukleotiden in der menschlichen DNA hat weitreichende epigenetische Folgen auf die zelluläre Entwicklung und Differenzierung (Bird, 2002). CpG-Inseln, die methyliert vorliegen, blockieren die Expression des entsprechenden Gens, da der transkriptionsaktivierende Proteinkomplex aus Transkriptionsfaktoren nicht binden kann. Die Blockierung erfolgt durch die Bindung des Methyl-Cytosin-Bindeproteins (MBP) und des Histon-Deacetylase-Proteins (HADCs). Weiterhin wird der methylierte Promotor für DNA-Methyltransferasen zugänglich, und der Promotor wird von transkriptionsinaktivierendem Chromatin umlagert (Jones und Laird, 1999; Jones und Baylin, 2002).

Die Analyse der DNA aus den Lungenkarzinom-Zelllinien und den Lungengeweben wurde mit methylsensitiven Restriktionsenzymen und anschließender PCR durchgeführt. Die eingesetzten methylsensitiven Restriktionsenzyme spalten spezifisch die Erkennungssequenzen, bei denen die CpG-Dinukleotide nichtmethyliert vorliegen. Durch diese methylsensitiven Restriktionsenzyme konnte bei den eingesetzten Zelllinien ein Methylierungsmuster identifiziert werden, welches mit den Expressionsdaten korreliert.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der 5' vor dem DICE1-Gen gelegenen Sequenz um den Promotor des DICE1-Gens handelt. Weiterhin konnte bei Zelllinien mit verminderter DICE1-Expression eine Methylierung von CpG-Dinukleotiden festgestellt werden.

Eine Studie von Li et al. zeigte bei 75% der untersuchten Ösophaguskarzinome eine LOH im Bereich der chromosomalen Region 13q14 (Li et al., 2003). Jedoch wurde in dieser Studie nicht der DICE1-Promotor nach möglichen Methylierungen untersucht, sondern das DICE1-Gen auf Mutationen analysiert. In nur 5% der analysierten Ösophaguskarzinome mit LOH im Bereich des DICE1-Gens konnten somatische Mutationen im kodierenden Bereich des DICE1-Gens identifiziert werden (Li et al., 2003). Diese geringe Anzahl an Mutationen bei Ösophaguskarzinomen mit LOH in 13q14 zeigt, dass die Expression des DICE1-Gen bei

5.2.4 Nachweis der Tumorsuppressoraktivität des DICE1-Gens in Prostatakarzinom-Zelllinien

Die zuvor gewonnenen Daten bei der funktionellen Charakterisierung des DICE1-Promotors sollten in diesem Teil der Arbeit auf das Prostatakarzinom angewandt werden. Wie bereits beschrieben, wurde mit dem Mikrosatellitenmarker D13S284, der mit dem DICE1-Gen kolokalisiert, die höchste LOH-Rate bei Prostatakarzinomen im Chromosom 13 gefunden (Ueda et al., 1999; Yin et al., 1999; Wieland et al., 2001). Das lässt darauf schließen, dass möglicherweise das DICE1-Gen auch bei Prostatakarzinomen als Tumorsuppressor wirkt. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurden zunächst die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 untersucht. Bei diesen Zelllinien wurde die DICE1-Expression gemessen und mit normalem Prostatagewebe verglichen. Diese Expressionsanalyse erfolgte mittels Realtime-PCR. In der Literatur werden unterschiedliche Berechnungsformeln für die Quantifizierung von Realtime-PCR-Ergebnissen beschrieben (Peirson et al., 2003). In dieser Arbeit wurde die DICE1-Expression nach der Formel: $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ berechnet. Grundlage dieser Formel ist der Threshold Cycle, der den Zyklus der PCR angibt, bei dem die Fluoreszenzintensität erstmals über die Hintergrundfluoreszenz der ersten Zyklen ansteigt (Baseline). Wichtig für die Vergleichbarkeit der Realtime-Experimente ist, dass für ein Primerpaar bei unterschiedlichen Realtime-Experimenten immer die Baseline an die gleiche Fluoreszenzintensität gesetzt wird. Eine Verschiebung der Baseline würde beim Abgleichen der Expressionsdaten mit dem Kontrollgen zu unterschiedlichen relativen Expressionswerten des analysierten Gens führen.

Bei den untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien konnte eine verminderte DICE1-Expression gefunden werden. Wird die DICE1-Expression in der normalen Prostata mit 100 % angesetzt, so ergab sich für die Zelllinie LNCaP eine DICE1-Expression von 16,5 % und für DU-145 von 4,1 %. Zur Abklärung der Ursache dieser verminderten DICE1-Expression wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. Im ersten Versuch sollte untersucht werden, ob Methylierungen im DICE1-Promotor der Grund für die reduzierte DICE1-Expression sind. Der zweite Versuch diente der Beantwortung der Frage, ob die Methylierung des Promotors durch die Einwirkung von 5-Azacytidin rückgängig gemacht und die DICE1-Expression verstärkt werden kann.

5.2.4.1 Nachweis von CpG-Methylierungen im DICE1-Promotor in Prostatakarzinom-Zelllinien

Die de-novo-Methylierung von CpG-Inseln ist bei einer Vielzahl von Karzinomen zu beobachten (Esteller und Herman, 2002). Auch beim Prostatakarzinom wurde bei einigen

Genen die Inaktivierung der Transkription durch Hypermethylierung des Promotors beschrieben (Kinoshita et al., 2000; Kallakury et al., 2001; Fukuhara et al., 2002; Woodson et al., 2003; Nakayama et al., 2004).

Zum Nachweis der Promotor-Methylierungen wurden die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 zunächst mit methylsensitiven Restriktionsenzymen analysiert. Für beide Zelllinien wurde bei den analysierten CpG-Dinukleotiden der 400-bp-Promotorsequenz vor dem Transkriptionsstartpunkt eine starke Methylierung gefunden. Diese Sequenz stimmte mit dem vorhergesagten Promotor 1 überein und entsprach dem Promotorfragment DICE1Prom5, welches im β-Galaktosidase-Konstrukt eine Promotoraktivität zeigte und den primären Promotor DICE1Prom6 enthält. Zusätzlich zu diesem Bereich wurden bei den Prostatakarzinom-Zelllinien auch die noch weiter 5' gelegenen CpG-Dinukleotide analysiert. Diese CpG-Dinukleotide liegen in dem vorhergesagten Promotor 2, der im β-Galaktosidase-Assay keine Promotoraktivität aufwies. In Übereinstimmung mit diesem funktionellen Ergebnis konnten in dieser Promotorsequenz nur selten methylierte CpG-Dinukleotide gesehen werden. Ebenfalls lassen sich die CpG-Methylierungen in der DNA des normalen Prostatagewebes nicht mit der Expression des DICE1-Gens im normalen Prostatagewebe korrelieren.

Aus dem Vergleich der in-vivo-Ergebnisse des β-Galaktosidase-Assays mit den gewonnenen Daten der Methylierung bei Prostatakarzinom- und Lungenkarzinom-Zelllinien lässt sich schließen. dass es sich bei der 400-bp-Sequenz unmittelbar vor dem Transkriptionsstartpunkt um den Promotor des DICE1-Gens handelt. Wird in diesem Bereich die Methylierung der Prostatakarzinom-Zelllinien mit den DICE1-nichtexprimierenden Lungenkarzinomzelllinen verglichen, ist ein ähnliches Methylierungsmuster zu erkennen. Nur am unmittelbaren Transkriptionsstartpunkt ist mit den eingesetzten methylspezifischen Restriktionsenzymen ein Unterschied zu erkennen. Während bei den Lungenkarzinom-Zelllinien die gesamte Auswahl der mit den methylsensitiven Restriktionsenzymen analysierten CpG-Dinukleotide methyliert vorlag, ist bei den Prostatakarzinom-Zelllinien das untersuchte CpG-Dinukleotid am Transkriptionsstartpunkt nicht methyliert.

Dieses DNA-Segment wurde mit der Bisulfitmethode überprüft, um alle CpG-Dinukleotide in dem Bereich zu analysieren. Die Bisulfitmethode ist die chemische Umwandlung aller nichtmethyliert vorliegenden Cytosine in Thymine und erlaubt unterschiedliche Folgeuntersuchungen. Zum einen können die bisulfitmodifizierten DNA-Stränge für methylierungsspezifische PCR-Analysen eingesetzt werden, wobei die Primer so konzipiert sind, dass sie einerseits spezifisch die methylierten CpG-Dinukleotide, andererseits die nichtmethylierten CpG-Dinukleotide erkennen (Herman et al., 1996). Für diese Arbeit wurde die bisulfitmodifizierte DNA durch Sequenzierung analysiert. Vorteil dieser Methode ist die Überprüfung mehrerer CpG-Dinukleotide in einem größeren DNA-Bereich. Durch die

Klonierung der PCR-Produkte und die anschließende Sequenzierung der Plasmid-Klone ist es möglich, einzelne DNA-Stränge zu analysieren (Frommer et al., 1992).

Das Ergebnis der Sequenzierung der bisulfitmodifizierten DNA bestätigte die Aussage der methylierungssensitiven Restriktionsspaltung, dass die verminderte DICE1-Expression in den Prostatakarzinom-Zelllinien DU-145 und LNCaP auf die Promotormethylierung zurückzuführen ist. Nur bei einem CpG-Dinukleotid wurde bei der Bisulfitumwandlung der DNA aus der Zelllinie DU-145 und dem normalen Prostatagewebe ein anderes Ergebnis als bei der Restriktionsspaltung mit den methylsensitiven Restriktionsenzymen gefunden. Nach der Restriktionsspaltung wurde bei DU-145, wie bei LNCaP, bei der anschließenden PCR eine Bande dargestellt, die der ungespaltenen DNA entsprach. Bei der DNA aus dem normalen Prostatagewebe wurde durch die methylsensitiven Restriktionsenzyme eine Hypomethylierung nachgewiesen. Da die Versuche jeweils zweimal durchgeführt wurden, ist ein methodischer Fehler weitgehend auszuschließen. Andererseits wurde bei der Lungenkarzinom-Zelllinie SW-900 und dem normalen Lungengewebe keine bzw. nur eine schwache Bande (Hypomethylierung) dargestellt, so dass eine enzymatische Aktivität bei Pmll vorhanden war. Es ist jedoch möglich, dass nur sehr wenige CpG-Dinukleotide an dieser Position methyliert vorlagen, und die anschliessende semiguantitative PCR nicht ausreichend sensitiv war. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass bei mehr sequenzierten Plasmid-Klonen methylierte Cytosine an dieser Position gefunden worden wären.

Insgesamt wurden 16 CpG-Dinukleotide bei der bisulfitmodifizierten DNA analysiert, davon lagen 13 vor dem Transkriptionsstartpunkt und drei danach. Bei dem normalen Prostatagewebe, in welchem das DICE1-Gen exprimiert wird, konnte in keinem DNA-Klon ein methyliertes CpG-Dinukleotid identifiziert werden. Dagegen zeigten die DNA-Proben der DICE1-nichtexprimierenden Prostatazelllinien nach der Bisulfitumwandlung innerhalb der 16 analysierten CpG-Dinukleotide ein unterschiedliches Methylierungsmuster. Übereinstimmend bei beiden Zelllinien war die Nichtmethylierung der CpG-Dinukleotide 12 bis 14 und 16 an den Positionen -29, -2, +2, +77. Im Unterschied zu LNCaP war bei DU-145 das CpG-Dinukleotid an Position +9 methyliert. In der Sequenz vor dem Transkriptionsstartpunkt konnte bei DU-145 an den Positionen –117 und –93 keine Methylierung gefunden werden, LNCaP war bei diesen beiden CpG-Dinukleotiden methyliert. Der eine durchgehend nichtmethylierte DNA-Strang (Klon 5) bei DU-145 kann auf den zytogenetischen Befund dieser Zelllinie zurückzuführen sein. Nach Informationen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig (s. Internetseite http://www.dsmz.de/mutz/mutz261.htm; Stand 27.07.2004) liegt bei DU-145 ein triploider Chromosomensatz mit 58 bis 65 Chromosomen vor, mit Verlust von u.a. einem Chromosom 13. An den beiden restlichen Chromosomen 13 wurde zusätzliches Material unbekannter Herkunft [add(13)(q33)] gefunden. Es ist möglich, dass der DICE1-Promotor nur in einem der beiden vorhandenen Chromsomen 13 methyliert ist. Die andere Genkopie könnte durch andere Mechanismen, wie z.B. eine Mutation inaktiviert sein. Wie bereits beschrieben, wurden bei Ösophagus-Karzinomen somatische Mutationen im DICE1-Gen gefunden, die zum Expressionsverlust führten (Li et al., 2003).

5.2.4.2 Re-Expression von DICE1 unter Einwirkung von 5-Azacytidin

Durch die Kultivierung der Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 in der Anwesenheit von 1 µM bzw. 5 µM 5-Azacytidin konnte eine Re-Expression des DICE1-Gens festgestellt werden. Das 5-Azacytidin wird während der Zellteilung bei der DNA-Replikation in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut. Das eingebaute 5-Azacytidin bindet irreversibel die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) und verhindert so die Methylierung der synthetisierten DNA-Stränge durch die Reduzierung des in den Zellen frei vorliegenden DNMT1 (Creusot et al., 1982; Juttermann et al., 1994). Die durch 5-Azacytidin induzierte Hypomethylierung betrifft die gesamte DNA, also auch CpG-Dinukleotide in Promotorsequenzen. Durch diese Demethylierung hypermethylierten von Promotorsequenzen kommt es zu einer verstärkten Transkription des regulierten Gens (Bender et al., 1998).

Nach der Kultivierung der Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145 kam es zu einem deutlichen Anstieg der DICE1-Expression auf maximal 35,4 % bei LNCaP-Zellen bzw. auf maximal 40,6 % bei DU-145-Zellen. Eine durch 5-Azacytidin induzierte Re-Expression ist bisher bei Prostatakarzinom-Zelllinien für eine Vielzahl von Tumorsuppressorgenen wie z.B. für p16^{INK} (Jarrard et al., 1997), pTEN (Whang et al., 1998), GSTP1 (Lin et al. 2001) sowie für das Estrogenrezeptor-beta-Gen (Noijma et al., 2001) und das AR-Gen (Nakayama et al., 2000) beschrieben worden.

Durch die *in-vitro*-Methylierung der DICE1-β-Galaktosidase-Konstrukte DICE1Prom1 und DICE1Prom6 konnte in den COS-7-Zellen eine verminderte Promotoraktivität dieser beiden Promotorfragmente festgestellt werden. Dieser Versuch stellt das Gegenstück der Einwirkung von 5-Azacytidin auf die Prostatakarzinom-Zelllinien dar. Die Verbindung beider Versuche zeigt aber, dass die verminderte DICE1-Expression in den getesteten Prostatakarzinom-Zelllinien auf eine Methylierung von CpG-Dinukleotiden im Promotor des DICE1-Gens zurückzuführen ist.

5.2.5 LOH-Analysen am Mikrosatellitenmarker D13S284 bei primären Prostatakarzinomen

Primäre Prostatakarzinome von 14 Patienten wurden hinsichtlich einer LOH an dem Mikrosatellitenmarker D13S284 untersucht. Dieser Mikrosatellitenmarker kolokalisiert mit dem DICE1-Gen (Wieland et al., 2001) und liegt 230 kb proximal von diesem Gen (s. Datenbank-Nr. NT_024524 (NCBI; International Human Genome Sequencing Consortium). Von den 14 Patienten wurden mittels Mikrodissektion Tumor- und Nichttumorgewebeproben der Prostata gewonnen und miteinander verglichen. Von den untersuchten Gewebeproben war das Nichttumorgewebe von 10 Patienten (71,4 %) heterozygot und von 4 Patienten nicht informativ. Die nicht informativen Fälle zeigten bei der Analyse der Fragmentlänge im Nichttumorgewebe keine erkennbaren Unterschiede zwischen den beiden Allelen. Auf Grund der unterschiedlichen DNA-Konzentrationen, die aus den Mikrosatelliten gewonnen wurden, war eine quantitative Analyse der Peakflächen bei der Fragmentanalyse der PCR-Produkte nicht möglich.

Im Tumorgewebe der 10 informativen Prostatakarzinome konnte bei 5 Patienten (50,0 %) eine LOH festgestellt werden. Yin et al. (1999) untersuchten 61 Patienten mit Prostatakarzinom und fanden bei 37,5 % der informativen Fälle eine LOH an dem Mikrosatellitenmarker D13S284. Dies war die höchste LOH-Rate, die an den untersuchten Mikrosatellitenmarkern des Chromosoms 13 gefunden wurde (Yin et al., 1999).

Bei einem Patienten aus dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv wurde eine Verschiebung der Fragmentlängen im Prostatakarzinom in Bezug auf das Nichttumorgewebe festgestellt. Diese Verschiebung hatte zur Folge, dass im Tumorgewebe Allele gefunden wurden, die eine kürzere CA-Folge zeigten als im Nichttumorgewebe. Es ist möglich, dass diese Allelverschiebung ein Hinweis auf eine Mikrosatelliteninstabilität ist. Eine Mikrosatelliteninstabilität wird unter anderem bei Patienten mit Dickdarmkarzinom, Magenkarzinom oder Retinoblastom gefunden (Thibodeau et al., 1993; Kim et al., 2003; Choy et al., 2004). Von einer Mikrosatelliteninstabilität wird gesprochen, wenn mindestens zwei von fünf untersuchten Mikrosatellitenmarkern eine Allelverschiebung aufweisen (Boland et al., 1998).

5.2.6 Methylierung des DICE1-Promotors bei primären Prostatakarzinomen

Von den 14 Patienten mit einem Prostatakarzinom wurden 8 Patienten ausgewählt, deren Tumorgewebe auf eine Methylierung des DICE1-Promotors untersucht wurde. Drei der untersuchten Patienten wiesen eine LOH am Mikrosatellitenmarker D13S284 auf. Drei weitere Patienten zeigten bei diesem Mikrosatellitenmarker keine LOH, ein Patient war nicht

informativ und der achte Patient wies im Karzinomgewebe die erwähnte Allelverschiebung auf. Für die Untersuchung des Methylierungsstatus musste auf DNA zurückgegriffen werden, die aus Paraffinschnitten isoliert wurde. Dies war nötig, da die Konzentration der DNA aus den Mikrodissektaten nicht für die Bisulfitumwandlung und die anschließende PCR bzw. Klonierung ausreichte. Allerdings wurden bei der DNA-Isolierung, auf Grund des spezifischen Wachstums des Prostatakarzinoms, auch Nichttumorzellen isoliert, die das Ergebnis verfälschen können.

Bei allen 8 untersuchten Prostatakarzinomen war eine Analyse der bisulfitmodifizierten DNA möglich. Das Ergebnis der Sequenzierung der einzelnen Klone ergab bei 4 der 8 untersuchten Prostatakarzinome eine Methylierung von einzelnen CpG-Dinukleotiden im DICE1-Promotor. Bei einem weiteren Patienten konnte ein Klon identifiziert werden, bei dem ein einziges Cytosin (das Cytosin des CpG-Dinukleotids Nummer 4 an der Position -116) nicht durch die Bisulfitumwandlung modifiziert wurde. Dies kann auf eine Methylierung zurückgeführt werden. Allerdings wurde bei keinem der analysierten Prostatakarzinome ein methyliertes Cytosin an dieser Position festgestellt. Es ist daher möglich, dass diese scheinbare Methylierung durch einen Fehler der Taq-Polymerase bei der PCR verursacht wurde.

Die 4 Patienten in deren Prostatakarzinomzellen eine Methylierung im DICE1-Promotor gefunden wurde, zeigten bei der LOH-Analyse entweder Auffälligkeiten (Patienten 2, 3 und 9) oder waren nicht informativ (Patient 4). Dagegen wiesen die Patienten 5, 6 und 7, bei denen bei der LOH-Analyse die gleiche Allelverteilung im Tumor- und Nichttumorgewebe gefunden wurde, in keinem Fall methylierte CpG-Dinukleotide im DICE1-Promotor auf.

Bei den 4 Prostatakarzinomen mit methyliertem DICE1-Promotor waren immer die selben Cytosine an den Positionen -134, -131, -126, -109, -103, -83, -70 und +9 methyliert. Dies sind möglicherweise wichtige CpG-Dinukleotide im DICE1-Promotor für die Kontrolle der DICE1-Expression in der Prostata. Die funktionelle Analyse der CpG-Dinukleotide, bei denen eine Methylierung bei Prostatakarzinomen gefunden wurde, ergab, dass die untersuchten CpG-Dinukleotide an den Positionen -126, -103 und -70 auch Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind. Durch die Methylierung dieses Promotorbereichs in Prostatakarzinom-Zellen ist es möglich, dass durch die Bindung des Methyl-Cytosin-Promotor **Bindeproteins** Histon-Deacetylase-Proteins der und des für die Transkriptionsfaktoren blockiert wird und so die Transkription des DICE1-Gens nicht erfolgen kann (Jones und Laird, 1999; Jones und Baylin, 2002). Daher ist bei den beiden Patienten, die eine LOH am Mikrosatellitenmarker D13S284 zeigen und im DICE1-Promotor methyliert sind (Patienten 2 und 9), von einer Inaktivierung beider DICE1-Genkopien auszugehen, da die Promotormethylierung die Expression des einen DICE1-Gens hemmt und die LOH auf eine Deletion der anderen Kopie des DICE1-Gens hinweist (Bird, 2002).

Die Auswirkung der Methylierung von CpG-Dinukleotiden im DICE1-Promotor bei Patient 3, bei dem die Allelverschiebung am Mikrosatellitenmarker D13S284 gefunden wurde, ist schwierig zu erklären. Es ist möglich, dass eine Kopie des DICE1-Gens durch die Methylierung inaktiviert und die andere Genkopie durch eine kleinere Deletion, die mit dem Mikrosatellitenmarker D13S284 nicht darstellbar war, nicht vorhanden war.

Die klinischen Daten der Patienten mit Prostatakarzinom, bei denen der Methylierungsstatus des DICE1-Promotors analysiert wurde, sind in Tabelle 5.4 aufgelistet. Bei den vier Prostatakarzinomen, die einen methylierten DICE1-Promotor aufwiesen, wurde ein Tumor-Stadium von pT3a oder pT3b diagnostiziert. Dagegen zeigten die anderen vier Prostatakarzinome, bei denen der DICE1-Promotor nicht methyliert war, ein Tumorstadium von pT2a bis pT3a. Für eine statistische Aussage ist das untersuchte Patientenkollektiv jedoch zu gering. Hierfür wäre es nötig eine größere Anzahl von Prostatakarzinomen auf eine Methylierung des DICE1-Promotors zu untersuchen.

Tabelle 5.4: Klinische Daten der Patienten, deren Prostatakarzinomzellen auf Methylierung des DICE1-Promotors untersucht wurden

Patient	Alter bei OP	DICE1-Promotor Methylierung	LOH ^a	Tumor- Stadium	Gleason- Score
1	68	nein	ja	pT2a	3+4
2	66	ја	ja	pT3b	3+5
3	57	ја	MSI	рТЗа	3+3
4	62	ја	NI	рТЗа	4+3
5	61	nein	nein	pT3a	3+4
6	51	nein	nein	pT2b	3+2
7	73	nein	ja	pT2b	2+3
9	67	ја	ja	рТ3а	3+4

^a) LOH (loss of heterozygosity) am Mikrosatellitenmarker D13S284; NI: nicht informativ

Auffallend ist, dass bei den methylierten Karzinomen in 3 von 4 Fällen eine durchgehende Methylierung an den genannten Positionen gefunden wurde. In einem Fall (Patient 3) wurde ein Klon sequenziert, bei dem keine Methylierung festgestellt werden konnte. Klone, die keine Methylierung zeigen, waren zu erwarten, da wie bereits beschrieben durch die eingesetzte Methode der DNA-Isolierung aus Paraffinmaterial auch Nichttumorzellen isoliert wurden. Dass bei den Prostatakarzinomen mit methylierten DICE1-Promotoren kaum Klone gefunden wurden, die keine Methylierung zeigten, kann darauf zurückzuführen sein, dass der Anteil normaler Prostatazellen im Bereich des Paraffinschnittes, der für die DNA- Isolierung eingesetzt wurde, gering war. Da bis zu 10 Klone bei jedem Patienten sequenziert wurden, ist eine statistische Unterrepräsentation der normalen Prostatazellen möglich. Wenn mehr Klone sequenziert worden wären, wäre eine häufigere Identifizierung von nichtmethylierten Klonen möglich.

Der Vergleich der DICE1-Promotormethylierung bei den primären Prostatakarzinomen mit den untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien ergab bei den primären Prostatakarzinomen ein ähnliches Methylierungsmuster wie bei der Zelllinie DU-145. Bei den im DICE1-Promotor methylierten Prostatakarzinomen wurde im Gegensatz zu DU-145 bei dem CpG-Dinukleotid an der Position -92 keine Methylierung des Cytosins festgestellt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ergebnisse der Untersuchungen des DICE1-Gens aussagen, dass das DICE1-Gen in Prostatakarzinom-Zellen als Tumorsuppressorgen wirkt und die Knudsonsche "two hit"-Theorie erfüllt. Als erstes Ereignis kann dabei eine Deletion in der chromosomalen Region 13q14 angesehen werden, durch die eine DICE1-Genkopie entfernt wird. Andererseits führt die Methylierung im Promotor des DICE1-Gens zu dessen Inaktivierung, was das zweite Ereignis darstellt.

6. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist in Deutschland derzeit das häufigste Krebsleiden beim Mann. Der klinische Verlauf des Prostatakarzinoms ist vor allem von zwei kritischen Progressionsstufen abhängig: einerseits von der Entstehung von Metastasen und andererseits von einer möglichen Resistenz gegenüber einer Hormontherapie. Da primäre Prostatakarzinome in ihrem Wachstum meist androgenabhängig sind, ist die Ansprechrate auf eine Antiandrogentherapie entsprechend hoch und liegt bei ca. 75 %. Bei ca. 25 % der Patienten wird bereits primär eine Resistenz gegenüber der Antiandrogentherapie beobachtet. Für das Versagen der Antiandrogentherapie werden unter anderem genetische Veränderungen des Androgenrezeptors (AR) im Tumor verantwortlich gemacht.

Im Mittelpunkt des ersten Teils dieser Arbeit standen Untersuchungen zur Bedeutung des AR-Gens bei einer möglichen Antiandrogenresistenz bei der Behandlung primärer Prostatakarzinome. Hierfür wurde die Anzahl von Kopien des Androgenrezeptor-Gens und des X-Chromosoms bei 80 primären Prostatakarzinomen mittels FISH-Analyse ermittelt und die Ergebnisse mit den klinischen Daten der Patienten in Korrelation gebracht. Durch die hier vorgelegten Ergebnisse konnte das Auftreten zusätzlicher X-Chromosomen, einschließlich des AR-Gens, bei insgesamt 9 der untersuchten Prostatakarzinome vor einer Antiandrogentherapie festgestellt werden. Es ist zu vermuten, dass die zusätzlichen Kopien des AR-Gens zu einem schlechteren Ansprechen der Antiandrogentherapie führen können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Prostatakarzinome in einem fortgeschrittenen pathologischen Stadium häufiger eine Aneuploidie des X-Chromosoms zeigen. Durch weitere FISH-Analysen mit einem Sondenmix für die Zentromere der Chromosomen X, Y und 18 konnte nachgewiesen werden, dass die Aneuploidie des X-Chromosoms nicht allein auf eine Tetraploidie des gesamten Chromosomensatzes zurückzuführen ist. Ein tetraploides Signalmuster der drei eingesetzten Sonden wurde bei 5 der 9 Prostatakarzinome mit zusätzlichen X-Chromosomen gefunden. Bei diesen 5 Karzinomen waren jedoch maximal 19 % der analysierten Zellkerne tetraploide.

Wie bei anderen soliden Tumoren geht auch die Tumorgenese des Prostatakarzinoms insbesondere mit dem Verlust genetischen Materials einher, der als Hinweis auf den Verlust von Tumorsuppressorgenen gewertet wird. Eine kritische chromosomale Region mit häufigen Verlusten ist das Chromosom 13q14. In dieser Region konnte das Tumorsuppressorgen DICE1 isoliert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die molekulare Rolle des DICE1-Gens als Tumorsuppressorgen bei Prostatakarzinomen spezifiziert werden. Für diese Fragestellung wurde zunächst der Promotor des DICE1-Gens identifiziert und funktionell untersucht. Die funktionelle Analyse der DNA-Sequenz vor dem Transkriptionsstartpunkt des DICE1-Gens ergab eine Sequenz von 800 bp, die eine Promotoraktivität in COS-7-Zellen zeigte. In Zelllinien nichtkleinzelliger Lungenkarzinome konnte in der unmittelbaren Region vor dem DICE1-Gen eine unterschiedliche Methylierung von CpG-Dinukleotiden festgestellt werden, wobei die Stärke der Methylierungen mit der DICE1-Expression korrelierte. In den Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und DU-145, die eine verminderte DICE1-Expression zeigten, konnte ebenfalls eine Methylierung von CpG-Dinukleotiden im DICE1-Promotor gefunden werden. Nach Behandlung dieser Zelllinien mit 5-Azacytidin, einem Inhibitor der DNA-Methyltransferase 1, konnte eine Re-Expression des DICE1-Gens in diesen Zelllinien nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung primärer Prostatakarzinome konnte in 5 von 10 informativen Fällen (50%) eine LOH am Mikrosatellitenmarker D13S284, der mit dem DICE1-Gen kolokalisiert, identifiziert werden. Bei 8 Prostatakarzinomen wurde die DNA mittels der Bisulfitmethode untersucht. In 4 der 8 untersuchten Fälle konnten methylierte Cytosine bei 8 der 16 analysierten CpG-Dinukleotide festgestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das DICE1-Gen in Prostatakarzinom-Zellen als ein Tumorsuppressorgen fungiert und die Knudsonsche "two hit"-Theorie erfüllt. Als erstes Ereignis kann eine Deletion in der chromosomalen Region 13q14 angesehen werden. Die Promotormethylierung stellt möglicherweise das zweite Ereignis dar und führt zur Inaktivierung der zweiten Genkopie.

7. Literaturverzeichnis

- Afonso A, Emmert-Buck MR, Duray PH, Bostwick DG, Linehan WM Vocke CD. Loss of heterozygosity on chromosome 13 is associated with advanced stage prostate cancer. J Urol 1999;162:922-926.
- 2. Alers JC, Krijtenburg PJ, Vis AN, Hoedemaeker RF, Wildhagen MF, Hop WCJ, van der Kwast TH, Schröder FH, Tanke HJ, van Dekken H. Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies Am J Pathol 2001;158:399-406.
- Alcaraz A, Takahashi S, Brown JA, Herath JF, Bergstralh EJ, Larson-Keller JJ, Lieber MM, Jenkins RB. Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. Cancer Res. 1994;54:3998-4002.
- 4. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2002.
- Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:11995-19999.
- Aprikian AG, Sarkis AS, Fair WR, Zhang ZF, Fuks Z, Cordon-Cardo C. Immunhistochemical determination of p53 protein nuclear accumulation in prostate adenocarcinoma. J Urol 1994;151:1276-1280.
- Arcangeli G, Saracino B, Micheli A, D'Angelo L, Pansadoro V, Cruciani E, Marchetti P. Radiotherapy with or without androgen deprivation in the treatment of localized adenocarcinoma of the prostate. Am J Clin Oncol 1998;21:1-5.
- Arnold JT, Isaacs JT. Mechanisms involved in the progression of androgenindependent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. Endocr Relat Cancer 2002;9:61-73.
- 9. Aumüller G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. Anat Embryol 1989;179:519-531.
- Ausubel FM. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2. John Wiley & Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 1989
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Editors). Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. 1992 p. 1-16.

- 12. Baas F, Bikker H, van Ommen GJB, de Vijlder JJM. Unusual scarcity of restriciton site polymorphism in the human thyroglobulin gene. A linkage study suggesting autosomal dominance of a defective thyroglobulin allele. Human Genet. 1984;67:301-305.
- Baretton GB, Valina C, Vogt T, Schneiderbanger K, Diebold J, Lohrs U. Interphase cytogenetic analysis of prostatic carcinomas by use of nonisotopic in situ hybridization. Cancer Res 1994;54:4472-4480.
- 14. Bastacky SJ, Wojno KJ, Walsh PC, Carmichael MJ, Epstein JI. Pathological features of hereditary prostate cancer. J Urol 1995;153:987-992.
- 15. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. Adv Cancer Res. 1998;72:141-196.
- 16. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. Cell 1989;56:335-344.
- 17. Beato M, Chavez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. Steroids 1996;61:240-251.
- 18. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. Nucleic Acids Res 1980;8:1499-1504.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature 1986;321:209-213.
- 20. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 2002;16:6-21.
- 21. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. Cancer Res. 1998;58:5248-5257.
- 22. Bonkhoff H, Remberger K. Widesread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. Virchows Arch 1993;A422:35-38.
- 23. Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. Androgen receptor status in endocrine-paracrine cell types of normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. Virchows Arch 1993;A423:291-294.
- 24. Bonkhoff H, Remberger K. Differentiation pathways and and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. Prostate 1996;28:98-106.
- 25. Bonkhoff H. Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate a stem cell modelfor the development of prostate cancer. Eur Urol 1996;28:98-106.

- Bookstein R, Rio P, Madreperla SA, Hong F, Allred C, Grizzle WE, Lee WH. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:7762-7766.
- 27. Bookstein R, MacGrogan D, Hilsenbeck SG, Sharkey F, Allred DC. p53 is mutated in a subset of advanced –stage prostate cancer. Cancer Res 1993;50:3795-3803.
- Bourbon HM, Gonzy-Treboul G, Peronnet F, Alin MF, Ardourel C, Benassayag C, Cribbs D, Deutsch J, Ferrer P, Haenlin M, Lepesant JA, Noselli, S, Vicent A. A Pinsertion screen identifying novel X-linked essential genes in Drosophila. Mech Dev 2002;110:71-83.
- 29. Bova GS, Isaacs WB. Review of allelic loss and gain in prostate cancer. World J Urol 1996;14:338-346.
- 30. Bradfort MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
- Breitkreuz T, Romanakis K, Lutz S, Seitz G, Bonkhoff H, Unteregger G, Zwergel T, Zang KD, Wullich B. Genotypic characterization of prostatic carcinomas: a combined cytogenetic, flow cytometry, and in situ DNA hybridization study. Cancer Res 1993;53:4035-4040.
- 32. Bratt O, Borg A, Kristoffersson U, et al. CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. Br J Cancer 1999;81:672-676.
- Brinkman AO, Faber PW, van Rooij HCJ, Kuiper GGJM, Ris C, Klaassen P, van der Korput JAGM, van Laar JH, Mulder E, Trapman J. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. J Steroid Biochem 1989;34:307-310.
- 34. Brooks JD, Bova GS, Isaacs WB. Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. Prostate 1995;26:35-39.
- 35. Brothman AR, Watson MJ, Zhu XL, Williams BJ, Rohr LR. Evaluation of 20 archival prostate tumor specimens by fluorescence in situ hybridization (FISH). Cancer Genet Cytogenet 1994;75:40-44.
- Brothman AR. Cytogenetics and molecular genetics of cancer of the prostate. Am J Med Genet. 2002;115:150-156.

- Brown JA, Alcaraz A, Takahashi S, Persons DL, Lieber MM, Jenkins RB. Chromosomal aneusomies detected by fluorescent in situ hybridization analysis in clinically localized prostate carcinoma. J Urol 1994;152:1157-1162.
- Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. Cancer Res 1999;59:803-806.
- 39. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. Trends Cell Biol. 1999;9:M57-60.
- 40. Carter HB, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendalian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:3367-3371.
- Carter HB, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. Hereditary prostate cancer: epidemiologc and clinical features. J Urol 1993;150:797-802.
- 42. Caskey CT, Pizzuti A, Fu YH, Fenwick RG, Nelson DL. Triplet repeat mutations in human disease. Science 256:784-789.
- Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affected transactivation function. Nucleic Acids Res 1994;22:3181-3186.
- 44. Chen C, Frierson HF, Haggerty PF, Theodorescu D, Gregory CW, Dong JT. An 800-kb region of deletion at 13q14 in human prostate and other carcinomas. Genomics 2001;77:135-144.
- 45. Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Sokhom SP, Epstein JI, Isaacs WB, Jensen RH. Genetic alterations in untreated metastases and androgenindependent prostate cancer detected by comparative genomic hybridisation and allolotyping. Cancer Res 1996;56:3091-3102.
- 46. Choong CS, Wilson EM. Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for disease. J Mol Endocrinol 1998;21:235-257.
- Choy KW, Pang CP, Fan DS, Lee TC, Wang JH, Abramson DH, Lo KW, To KF, Yu CB, Beaverson KL, Cheung KF, Lam DS. Microsatellite Instability and MLH1 Promoter Methylation in Human Retinoblastoma. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:3404-3409.
- 48. Cooney KA, Wetzel JC, Merajver SD, Macoska JA, Singleton TP, Wojno K. Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. Cancer Res 1996;56:1142-1145.

- 49. Correa-Cerro L, Wohr G, Haussler J, Berthon P, Drelon E, Mangin P, Fournier G, Cussenot O, Kraus P, Just W, Paiss T, Cantu JM, Vogel W. (CAG)nCAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French-German population. Eur J Hum Genet 1999;7:357-362.
- 50. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific pattern. Nat Genet 2000;24:132-138.
- Creusot F, Acs G, Christman JK. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. J Biol Chem 1982; 257:2041-2048.
- 52. Cude KJ, Dixon SC, Guo Y, Lisella J, Figg WD. The androgene receptor: genetic condensations in the development and treatment of prostate cancer. J Mol Med 1999;77:419-426.
- Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato AC, Hittmair A, Radmayr C, Eberle J, Bartsch G, Klocker H. Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. Mol Endocrinol 1993;7:1541-1550.
- 54. Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, Peterziel H, Cato AC, Bartsch G, Klocker H. Expression, structure and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. Prostate 1998;35:63-70.
- 55. Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. Oncogene 2001;20:7120-7127.
- 56. Denis LJ, Murphy GP, Schröder FH. report on the consensus workshop on screening and global strategy for prostate cancer. Cancer 1995;75:1187-1207.
- 57. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GPV, Barrack ER. Effect of a short CAG (glutamine repeat on human androgen receptor function. Prostate 2004;58:23-32.
- 58. Dong JT, Isaacs WB, Isaacs JT. Molecular advances in prostate cancer. Curr Opin Oncol 1997;9:1001-1007.
- Doyu M, Sobue G, Mukai E, Kachi T, Yasuda T, Mitsuma T, Takahashi A. Severity of X-linked recessive bulbospinal neuronopathy correlates with size of the tandem CAG repeat in androgen receptor gene. Ann Neurol 1992;32:707-710.

- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics 1992;12:241-253.
- Edwards J, Krishna NS, Mukherjee R, Watters AD, Underwood MA, Bartlett JM. Amplification of the androgen receptor may not explain the development of androgenindependent prostate cancer. BJU Int 2001;88:633-637.
- 62. Edwards SM, Badzioch MD, Minter R, et al. Androgen receptor polymorphisms: association with prostate cancer risk, relapse, and overall survival. Int J Cancer 1999;84:458-465.
- El Gedaily A, Bubendorf L, Willi N, Fu W, Richter JR, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G, Gasser TC. Discovery of new DNA amplification loci in prostate cancer by comperative genomic hybridization. Prostate 2001;46:46184-190.
- 64. Elo JP, Kvist L, Leinone K. Mutated human androgen receptor gene detected in a patient is also activated by estradiol. J Clin Endocrin Metabol 1995;80:3494-3500.
- 65. Erbersdobler A, Hammerer P, Huland H, Henke RP. Numerical chromosomal aberrations in transition-zone carcinomas of the prostate. J Urol 1997;158:1594-1598.
- 66. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigeneitc disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol 2002;196:1-7.
- 67. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 1988;240:889-895.
- Evans BAJ, Harper ME, Daniells CE, Watts CE, Matenhelia S, Green J, Griffiths K. Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. Prostate 1996;28:162-171.
- Fischbeck KH, Ioanasescu V, Ritter AW, Ionasescu R, Davies K, Ball S, Bosch P, Burns T, Hausmonova-Petrusewicz I, Borkowska J, Ringel SP, Stern LZ. Localization of the gene for X-Linked spinal muscular atrophy. Neurology 1986;36:1595-1598.
- Fournier G, Latil A, Amet Y, Abalain JH, Volant A, Mangin P, Floch HH, Lidereau R. Gene amplifications in advanced-stage human prostate cancer. Urol Res 1995;22:343-347.
- 71. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Alberts DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature 1986;323:643-646.

- 72. Fritz B, Kuster W, Orstavik KH, Naumova A, Spranger J, Rehder H. Pigmentary mosaicism in hypomelanosis of Ito. Further evidence for functional disomy of Xp. Hum Genet 1998;103:441-449.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89:1827-1831.
- 74. Fukuhara H, Kuramochi M, Fukami T, Kasahara K, Furuhata M, Nobukuni T, Maruyama T, Isogai K, Sekiya T, Shuin T, Kitamura T, Reeves RH, Murakami Y. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. Jpn J Cancer Res. 2002;93:605-60
- 75. Gardiner-Garden M, Frommer, M. CpG islands in vertebrate genomes. J Mol Biol 1987;196:261-282.
- Garkavtsev IV, Kley N, Grigorian IA, Gudkov AV. The Bloom syndrome protein interacts and cooperates with p53 in regulation of transcription and cell growth control. Oncogene 2001;20:8276-8280.
- 77. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. J Clin Oncol 2002;20:3001-3015.
- 78. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Brufsky A, Talcott J, Hennekens AH, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:3320-3323.
- 79. Gottlieb B, Lehvaslaiho H, Beitel LK, et al. The androgen receptor gene mutations database. Nucleic Acid Res 1998;26:234-238.
- 80. Gronberg H, Damber L, Damber JE, Iselius L. Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: support for dominant inheritance . Am J Epidemiol 1997;146:552-557.
- 81. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. Androgen receptor signalling in androgen refractory prostate cancer. J Natl Cancer Inst 2001;93:1687-1697.
- Hakimi JM, Schoenberg MP, Rondinelli RH, Piantadosi S, Barrack ER. Androgen receptor variants with short glutamine or gylcine repeats may identify subpopulations of men with prostate cancer. Clin Cancer Res 1997;3:1599-1608.
- 83. Han EK, Lim JT, Arber N, Rubin MA, Xing WQ, Weinstein IB. Cyclin D1 expression in human prostate carcinoma cell lines and primary tumors. Prostate 1998;35:95–101.
- Hanahan, B. Techniques for the transformation of E. coli DNA cloning. In D.M. Glover (Ed.), IRL Press, Oxford. 1986: pp 109-135.

- Harisiadis L, Veenema RJ, Senyszyn JJ, Puchner PJ, Tretter P, Romas NA, Chang CH, Lattimer JK, Tannenbaum M. Carcinoma of the prostate: treatment with external radiotherapy. Cancer 1978;41:2131-2142.
- 86. Hautmann RE, Huland H. Urologie. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo 1997.
- 87. Helpap B. Pathologie der ableitenden Harnwege und der Prostata. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Helpap B. Atlas der Pathologie urologischer Tumore. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo 1993.
- 89. Henke RP, Kruger E, Ayhan N, Hubner D, Hammerer P. Frequency and distribution of numerical chromosomal aberrations in prostatic cancer. Hum Pathol 1994;25:476-484.
- 90. Henke RP, Hammerer P, Graefen M, Erbersdobler A, Neumann M, Berger J, Huland H. Interphase cytogenetic study of preoperative core biopsies for the prediction of early serum prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy of clinically localized prostate carcinoma. Cancer. 1998;83:977-988.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:9821-9826.
- 92. Hilsz H. Molekulare Formen des PSA und ihre klinische Signifikanz. Urologe 1995;34:275-282.
- Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, Hittmair A. Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein. Cancer Res 1995;55:3068-3072.
- 94. Hoff HB, Tresini M, Li S, Sell C. DBI-1, a novel gene related to the Notch familiy, modulates mitogenic response to insulin-like growth factor 1. Exp Cell Res 1998;238:359-370.
- 95. Huggins C, Hodges CV. Studies in prostate cancer. Cancer Res 1941;1:293-297.
- 96. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. Int J Cancer 2000;85:60-67.
- 97. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, et al. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. J Natl Cancer Inst 1997;89:166-170.

- 98. Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA. The CAG and GGG microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. Cancer Res 1995;55:1937-1940.
- Isaacs WB, Carter BS. Genetic changes associated with prostate cancer in humans. Cancer Surv 1991;11:15-24.
- 100. Isaacs JT, Furuya Y, Berges R. The role of androgen in the regulation of programmed cell death/apoptosis in normal and malignant prostatic tissue. Semin Cancer Biol 1994;5;391-400.
- 101. Jarrard DF, Bova GS, Ewing CM, Pin SS, Nguyen SH, Baylin SB, Cairns P, Sidransky D, Herman JG, Isaacs WB. Deletional, mutational, and methylation analyses of CDKN2 (p16/MTS1) in primary and metastatic prostate cancer. Genes Chromosomes Cancer. 1997;19:90-96.
- 102. Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. Cancer Res 1997;57:524-531.
- 103. John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature. 1969;223:582-587.
- 104. Jones PA, Rideout WM, Shen JC, Spruck CH, Tsai YC. Methylation, mutation and cancer. Bioassay 1992;14:33-36.
- 105. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet 1999;21:163-167.
- 106. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nature Reviews Genetics 2002;3:415-428.
- 107. Joos S, Bergerheim US, Pan Y, Matsuyama H, Bentz M, du Manoir S, Lichter P. Mapping of chromosomal gains and losses in prostate cancer by coperative genomic hybridization. Genes Chrom Cancer 1995;14:267-276.
- 108. Josse J, Kaiser AD, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VIII. Frequencies of nearest nighbor base sequences in deoxyribonucleic acid. J Biol Chem 1961;236:864-875.
- 109. Juttermann R, Li E, Jaenisch R: Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:11797-11801.
- 110. Kallakury BV, Sheehan CE, Winn-Deen E, Oliver J, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS. Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin cell

adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas. Cancer. 2001;92:2786-2795.

- 111. Kaltz-Wittmer C, Klenk U, Glaessgen A, Aust DE, Diebold J, Lohrs U, Baretton GB. FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. Lab Invest 2000;80:1455-1464.
- 112. Kim H, Kim YH, Kim SE, Kim NG, Noh SH, Kim H. Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. J Pathol. 2003;200:23-31.
- 113. Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Meisner LF, Chang C, Choon A, Reznikoff CR, Bova GS, Friedl A, Jarrard DF. Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer. Cancer Res. 2000;60:3623-3630.
- 114. Knoke I, Allera A, Wieacker P. Significance of the CAG repeat for the phenotypic expression of missense mutations of the androgen receptor gene. Hum Gent 1999;104:257-267.
- 115. Knudson AG Jr. Genetic predisposition to cancer. Cancer Detect Prev 1984;7:1-8.
- 116. Koivisto P, Hyytinen E, Palmberg C, Tammela T, Visakorpi T, Isola J, Kallioniemi OP. Analysis of genetic changes underlying local recurrence of prostate carcinoma during androgen deprivation therapy. Am J Pathol 1995;147:1608-1614.
- 117. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, Trapman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T, Kallioniemi OP. Androgen receptor gene amplification: A possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. Cancer Res 1997;57:314-319.
- 118. Konety BR, Getzenberg RH. Novel therapies for advanced prostate cancer. Semin Urol Oncol 1997;15:33-42.
- 119. Labrie F, Dupont A, Belanger A Cusan L, Lacourciere Y, Monfette G, Laberge JG, Emond JP, Fazekas AT, Raynaud JP, Husson JM. New hormonal therapy in prostatic carcinoma: combined treatment with an LHRH agonist and an antiandrogen. Clin Invest Med 1982;5:267-275.
- 120. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. CA Cancer J Clin 1998;48:6-29.

- 121. Latil A, Baron JC, Cussenot O, Fournier G, Boccon GL, Le-Duc A, Lidereau R. Oncogene amplifications in early-stage human prostate carcinomas. Int. J Cancer 1994;59:637–638.
- 122. Latil AG, Azzouzi R, Cancel GS, Guillaume EC, Cochan-Priollet B, Berthon PL, Cussenot O. Prostate carcinoma risk and allelic variants of genes involved in androgen biosynthesis and metabolism pathways. Cancer 2001;92:1130-1137.
- 123. Latil A, Morant P, Fournier G, Mangin P, Berthon P, Cussenot O. CHC1-L, a candidate gene for prostate carcinogenesis at 13q14.2 is frequently affected by loss of heterozygosity and underexpressed in human prostate cancer Int J Cancer 2002;99:689-696.
- Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EYHP. Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification and sequence. Science 1987;235:1394-1399.
- 125. Lee KA, Masson N. Transcriptional regulation by CREB and its relatives. Biochim Biophys Acta. 1993 Sep 23;1174(3):221-33.
- 126. Li C, Larsson C, Futreal A, Lancaster J, Phela C, Aspenblad U, Sundelin B, Liu Y Ekman P, Auer G, Bergerheim USR. Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. Oncogene 1998;16:481-487.
- 127. Li WJ, Hu N, Su H, Wang C, Goldstein AM, Wang Y, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Guo WJ, Taylor PR. Allelic loss on chromosome 13q14 and mutation in deleted in cancer 1 gene in esophageal squamous cell carcinoma. Oncogene. 2003;22:314-318.
- 128. Lichter P, Tang CJ, Call K, Hermanson G, Evans GA, Housman D, Ward DC. Highresolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. Science. 1990;247:64-69.
- 129. Liehr T, Grehl H, Rautenstrauss B. FISH analysis of interphase nuclei extracted from paraffin-embedded tissue. Trends Genet 1995;11:377-378.
- Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. Am J Pathol. 2001;159:1815-1826.
- 131. Lindner P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielson PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP. Birth of the D-E-A-D box. Nature 1989;337:121-122.

- 132. Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res. 2001;61:3550-3555.
- Liu F, Thompson MA, Wagner S, Greenberg ME, Green MR. Activating transcription factor-1 can mediate Ca(2+)- and cAMP-inducible transcriptional activation. J Biol Chem. 1993;268:6714-6720.
- 134. Liu Y, Corcoran M, Rasool et al. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukimia. Oncogen 1997;15:2463-2473.
- 135. Livak KJ, Schmittgen TW. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ method. Methods 2001;25:402-408.
- 136. Logothetis CJ, Hoosein NM, Hsieh JT. The clinical and biological study of androgen independent prostate cancer (AI PCa). Semin Oncol. 1994 Oct; 21(5): 620-9.
- 137. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. Science 1988;240:327-330.
- 138. Lüking A, Stahl U, Schmidt U. The protein family of RNA helicases. Crit Rev Biochem Mol Biol 1998;33:259-296.
- 139. Lundgren R, Mandahl N, Heim S, Limon J, Henrikson H, Mitelman F. Cytogenetic analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. Genes Chromosomes Cancer 1992;4:16-24.
- Mancini DiNardo DN, Butcher DT, Robinson DP, Archer TK, Rodenhiser DI. Functional analysis of Cpg methylation in the BRCA1 promoter region. Oncogene 2001;20:5331-5340.
- Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, Sutherland R, Nigam R, Murthy L, Zhao Y, DiConcini D, Puxeddu E, Esen A, Eastham J, Weigel NL, Dolores JL. Androgen receptor mutations in prostate cancer. Cancer Res 2000; 60, 944-949.
- 142. McNeal JE. Anatomy of the prostate: a historical survey of dfferent views. Prostate 1980;1:3-13.
- 143. McNeal JE. Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol 1988;12:619-633.
- 144. Micale MA, Sanford JS, Powell IJ, Sakr WA, Wolman SR. Defining the extent and nature of cytogenetic events in prostatic adenocarcinoma: paraffin FISH vs. metaphase analysis. Cancer Genet Cytogenet 1993;69:7-12.

- 145. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16:1215.
- 146. Miyoshi Y, Uemura H, Fujinami K, Mikata K, Harada M, Kitamura H, Koizumi Y, Kubota Y. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-myc and androgen receptor gene amplification and chromosomal anomalies in prostate cancer in Japanese patients. Prostate 2000;43:225-232.
- 147. Montgomery JS, Price DK, Figg WD. The androgen receptor and its influence on the development and progression of prostate cancer. J Pathol 2001;195:138-146.
- Nakayama T, Watanabe M, Suzuki H, Toyota M, Sekita N, Hirokawa Y, Mizokami A, Ito H, Yatani R, Shiraishi T. Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. Lab Invest 2000;80:1789-1796.
- 149. Nakayama M, Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer. J Cell Biochem. 2004;91:540-552.
- 150. Navarro D, Luzardo OP, Fernandez L, Chesa N, Diaz-Chico BN. Transition to androgen-independence in prostate cancer. J Steroid Biochem 2002;81:191-201.
- 151. Newmark JR, Hardy DO, Tonb DC, Carter BS, Epstein JI, Isaacs WB, Brown TR, Barrack ER. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:6319-6323.
- 152. Nojima D, Li LC, Dharia A, Perinchery G, Ribeiro-Filho L, Yen TS, Dahiya R. CpG hypermethylation of the promoter region inactivates the estrogen receptor-beta gene in patients with prostate carcinoma. Cancer. 2001;92:2076-2083.
- 153. Nwosu V, Carpten J, Trent JM, Sheridan R. Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. Hum Mol Genet 2001;10:2313-2318.
- 154. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc Natl Acad Sci U S A. 1969;64:600-604.
- 155. Passarge E. Taschenatlas der Genetik. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1994.
- 156. Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. Nucleic Acids Res 2003;31:e73.

- 157. Petrylak DP. Chemotherapy for advanced hormone refractory prostate cancer. Urol 1999;54 (suppl. 6A):30-34.
- 158. Peterziel H, Culig Z, Stober J, Hobisch A, Radmayr C, Bartsch G, Klocker H, Cato ACB. Mutant androgen receptors in prostatic tumors distinguish between amino-acidsequence requirements for transactivation and ligand binding. Int J Cancer 1997; 63, 544-550.
- 159. Pienta KJ, Espers PS. Risk factors for prostate cancer. Ann of Intern Med 1993;118:793-803.
- 160. Platz EA, Giovannucci E, Dahl DM, et al. The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1998;7:379-384.
- 161. Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC, Kramer BS. The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. JAMA 1995;273:548-552.
- 162. Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, Borell TJ, Brown JA, Lieber MM, Jenkins RB. Comparison of fluorescence in situ hybridization analysis of isolated nuclei and routine histological sections from paraffin-embedded prostatic adenocarcinoma specimens. Am J Pathol. 1996;149:1193-1199.
- 163. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects : historical, clinical and molecular perspectives. Endocr Rev 1995;16:271-321.
- 164. Rohan TE, Howe GR, Burch JD, Jain M. Dietary factors and risk of prostate cancer : a case control study in Ontario, Canada. Canc Cause Control 1995;6:145-154.
- 165. Ross JS, Sheehan CE, Hayner BA, Ambros RA, Kallakury BV, Kaufman-RP J, Fisher HA, Rifkin MD, Muraca PJ. Prognostic significance of HER-2/neu gene amplification status by fluorescence in situ hybridization of prostate carcinoma. Cancer 1997;79:2162–2170.
- 166. Ruizeveld de Winter JA, Trapman J et al., Androgen receptor hetergeneity in human prostatic carcinomas visualized by immunohistochemistry. J Pathol 1990;161:329-332.
- 167. Ruizeveld de Winter JA, Janssen PJ, Sleddens HM, Verleun-Mooijman MC, Trapman J, Brinkmann AO, Santerse AB, Schroder FH, van der Kwast TH. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. Am J Pathol. 1994;144:735-746.

- 168. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 1977;74:5463-5467.
- 169. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: Pathophysiology and thrapeutic implications. Ann Intern Med 2001;134:573-586.
- 170. Sakr WA, Grignon DJ, Haas GP. Pathology of premalignanat lessions and carcinoma of the prostate in African-American men. Semin Urol Oncol 1998;16:214-220.
- 171. Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissue. Endocrinology 1990;127:3180-3186.
- 172. Sauter G, Bubendorf L, Moch H, Gasser TC, Mihatsch MJ. Zytogentische Veränderungen des Prostatakarzinomes. Pathologe 1998;19:63-68.
- 173. Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. Am J Hum Genet 1998;62:1425-1438.
- 174. Schmid SR, Linder P. D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. Mol Microbiol. 1992;6:283-291.
- 175. Shi XB, Ma AH, Xia L, Kung HJ, de Vere White RW. Functional analysis of 44 mutant androgen receptors from human prostate cancer. Cancer Res 2002; 62, 1496-1502.
- 176. Shin Y, Kim IJ, Kang HC, Park JH, Park HW, Jang SG, Lee MR, Jeong SY, Chang HJ, Ku JL, Park JG. A functional polymorphism (-347 G->GA) in the E-cadherin gene is associated with colorectal cancer. Carcinogenesis. 2004 Jul 1 [Epub]
- 177. Shuman S. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. J Biol Chem 1994;269:32678-32684.
- 178. Simpson DJ, Magnay J, Bicknell JE, Barkan AL, McNicol AM, Clayton RN, Farrell WE. Chromosome 13q deletion mapping in pituitary tumors: infrequent loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB1) locus despite loss of RB1 protein product in somatotropinomas. Cancer Res 1999;59:1562-1566.
- 179. Stachan T, Read AP. Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford 1996.
- 180. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, et al. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. Cancer Res 1997;57:1194-1198.
- 181. Stumm M, Tönnies H, Wieacker P. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood diseases. Eur J Pediatr 1999;158:531-536.

- 182. Suzuki H, Ueda T, Ichikwaw T, Ito H. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. Endocrine-Related Cancer 2003;10:209-216.
- Swartz MN, Trautner TA, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid.
 XI. Further studies on nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acids. J Biol Chem 1962;237:1961-1967.
- 184. Takahashi S, Qian J, Brown JA, Alcaraz A, Bostwick DG, Lieber MM, Jenkins RB. Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. Cancer Res 1994;54:3574-3579
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosome 21 and 22. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:3740-3745.
- 186. Tamura K, Zhang X, Murakami Y, Hirohashi S, Xu HJ, Hu SX, Benedict WF Sekiya T. Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer. Int J Cancer 1997;74:45-49.
- 187. Tang DG, Porter AT. Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. Prostate 1997;32:284-93.
- 188. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP. Mutation of the androgen receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. N Engl J Med 1995;25:1393-1398.
- 189. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 1993;260:816-819.
- Tilley WD, Marcelli M, Wilson JD, McPhaul MJ. Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:327-331.
- 191. Tilley WD, Buchanan G, Hickey TE, Bentel JM. Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. N Engl J Med 1996; 25, 1393-1398.
- 192. Trapman J, Klaassen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Faber PW, van Rooij HC, Geurts van Kessel A, Voorhorst MM, Mulder E, Brinkmann AO. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun 1988;153:241-248.
- 193. Trask BJ. DNA sequence localization in metaphase and interphase cells by fluorescence in situ hybridization. Methods Cell Biol. 1991;35:3-35.

- 194. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyoid receptor superfamily members. Ann Rev Biochem 1994;63:451-486.
- 195. Ueda T, Emi M, Suzuki H, Komiya A, Akakura K, Ichikawa T, Watanabe M, Shiraishi T, Masai M, Igarashi T, Ito H. Identification of a 1 cM region of coomon deletion on 13q14 associated with human prostate cancer. Genes, Chromsomes & Cancer 1999;24:183-190.
- 196. Ueda T, Bruchovsky N, Sadar M. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. J Biol Chem 2002;277:7076-7085.
- 197. Veldscholte J, Voorhorst-Ogink MM, Bolt-de Vries J, van Rooij HC, Trapman J, Mulder E. Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for the progestagenic and estrogenic steroids. Biochem Biophys Acta 1990; 1052, 187-194.
- 198. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinanen R, Palmberg C, Palotie A, Tammela T, Isola J, Kallioniemi OP. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat Genet 1995a;9:401-406.
- 199. Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvänen AC, Hyytinen E, Karhu R, Tammela T, Isola J, Kallioniemi OP. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comperative genomic hybridisation. Cancer Res 1995b;55:342-347.
- 200. Westermarck J, Weiss C, Saffrich R Kast J, Musti AM, Wessely M, Ansorge W, Séraphin B, Wilm M, Valdez BC, Bohmann D. The DEXH-box RNA helicase RHII/Gu is a co-factor for c-jun-activated transcription. EMBO J 2002;21:451-460.
- 201. Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, Said JW, Isaacs WB, Sawyers CL. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:5246-5250.
- 202. Whittaker CA, Hynes RO. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. Mol Biol Cell 2002;13:3369-3387.
- 203. Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR. Prostate cancer in relation to diet, physical activity and body size in blacks, whites and asiens in the United States and Canada. J Nat Canc Inst 1995;87:652-661.
- 204. Wieacker P, Griffin JE, Wienker T, Lopez JM, Wilson JD, Breckwoldt M. Linkage analysis with RFLPs in families with androgen resistance syndromes: evidence for

close linkage between the androgen receptor locus and the DXS1 segment. Hum Genet 1987;76:248-252.

- 205. Wieland I, Arden KC, Michels D, Klein-Hitpass L, Böhm M, Viars CS, Weidle UH. Isolation of DICE1: A gene frequently affected by LOH and downregulated in lung carcinomas. Oncogene 1999;18:4530-4537.
- 206. Wieland I, Röpke A, Wieacker PF. Expression and alternative splicing of the canditate tumor suppressor gene DICE1. Eur J Hum Genet 2001;9 Supl 1:Abstract P0718.
- 207. Wieland I, Röpke A, Stumm M, Sell C, Weidle UH, Wieacker PF. Molecular charcterization of the DICE1 (DDX26) tumor suppressor gene in lung carcinoma cells. Oncology Res 2001;12:491-500.
- 208. Wieland I, Sell C, Weidle UH, Wieacker P. Ectopic expression of DICE1 suppresses tumor cell growth. Oncol Rep 2004;12:207-211
- 209. Woodson K, Hayes R, Wideroff L, Villaruz L, Tangrea J. Hypermethylation of GSTP1, CD44, and E-cadherin genes in prostate cancer among US Blacks and Whites. Prostate 2003;55:199-205.
- 210. Yin Z, Spitz MR, Babaian RJ, Strom SS, Troncoso P, Kagan J. Limiting the location of a putative human prostate cancer tumor suppressor gene at chromosome 13q14.3. Oncogene 1999;18:7576-7583.
- 211. Zhou ZX, Sar M Simental JA, Lane MV, Wilson EM. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNAbinding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. J Biol Chem 1994;269:13115-13123.
- 212. Zitzelsberger H, Szücs S, Robens E, Weier HU, Höfler H, Bauchinger M. Combined cytogenetic and molecular genetic analyses of fifty-nine untreated human prostate carcinomas. Cancer Genet Cytogenet 1996;90:37-44.
8. Abkürzungen

A	Adenin
AR	Androgenrezeptor
bp	Basenpaare
С	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CpG	
d	2'-desoxy-
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-cytosin-5'-triphosphat
dest.	destilliert
DICE1	Deleted in Cancer 1
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-nukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EST	expressed sequence tagged site
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Gylcerin-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
ITPG	Isopropyl-b-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
I	Liter
LB	Luria-Bertani
LOH	loss of heterozygosity
Μ	Molarität

m	milli
μ	mikro
Mb	Megabasen
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
p-Arm	kurzer Arm eines Chromosoms
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIC	Polymorphismus-Informationsgehalt
q-Arm	langer Arm des Chromosoms
RNA	Ribunukleinsäure
RT	reverser Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
STS	sequence tagged site
т	Thymin
Таq	thermostabil DNA-Polymerase aus Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
VS.	versus

Patient	1xX;1xAR	0xX;1xAR	1xX;2xAR	1xX;0xAR	2xX;1xAR	2xX;2xAR	3xX;3xAR	3xX;2xAR	2xX;3xAR	1xX;3xAR	≥4xX;≥4xAR
4	83,0%	0,0%	2,0%	3,0%	2,0%	8,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
8	80,0%	0,0%	4,0%	5,0%	2,0%	6,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
17	95,0%	0,0%	1,0%	0,5%	0,5%	3,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
21	86,0%	0,0%	3,0%	3,0%	1,0%	3,0%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
27	94,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%
28	93,0%	0,0%	0,0%	3,5%	0,0%	2,5%	0,0%	0,0%	1,0%	0,0%	0,0%
29	93,0%	0,0%	0,0%	0,5%	1,0%	5,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
30	93,0%	0,0%	1,5%	2,0%	0,0%	3,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
31	91,5%	0,0%	1,0%	2,0%	0,5%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
32	90,0%	0,0%	3,0%	1,0%	0,5%	4,0%	1,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
33	91,5%	0,0%	1,5%	1,0%	0,0%	4,5%	1,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
34	92,0%	0,0%	1,5%	1,5%	0,5%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
35	85,0%	0,0%	0,5%	4,0%	2,0%	7,0%	1,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
40	88,0%	0,0%	1,0%	2,0%	0,0%	9,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
46	91,5%	0,0%	0,5%	5,0%	0,0%	3,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
55	90,5%	0,0%	1,0%	0,0%	0,0%	8,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
69	92,0%	0,0%	1,0%	1,0%	0,0%	5,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%

 Tabelle 1:
 FISH-Ergebnisse der analysierten Nichttumorgewebe mit der Sonde für das AR-Gen und der zentromerspezifischen Sonde des X-Chromosoms (CEPX). ^{a,b,c}

^a) Angegeben sind jeweils die prozentualen Anteile der FISH-Ergebnisse aus jeweils mindestens 200 ausgewerteten Zellkernen.

^b) AR: AR-Sonde; X: CEPX-Sonde

^c) grau unterlegt: auffällige FISH-Analysen im Tumorgewebe (s. Tabelle 2)

Patient	1xX;1xAR	0xX;1xAR	1xX;2xAR	1xX;0xAR	2xX;1xAR	2xX;2xAR	3xX;3xAR	3xX;2xAR	2xX;3xAR	1xX;3xAR	≥4xX;≥4xAR
1	81,0%	4,0%	0,0%	5,0%	1,0%	10,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
2	87,0%	0,0%	0,0%	9,0%	1,0%	3,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
3	63,0%	1,0%	11,0%	2,0%	6,0%	10,0%	1,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
4	49,0%	0,0%	5,0%	4,0%	2,5%	29,5%	5,5%	1,5%	2,0%	0,0%	0,0%
5	74,0%	0,0%	8,0%	5,0%	1,5%	9,5%	0,5%	0,0%	1,5%	0,0%	0,0%
6	69,5%	0,5%	7,5%	5,0%	3,0%	12,5%	0,5%	0,0%	0,5%	0,5%	0,0%
7	61,0%	1,5%	8,0%	5,0%	6,0%	16,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
8	43,0%	1,0%	15,0%	1,0%	11,0%	28,0%	1,0%	1,5%	0,5%	0,0%	0,5%
9	76,0%	0,0%	5,6%	5,0%	1,0%	10,0%	0,5%	1,0%	1,5%	0,0%	0,0%
10	73,0%	0,0%	4,0%	3,0%	2,0%	17,0%	1,0%	0,5%	1,0%	0,0%	0,0%
11	61,0%	1,0%	3,0%	10,0%	7,0%	13,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
12	75,0%	0,0%	2,0%	3,0%	4,0%	16,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
13	83,0%	0,0%	2,0%	4,0%	1,0%	10,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
14	77,0%	0,0%	4,0%	8,0%	2,0%	9,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
15	76,5%	0,0%	2,5%	3,0%	1,0%	15,0%	0,5%	0,5%	1,0%	0,0%	0,0%
16	72,0%	0,0%	3,0%	9,0%	1,0%	14,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
17	73,0%	0,0%	4,0%	3,0%	0,5%	17,0%	2,5%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%
18	71,5%	0,0%	6,0%	3,0%	1,0%	14,0%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

 Tabelle 2:
 FISH-Ergebnisse der 80 analysierten Prostatakarzinome mit der Sonde für das AR-Gen und der zentromerspezifischen Sonde des X-Chromosoms (CEPX). ^{a,b,c}

141

19	79,0%	0,0%	2,0%	3,0%	1,5%	13,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
20	74,0%	0,0%	1,5%	2,5%	1,5%	15,0%	2,0%	0,5%	1,5%	0,0%	0,0%
21	65,0%	0,5%	2,0%	2,5%	0,5%	24,0%	2,5%	1,5%	0,5%	0,0%	2,0%
22	72,0%	1,0%	3,0%	5,0%	3,0%	14,0%	0,5%	0,5%	0,5%	0,0%	0,0%
23	78,0%	0,5%	2,0%	3,0%	2,0%	9,5%	1,5%	0,5%	0,0%	0,5%	0,0%
24	71,0%	1,0%	2,0%	12,0%	1,0%	9,0%	0,0%	2,0%	0,0%	0,0%	1,0%
25	79,0%	3,0%	4,0%	5,0%	0,0%	8,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
26	80,0%	0,5%	3,0%	6,0%	1,5%	8,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
27	84,0%	1,0%	3,0%	6,0%	2,5%	3,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
28	79,0%	0,5%	1,0%	4,5%	1,0%	14,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
29	84,0%	0,0%	4,5%	3,5%	0,0%	7,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
30	87,0%	0,0%	3,5%	3,0%	3,5%	6,5%	1,5%	0,0%	0,0%	1,0%	0,0%
31	84,0%	0,0%	5,0%	2,5%	1,5%	5,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
32	64,0%	0,5%	3,0%	2,0%	4,0%	16,0%	10,5%	1,0%	1,0%	1,0%	2,0%
33	87,0%	0,0%	0,5%	1,0%	1,5%	9,0%	1,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
34	97,0%	0,0%	0,5%	1,0%	1,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
35	86,0%	0,0%	0,0%	4,0%	0,5%	9,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%
36	81,0%	0,0%	1,0%	1,0%	0,5%	15,0%	0,5%	0,0%	0,5%	0,0%	0,5%
37	91,0%	0,0%	0,5%	3,5%	1,0%	3,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
38	86,0%	0,0%	3,0%	2,0%	0,5%	7,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
39	89,0%	0,0%	1,0%	2,5%	0,5%	7,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
40	67,0%	0,0%	1,5%	1,5%	0,0%	28,5%	2,5%	0,0%	0,0%	0,0%	1,0%
41	87,0%	1,0%	1,0%	0,0%	0,0%	9,5%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%

42	86,0%	0,0%	2,0%	0,0%	1,0%	10,0%	0,5%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
43	89,0%	0,5%	1,0%	2,0%	1,0%	5,0%	0,0%	0,5%	0,5%	0,5%	0,0%
44	91,0%	0,0%	0,5%	2,0%	0,5%	4,5%	0,5%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
45	88,0%	0,0%	1,0%	1,0%	2,0%	7,5%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
46	51,0%	0,0%	1,5%	0,5%	0,5%	39,5%	3,0%	0,0%	1,0%	0,0%	3,0%
47	81,0%	0,0%	10,0%	0,5%	1,0%	6,0%	2,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
48	90,0%	0,5%	3,5%	0,5%	1,0%	5,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
49	88,0%	0,0%	1,0%	1,0%	1,0%	9,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
50	82,0%	0,0%	8,5%	0,0%	1,5%	7,0%	0,5%	0,0%	1,0%	0,0%	0,0%
51	91,0%	0,0%	1,0%	1,5%	0,5%	6,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
52	90,5%	0,0%	1,5%	3,5%	0,5%	4,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
53	87,0%	0,0%	0,5%	2,0%	0,0%	11,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
54	94,5%	0,0%	1,0%	0,0%	1,5%	3,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
55	53,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	43,0%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	2,0%
56	94,5%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	4,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%
57	94,5%	0,0%	0,0%	1,0%	0,0%	4,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
58	95,5%	0,0%	0,0%	1,0%	0,0%	3,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
59	88,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,5%	10,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
60	94,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	5,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
61	95,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
62	94,5%	0,0%	0,0%	2,5%	1,5%	1,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
63	90,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	9,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
64	93,0%	0,0%	0,5%	0,5%	0,0%	6,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

65	95,0%	0,0%	0,0%	1,5%	0,0%	3,5%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
66	94,0%	0,0%	0,5%	1,0%	0,0%	4,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
67	94,5%	0,0%	0,5%	0,5%	0,0%	4,0%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
68	84,0%	0,0%	2,0%	0,0%	0,0%	8,0%	2,0%	0,0%	0,5%	2,0%	1,5%
69	77,0%	0,0%	1,5%	0,0%	0,0%	21,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
70	90,0%	0,0%	0,0%	3,5%	1,0%	4,5%	1,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
71	84,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%	12,0%	1,5%	0,0%	1,5%	0,0%	0,0%
72	95,5%	0,0%	1,5%	0,0%	0,0%	2,5%	0,5%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
73	92,0%	0,0%	2,5%	0,5%	0,0%	5,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
74	93,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	6,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
75	92,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,5%	5,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
76	94,0%	0,0%	2,0%	1,5%	0,0%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
77	87,0%	0,0%	1,0%	0,5%	0,0%	11,0%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
78	90,0%	1,0%	0,5%	0,5%	0,0%	8,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
79	91,0%	0,0%	0,0%	1,0%	0,0%	8,5%	0,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
80	96,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	3,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

^a) Angegeben sind jeweils die prozentualen Anteile der FISH-Ergebnisse aus jeweils mindestens 200 ausgewerteten Zellkernen.

^b) AR: AR-Sonde; X: CEP X-Sonde

^c) grau unterlegt: auffällige FISH-Analysen

		Signa	ale für das	X-Chrom	osom	Signa	ale für das	Y-Chrom	osom	Signale für das Chromosom 18			
Patient		0	1	2	≥3	0	1	2	≥3	1	2	3	≥4
2	Tu	5,0%	88,0%	7,0%	0,0%	20,0%	76,0%	4,0%	0,0%	41,0%	52,0%	2,0%	0,0%
	NT	1,0%	94,0%	5,0%	0,0%	8,0%	87,0%	5,0%	0,0%	20,0%	78,0%	2,0%	0,0%
4	Tu	2,0%	63,0%	33,5%	3,0%	4,0%	77,5%	19,5%	0,5%	7,5%	77,5%	7,0%	9,5%
	NT	0,0%	92,5%	6,0%	1,0%	3,0%	79,5%	15,0%	2,5%	4,5%	87,0%	8,5%	0,0%
8	Tu	3,0%	66,0%	27,5%	3,0%	6,0%	72,0%	20,0%	1,5%	12,0%	73,5%	7,5%	6,0%
	NT	2,5%	89,0%	8,0%	0,5%	3,0%	88,5%	7,5%	1,0%	7,5%	83,0%	7,5%	2,0%
12	Tu	0,0%	87,7%	15,5%	2,5%	13,0%	76,7%	14,0%	1,5%	8,0%	91,7%	3,5%	2,0%
	NT	0,0%	86,5%	6,0%	0,0%	8,5%	83,0%	1,0%	0,0%	6,0%	83,5%	3,0%	0,0%
17	Tu	0,0%	76,0%	23,0%	1,5%	5,0%	80,5%	14,5%	0,5%	4,0%	80,0%	3,0%	13,5%
	NT	0,0%	96,0%	3,5%	0,0%	4,0%	93,0%	2,5%	0,0%	3,0%	93,5%	0,5%	2,5%
21	Tu	0,5%	68,5%	30,5%	1,0%	7,5%	72,5%	19,0%	1,0%	3,5%	72,0%	4,0%	21,0%
	NT	0,0%	93,5%	6,5%	0,0%	2,5%	89,5%	8,0%	0,0%	2,5%	89,5%	1,5%	6,5%
28	Tu	2,5%	85,5%	9,5%	0,0%	4,0%	85,0%	8,0%	0,5%	6,5%	84,0%	1,0%	6,0%
	NT	0,0%	98,5%	2,0%	0,0%	0,0%	98,5%	2,0%	0,0%	2,0%	97,0%	0,5%	1,0%
29	Tu	3,0%	81,5%	13,5%	2,0%	6,0%	82,0%	11,0%	1,0%	9,0%	81,0%	3,5%	6,5%
	NT	2,5%	92,5%	5,0%	0,0%	6,0%	90,0%	4,0%	0,0%	13,5%	84,0%	0,5%	2,0%
30	Tu	1,5%	87,5%	9,5%	1,5%	5,5%	84,5%	8,5%	1,5%	8,5%	83,5%	1,0%	7,0%
	NT	0,0%	97,0%	3,0%	0,0%	0,5%	96,5%	3,0%	0,0%	3,5%	93,5%	0,5%	2,5%

Tabelle 3:	FISH-Ergebnisse mit den	zentromerspezifischen S	onden der Chromosomen >	X, Y und 18 (CEP)	(, CEPY, CEP18). ^{a,b}
	0			, , ,	

31	Tu	3,0%	89,0%	7,0%	0,0%	9,0%	84,0%	6,0%	0,0%	6,0%	87,0%	3,0%	3,0%
	NT	0,0%	96,0%	4,0%	0,0%	1,0%	97,0%	2,0%	0,0%	2,5%	95,5%	1,0%	1,0%
32	Tu	1,0%	63,5%	29,5%	6,0%	5,5%	64,5%	25,5%	4,5%	2,5%	72,0%	2,5%	23,0%
	NT	0,0%	94,5%	5,5%	0,0%	3,5%	88,0%	6,5%	0,0%	3,0%	93,0%	1,0%	3,0%
33	Tu	2,0%	74,0%	18,5%	1,0%	1,5%	76,5%	16,5%	1,0%	6,0%	72,0%	2,5%	15,0%
	NT	0,0%	96,5%	1,0%	0,0%	0,0%	82,5%	15,0%	0,0%	1,0%	95,5%	0,5%	0,5%
34	Tu	2,0%	96,0%	2,0%	0,0%	5,0%	93,0%	2,0%	0,0%	2,0%	94,0%	3,0%	0,0%
	NT	0,0%	97,5%	2,5%	0,0%	0,0%	92,5%	7,5%	0,0%	1,5%	97,5%	0,0%	1,0%
40	Tu	1,5%	63,0%	34,5%	0,0%	4,5%	62,5%	32,0%	0,0%	9,5%	65,5%	6,5%	17,5%
	NT	0,0%	92,5%	6,5%	0,0%	1,5%	93,0%	4,5%	0,0%	11,5%	83,0%	0,5%	3,5%
46	Tu	2,0%	54,5%	40,0%	3,0%	7,0%	65,5%	25,0%	2,5%	6,5%	60,0%	4,5%	29,0%
	NT	0,0%	96,0%	4,5%	0,0%	3,5%	90,5%	6,5%	0,0%	7,0%	89,5%	0,5%	3,5%
55	Tu	0,0%	53,5%	44,0%	2,5%	5,5%	65,0%	27,5%	2,0%	4,0%	66,5%	3,0%	26,5%
	NT	0,0%	91,5%	8,5%	0,0%	3,0%	87,5%	9,5%	0,0%	8,5%	87,0%	2,0%	5,5%
69	Tu	0,5%	81,0%	19,0%	2,0%	6,5%	81,5%	12,5%	2,0%	2,0%	83,5%	6,5%	10,5%
	NT	0,0%	97,0%	3,5%	0,0%	4,5%	93,5%	2,5%	0,0%	5,5%	93,0%	1,0%	1,0%

^a) Angegeben sind jeweils die prozentualen Anteile der FISH-Ergebnisse aus jeweils mindestens 200 ausgewerteten Zellkernen.

^b) grau unterlegt: auffällige FISH-Analysen mit der Sonde für das AR-Gen und der zentromerspezifischen Sonde des X-Chromosoms

1. Versuch ^a	595	nm	hđ	ı/μl	420)nm	Akti	vität	Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40 ^t
0-Kontrolle	0,182	0,158	19,2	16,6	0,031	0,022	0,48	0,39	0,43		
SV40-Kontrolle	0,102	0,091	10,4	9,2	0,053	0,048	1,51	1,55	1,53	1,10	100,0%
DICE1 Prom4	0,158	0,155	16,6	16,2	0,031	0,033	0,55	0,60	0,58	0,15	14,0%
DICE1 Prom7	0,159	0,191	16,7	20,2	0,025	0,029	0,45	0,43	0,44	0,01	1,0%
DICE1 Prom6	0,113	0,151	11,6	15,8	0,050	0,071	1,28	1,33	1,31	0,88	80,0%
2.Versuch	595	nm	μg	ı/μl	420)nm	Akti	vität	Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40
0-Kontrolle	0,160	0,191	16,8	20,2	0,016	0,023	0,28	0,34	0,31		
SV40-Kontrolle	0,112	0,102	11,5	10,4	0,050	0,051	1,29	1,45	1,37	1,06	100,0%
DICE1 Prom6	0,128	0,154	13,3	16,2	0,056	0,066	1,24	1,20	1,22	0,91	86,0%
DICE1 Prom4	0,146	0,180	15,2	19,0	0,019	0,029	0,37	0,45	0,41	0,10	9,4%
DICE1 Prom7	0,157	0,152	16,5	15,9	0,018	0,018	0,33	0,32	0,33	0,02	2,0%
DICE1 Prom8	0,131	0,113	13,6	11,6	0,014	0,013	0,30	0,33	0,32	0,01	1,0%
3. Versuch	595	nm	μg	ı/μl	420)nm	Akti	vität	Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40
0-Kontrolle	0,087	0,077	8,7	7,6	0,005	0,006	0,17	0,23	0,20		
SV40-Kontrolle	0,083	0,062	8,3	6,0	0,037	0,027	1,32	1,33	1,33	1,03	100,0%
DICE1 Prom4	0,070	0,076	6,9	7,5	0,008	0,006	0,35	0,25	0,30	0,10	9,7%
DICE1 Prom2	0,086	0,093	8,6	9,4	0,005	0,006	0,17	0,19	0,18	0,00	0,0%
DICE1 Prom8	0,093	0,082	9,4	8,1	0,007	0,005	0,22	0,18	0,20	0,00	0,0%
DICE1 Prom1	0,082	0,075	8,1	7,4	0,040	0,038	1,46	1,52	1,49	1,29	125,0%

Tabelle 4: Auflistung der einzelnen Ergebnisse für die Bestimmung der relativen Aktivität der β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte

4. Versuch	595	nm	μg	ı∕µI	420)nm	Akti	vität	Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40
0-Kontrolle	0,158	0,191	16,6	20,2	0,019	0,020	0,34	0,30	0,32		
SV40-Kontrolle	0,104	0,113	10,6	11,6	0,054	0,061	1,51	1,56	1,54	1,22	100,0%
DICE1 Prom1	0,131	0,115	13,6	11,8	0,084	0,076	1,83	1,91	1,87	1,55	127,0%
methyl. DICE1 Prom1	0,146	0,127	15,2	13,2	0,019	0,017	0,37	0,38	0,38	0,06	4,9%
DICE1 Prom6	0,127	0,142	13,2	14,8	0,059	0,068	1,32	1,36	1,34	1,02	84,0%
methyl. DICE1 Prom6	0,143	0,160	15,0	16,8	0,015	0,016	0,30	0,28	0,29	0,00	0,0%
5.Versuch	595	nm	μg	ı/μl	420)nm	Akti	vität	Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40
0-Kontrolle	0,095	0,117	9,6	12,1	0,008	0,010	0,25	0,24	0,25		
SV40-Kontrolle	0,119	0,113	12,3	11,6	0,053	0,051	1,28	1,30	1,29	1,04	100,0%
DICE1 Prom1	0,109	0,095	11,2	9,6	0,061	0,049	1,61	1,51	1,56	1,31	126,0%
methyl. DICE1 Prom1	0,104	0,102	10,6	10,4	0,010	0,011	0,28	0,31	0,30	0,05	4,8%
DICE1 Prom5	0,146	0,128	15,2	13,4	0,040	0,034	0,78	0,75	0,77	0,52	50,0%
DICE1 Prom6	0,093	0,083	9,4	8,3	0,035	0,030	1,10	1,07	1,09	0,84	81,0%
methyl. DICE1 Prom6	0,143	0,160	15,0	16,8	0,015	0,016	0,21	0,26	0,24	0,00	0,0%
6. Versuch	595	nm	μg	ı/μl	420)nm	Akti	vität	Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40
0-Kontrolle	0,095	0,142	9,6	14,8	0,010	0,015	0,31	0,30	0,31		
SV40-Kontrolle	0,194	0,176	20,6	18,6	0,109	0,091	1,58	1,45	1,51	1,20	100,0%
DICE1 Prom5	0,098	0,100	9,9	10,0	0,035	0,031	1,05	0,91	0,98	0,67	56,0%
DICE1 Prom2	0,193	0,227	20,6	24,2	0,020	0,026	0,28	0,32	0,30	0,00	0,0%

7. Versuch	595 nm		µg/µl		420nm		Aktivität		Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40b
0-Kontrolle	0,127	0,134	13,1	13,9	0,018	0,021	0,41	0,45	0,43		
SV40-Kontrolle	0,116	0,099	11,9	10,0	0,057	0,048	1,42	1,42	1,42	0,99	100,0%
DICE1 Prom5	0,149	0,141	15,6	14,7	0,048	0,050	0,91	1,01	0,96	0,53	53,5%
DICE1 Prom3	0,114	0,175	11,7	18,5	0,017	0,027	0,43	0,43	0,43	0,00	0,0%
DICE1 Prom1	0,119	0,101	12,3	10,3	0,071	0,059	1,71	1,70	1,71	1,28	129,0%
DICE1 Prom1 13bpDel	0,181	0,117	19,1	12,2	0,099	0,065	1,54	1,58	1,56	1,13	114,0%
8. Versuch	595 nm		µg/µl		420nm		Aktivität		Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40
0-Kontrolle	0,163	0,146	17,1	15,3	0,028	0,026	0,48	0,51	0,50		
SV40-Kontrolle	0,147	0,155	15,4	16,3	0,108	0,106	2,08	1,93	2,00	1,50	100,0%
DICE1 Prom1	0,175	0,161	18,5	16,9	0,147	0,129	2,35	2,26	2,31	1,81	121,0%
DICE1 Prom1 13bpDel	0,158	0,171	16,6	18,0	0,117	0,132	2,08	2,17	2,13	1,63	109,0%
DICE1 Prom3	0,119	0,104	12,3	10,6	0,023	0,019	0,55	0,54	0,55	0,05	3,0%
9. Versuch	595 nm		µg/µl		420nm		Aktivität		Durchschnitt	- Nullwert	% von SV40
0-Kontrolle	0,093		4,2		0,005		0,35		0,35		
SV40-Kontrolle	0,065		3,1		0,015		1,43		1,43	1,08	100,0%
SV40 methyl. 1.Ansatz	0,056	0,065	2,5	3,1	0,010	0,013	1,19	1,24	1,22	0,87	80,1%
SV40 methyl. 2.Ansatz	0,055	0,077	2,55	3,75	0,011	0,015	1,28	1,19	1,24	0,89	81,9%

^a) Bezeichnung der β-Galaktosidase-Expressionskonstrukte nach den DICE1-Fragmenten in Tabelle 4.4

^b) Relative Aktivität der β-Galaktosidase-Konstrukte

Lebenslauf

Persönliche Daten:	Albrecht Röpke							
	geboren am 14. Juli 1972 in Halle							
	verheiratet mit Dr. med. Anja Röpke, geb. Hofmann							
	2 Kinder							
Staatsbürgerschaft:	Deutsch							
<u>Bildungsweg:</u>								
1979-1982	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Halle							
1982-1991	Mitglied des Thomanerchores Leipzig							
1982-1991	Besuch der Erweiterten Thomasoberschule in Leipzig							
1991	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife							
1991-1993	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz							
Oktober 1993	Beginn des Studiums Biochemie/Biotechnologie an der							
	Martin-Luther-Universität Halle							
Oktober 1997	mündliche Diplom-Hauptprüfung							
Nov. '97- Sep. '98	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Humangenetik							
	und Med. Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg							
Contomb on 4000	(Direktor: Prof. Dr. I. Hansmann)							
September 1998	Diplom-Biochemiker" mit der Note sehr aut"							
Berufstätigkeit:								
Jan. '99 – März '00	wissenschaftl. Mitarbeiter am Institut für Humangenetik							
	und Med. Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg							
seit März 2000	wissenschaftl. Mitarbeiter (Anfertigung der Dissertation) am Institut für							
	Humangenetik an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg							
	(Direktor: Prof. Dr. P. Wieacker)							

Publikationsliste

- 1. Giannakudis I, Röpke A, Kujat A et al. Parental mosaicism of JAG1 mutations in families with Alagille syndrome. Eur J Hum Genet 2001;9:209-216.
- Wieland I, Röpke A, Stumm M, Sell C, Weidle U, Wieacker PF. Molecular characterization of the human DICE1 candidate tumor suppressor gene on 13q14.3. Oncology Res. 2001;12:491-500.
- Röpke A, Stumm M, Wieacker P. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) an nichtkultivierten Amnionzellen zur Diagnostik häufiger Chromosomenstörungen. Reproduktionsmedizin 2002;18:289-294.
- 4. Röpke A, Kujat A, Gräber A, Giannakudis J, Hansmann I. Identification of 36 novel Jagged1 (JAG1) mutations in patients with Alagille syndrome. Hum Mutat. 2003;21:100.
- 5. Röpke A, Erbersdobler A, Hammerer P, John K, Stumm M, Wieacker PF (2004). Gain of androgen receptor gene copies in primary prostate cancer due to X chromosome polysomy. Prostate 2004;59: 59-68.
- Röpke A, Pelz AF, Volleth M, Schlosser HW, Morlot S, Wieacker PF. Sex chromosomal mosaicism in the gonads of patients with gonadal dysgenesis, but normal female or male karyotypes in lymphocytes. Am J Obstet Gynecol. 2004;190:1059-1062.
- Muschke P, Gola H, Varon R, Röpke A, Zumkeller W, Wieacker P, Stumm M. Retrospective diagnosis and subsequent prenatal diagnosis of Nijmegen breakage syndrome. Prenat Diagn. 2004;24:111-113.
- Röpke A, Allhoff EP, Wieacker PF. Mutationen des Androgenrezeptor-Gens als mögliche Ursache der Antiandrogenresistenz beim Prostatakarzinom. Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 2004;1 in press.