

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zur pathophysiologischen Funktion des Sec62-
Proteins bei der Entwicklung von bösartigen Tumoren des
Menschen und seiner Bedeutung als Tumor- und
Prognosemarker**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2011

vorgelegt von

Birgit Klemmer

geboren am 09.12.1977 in Völklingen

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bous, den

(Birgit Klemmer)

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Berichterstatte:

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	5
Summary	8
1. Einleitung	11
<i>1.1 Das Prostatakarzinom</i>	11
1.1.1 Das kastrationsresistente Prostatakarzinom.....	12
1.1.2 Molekulargenetik des Prostatakarzinoms	14
1.1.2.1 Amplifikationen beim Prostatakarzinom.....	17
1.1.3 Biomarker	18
1.1.3.1 Biomarker für das Prostatakarzinom	19
<i>1.2 Mechanismus der Tumorinvasion</i>	22
<i>1.3 Das endoplasmatische Retikulum</i>	25
1.3.1 Das ER-Translokon	25
1.3.2 Das ER-Membranprotein Sec62.....	27
1.3.3 ER-Stress	28
1.3.4 Pathophysiologische Funktion von ER-Proteinen bei humanen Erkrankungen..	
.....	31
Zielsetzung	33
2. Material und Methoden	35
2.1. <i>Material</i>	35
2.1.1 Chemikalien.....	35
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	36
2.1.3 Geräte.....	37
2.1.4 Enzyme und Kits	38
2.1.5 Primer für Sequenzierung	39
2.1.6 Primer für “real time”-PCR	40
2.1.7 Zelllinien.....	41
2.1.8 Zellkulturmedien	42

2.1.9	Software.....	42
2.2	<i>Methoden</i>	43
2.2.1	Zellkulturmethoden	43
2.2.1.1	Kultivierung und Subkultivierung von Zellen.....	43
2.2.1.2	Auftauen von Zellen	43
2.2.1.3	Einfrieren von Zellen.....	43
2.2.1.4	Zellzählung	44
2.2.2	Zellbiologische Methoden	44
2.2.2.1	Zellviabilitybestimmungen mittels WST-1 Test	44
2.2.2.2	Apoptose-Nachweis.....	45
2.2.2.3	Nekrose-Nachweis.....	46
2.2.2.4	Proliferations-Nachweis	47
2.2.2.5	Transfektion der Zelllinien mit siRNA.....	47
2.2.2.6	Invasionsassay	48
2.2.2.7	Induktion von ER-Stress.....	50
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen.....	51
2.2.3.2	Isolierung genomischer DNA aus Blut.....	52
2.2.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	53
2.2.3.4	Quantifizierung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren.....	53
2.2.3.5	Reverse Transkription.....	53
2.2.3.6	Polymerase Kettenreaktion.....	54
2.2.3.7	Agarosegelelektrophorese	56
2.2.3.8	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	57
2.2.3.9	“real time”-PCR (RT-PCR).....	64
2.2.3.10	Sequenzierung	66
2.2.4	Biochemische Methoden	67
2.2.4.1	Western Blot	67
2.2.4.2	Proteom-Analyse	70
2.2.4.3	Immunhistochemische Färbung von Multi-Tumor-Gewebearray.....	75
3.	Ergebnisse	76
3.1	<i>Amplifikation von SEC62 in Tumorzelllinien unterschiedlicher Organsysteme</i>	76

3.2	<i>Auswirkung von SEC62-Amplifikationen auf die Genexpression.....</i>	81
3.3	<i>Mutationsanalysen.....</i>	82
3.4	<i>Immunhistochemische Sec62-Färbung an einem Multi-Tumor-Gewebearray</i>	83
3.5	<i>Untersuchung zum Einfluss von ER-Stress auf den Sec62-Proteingehalt in Prostatakarzinomzelllinien.....</i>	91
3.6	<i>Induktion von Apoptose durch ER-Stressoren.....</i>	95
3.7	<i>siRNA vermittelte Depletion von SEC62</i>	97
3.7.1	<i>Einfluss von SEC62 auf das Proteom von PC3-Zellen.....</i>	97
3.7.2	<i>Einfluss von SEC62 auf die Invasion von Tumorzellen.....</i>	102
4.	Diskussion.....	114
4.1	<i>Eignung von SEC62 als diagnostischer Biomarker</i>	114
4.1.1	<i>SEC62-Amplifikation und Expression in Tumoren</i>	115
4.1.2	<i>Mutationen im SEC62-Gen als möglicher Mechanismus für die veränderte Funktion im Prostatakarzinom</i>	118
4.1.3	<i>Erhöhte Sec62-Proteinmenge in Tumoren</i>	120
4.2	<i>Pathophysiologische Funktionen von Sec62 in Tumoren.....</i>	123
4.2.1	<i>Proteinsynthese von Sec62 nach ER-Stress</i>	123
4.2.2	<i>Erhöhter Sec62-Proteingehalt in Zellen schützt vor Thapsigargin induzierter Apoptose.....</i>	124
4.2.3	<i>Einfluss der siRNA vermittelten Depletion von SEC62 auf das Proteom.....</i>	127
4.2.4	<i>Sec62 ist essentiell für das invasive Wachstum von Tumorzellen.....</i>	129
	Literaturverzeichnis	135
	Verzeichnis der Veröffentlichungen	151
	Danksagung.....	153
	Lebenslauf	154

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAC	bacterial artificial chromosome
BiP	immunoglobulin heavy chain binding protein
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CDD	cell death detection
CGH	comparative genomic hybridization
Ct	cycle of threshold
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
cDNA	complementary DNA
d.h.	das heißt
dd	bidestilliert
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
DRU	digital-rektale Untersuchung
DTT	Dithiothreitol
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EN	enrichment factor
ERj1	ER DnaJ-like protein 1
et al.	et altera
FGF	fibroblast growth factor

FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GO	gene ontology
GRP78	glucose-regulated protein 78
h	Stunde
H ₂ Odest.	destilliertes Wasser
HSP40	Hitzeschockprotein 40
Ig	Immunoglobulin
IEF	isoelektrische Fokussierung
IRES	internal ribosomal entry site
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli
M	Molar
mA	Milliampère
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
N	Normale
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphatpuffer
PCa	Prostatakarzinom
PCa3	prostate cancer gene 3
PCR	polymerase chain reaction
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
Rnase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Saline Sodium Citrat
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA box binding protein
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF-β	transforming growth factor-β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
W	Watt
WST	water soluble tetrazolium
xg	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μJoule	Mikrojoule
μm	Mikrometer
μM	Mikromol

μl	Mikroliter
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

Zusammenfassung

Für die Charakterisierung von Sec62 als Biomarker wurden verschiedene experimentelle Ansätze herangezogen. Interessanterweise zeigte das mithilfe der FISH durchgeführte Amplifikations-Screening nicht nur in den Prostatakarzinomzelllinien eine Genkopienzahlvermehrung von *SEC62*, sondern auch in allen anderen untersuchten Tumorzelllinien. Aufgrund dessen konnte die Schlussfolgerung getroffen werden, dass eine Amplifikation von *SEC62* ein tumorspezifisches Phänomen ist. Zusätzlich zum Nachweis numerischer Veränderungen von *SEC62* wurde die Expression des Gens untersucht. Bedingt durch die Amplifikation zeigte sich nur in den Tumorzelllinien HT1080 und HT29 eine Überexpression des Gens, was bedeutet, dass weitere Regulationsmechanismen bei der Expression eine Rolle spielen könnten. Der Nachweis von *SEC62*-Amplifikationen bzw. einer Überexpression eignet sich nicht, aufgrund der Heterogenität der Tumorzellen, als prognostischer oder diagnostischer Marker. In dieser Arbeit konnten überdies Mutationen des *SEC62*-Gens als Ursache für die veränderte Funktion von Sec62 in Prostatakarzinomzelllinien ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung 55 verschiedener Tumorentitäten und deren Subtypen sowie 132 Proben aus Normalgeweben mittels Tumor-Gewebearray lieferte sehr vielversprechende Ergebnisse. Hinsichtlich der erzielten Ergebnisse zeigt sich ein großes Potential für Sec62 als Biomarker bei der diagnostischen Verwendung an Lungen- und Schilddrüsengewebe. Des Weiteren könnte Sec62 auch als Marker zur Differenzierung von Karzinom- und Normalgewebe im Hoden und Pankreas angewandt werden. Da Bronchialkarzinome durch eine 3q-Amplifikation ausgezeichnet sind, sollte bei dieser Tumorentität weiter untersucht werden, ob eine *SEC62*-Kopienzahlvermehrung für die erhöhte Synthese von Sec62 verantwortlich ist. Aufgrund der Tatsache, dass nur die Hälfte der Prostatakarzinompatienten einen erhöhten Sec62-Proteingehalt aufweist, lässt sich Sec62 bei dieser Tumorentität nicht als diagnostischer Marker einsetzen. Allerdings ergaben parallel durchgeführte Untersuchungen in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Pathologie sowie Medizinische Biochemie und Molekularbiologie vielversprechende Hinweise, dass der Sec62-Proteingehalt als prognostischer Marker dienen könnte, um zwischen niedrig malignen und invasiven, aggressiven Tumoren zu unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde durch verschiedene experimentelle Ansätze die pathophysiologische Funktion von Sec62, bei der Initiation und Progression von Prostatakarzinomen

und darüber hinaus auch von anderen Tumorentitäten, untersucht. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, wodurch ein erhöhter Sec62-Proteingehalt in Prostatakarzinomzellen mit höherem Gleason Score verursacht wird. Es wurde untersucht, ob ER-Stress für die vermehrte Synthese von Sec62 verantwortlich ist, wie es für die ER-ständigen Proteine BiP/GRP78 und GRP170 bereits nachgewiesen wurde. Allerdings erfolgte in den untersuchten Zellen keine Veränderung des Sec62-Proteingehaltes durch ER-Stressinduktion. Dabei kann auch eine allgemeine ER-Expansion für die erhöhte Sec62-Synthese ausgeschlossen werden, da Gene, die für andere ER-Membranproteine kodieren wie beispielsweise Sec61 α , Sec61 β oder Sec63 in den analysierten Tumorzelllinien keine Überexpression aufweisen. Somit zeigt die spezifische Selektion von Sec62-überproduzierenden Tumorzellen, dass die veränderte Funktion von Sec62 zu einem Proliferationsvorteil führt. Des Weiteren wurde geprüft, ob ein erhöhter Sec62-Proteingehalt in Prostatakarzinomzellen vor einer durch ER-Stress induzierten Apoptose schützt. Hierbei wurde deutlich, dass das in der Literatur als potentielles Therapeutikum diskutierte Thapsigargin nur in Tumorzellen mit geringem Sec62-Gehalt Apoptose initiiert. Tumorzellen mit erhöhtem Sec62-Gehalt sind vor Thapsigargin induziertem ER-Stress geschützt. Eine Verminderung der Sec62-Proteinmenge führt dazu, dass die Zellen sensitiver auf diesen Stressor reagieren. Somit hat eine erhöhte Sec62-Synthese in den untersuchten Zellen einen protektiven Effekt vor Thapsigargin initiiert Apoptose, indem möglicherweise Sec62 indirekt den Kalziumausstrom aus dem ER verhindert und der intrinsische Signalweg der Apoptose gehemmt wird. Ein weiterer Hinweis, dass Sec62 im Signalweg der Stressantwort eine Rolle spielt, wurde durch eine Proteomuntersuchung an *SEC62* depletierten PC3-Zellen gestützt. Hierbei zeigte sich, dass ein Ausschalten von *SEC62* dazu führt, dass Proteine synthetisiert werden, die in ER-Stress assoziierten Signalwegen eine Rolle spielen.

Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Invasionsfähigkeit von Karzinomzellen, deren *SEC62* experimentell durch siRNA ausgeschaltet wurde. Hintergrund dieses Versuches war die Tatsache, dass die Häufigkeit einer Überproduktion von Sec62 mit zunehmender Entdifferenzierung von Prostatakarzinomzellen zunimmt und Sec62 somit eine Funktion bei der Metastasierung einnimmt. Der „knock down“ von *SEC62* führte in allen untersuchten Tumorzelllinien zu einem deutlichen Rückgang des Invasionspotentials, ohne Vitalität und Proliferation der Zellen negativ zu beeinflussen. Ein Grund für diese Beobachtung könnte die Beteiligung von Sec62 an der Biogenese von

Proteinen sein. Wobei ein „knock down“ von *SEC62* dazu führen könnte, dass Proteine, die für die Invasionsfähigkeit von Karzinomzellen verantwortlich sind, nicht mehr ins ER oder zur Membran gelangen und somit auch nicht an ihren Wirkungsort transportiert werden können. Da die Migration auch ein stark Kalzium regulierter Prozess ist und Sec62 an der Kalzium-Homöostase beteiligt zu sein scheint, könnte ein verminderter Sec62-Proteingehalt in Karzinomzellen auf diesem Wege auch die Migration, durch Einflussnahme auf die zytosolische Kalziumkonzentration, beeinträchtigen. *SEC62* könnte somit als neues Zielmolekül für eine innovative Therapie mit siRNAs bei der Behandlung von Prostatakarzinomen, aber auch anderen Tumorentitäten, dienen. Zusammenfassend lässt sich aufgrund der experimentellen Daten postulieren, dass ein vermehrtes Auftreten von Sec62 an tumorrelevanten Prozessen, wie der Invasion in benachbartes Gewebe, beteiligt ist. Dies korreliert mit der histologisch diagnostizierten verstärkten Expression in Tumoren der Prostata, die ein organüberschreitendes Wachstum aufzeigen.

Summary

For the characterization of Sec62 as a biomarker different experimental approaches were used. Amazingly, an amplification screening carried out by the use of FISH showed a copy number increase of *SEC62* not only in the prostate cancer cell lines, but also in all examined tumor cell lines. For this reason, the conclusion could be made that an amplification of *SEC62* is a tumor-specific phenomenon. In addition to the detection of numerical changes of *SEC62*-gene, the expression of the gene was examined. These examinations revealed an overexpression of the gene only in the tumor cell lines HT1080 and HT29, indicating that further regulatory mechanisms may be involved. The detection of *SEC62*-amplifications or overexpression of this gene is not suitable as prognostic or diagnostic markers, due to the heterogeneity of tumor cells. Moreover, in this work, mutations in the *SEC62*-gene could be excluded in prostate cancer cell lines as a cause for the altered function of Sec62.

The study of 55 different tumor types and their subtypes as well as 132 normal tissue samples using a tumor tissue array yielded very promising results. In this analysis Sec62 showed a great potential for the use as a diagnostic biomarker of lung and thyroid tissue. In addition, Sec62 may also be used as a marker for the differentiation of carcinoma and normal tissue in the testes and pancreas. Because lung cancer is commonly characterized by an amplification of the q-arm of chromosome 3, in this tumor entity it should be further examined, whether a Sec62 copy number increase is responsible for the increased synthesis of Sec62. However, due to the fact that only half of the prostate cancer patients showed an increased Sec62 protein content, this cannot be used as a diagnostic marker for prostate cancer. Nevertheless, studies carried out in collaboration with the groups of Pathology and Medical Biochemistry and Molecular Biology revealed promising indications that the Sec62 protein content could serve as a prognostic marker to distinguish between low-grade tumors and as a prognostic marker for the identification of invasive and aggressive tumors.

In this work, the pathophysiological function of Sec62 in the initiation and progression of prostate cancer as well as other tumor entities was studied by various experimental approaches. In this context it was also an interesting point to answer the question, what was causative for the increased Sec62 protein level in prostate cancer with higher Gleason score. First it was analyzed, whether ER stress was responsible for the

increased synthesis of Sec62, as it already has been demonstrated for other ER-bound proteins, such as BiP/GRP78 and GRP170. However, no alteration of Sec62 protein content was induced by ER stress in the examined cells. Second also a general ER-expansion could be excluded to be responsible for the increased Sec62 as the genes encoding for other ER membrane proteins like Sec61 α , Sec61 β or Sec63 were not over expressed in the analyzed tumor cell lines. This specific selection for Sec62 overproducing tumor cells indicates that the function of Sec62 leads to a proliferating advantage for the cells. A further question was, whether the different Sec62-protein contents protect prostate cancer cells from apoptosis induced by ER stress. Thapsigargin, a compound discussed as a potential therapeutic agent in the literature, turned out to initiate apoptosis only in tumor cells with low-Sec62 content. Tumor cells with increased Sec62 content are protected against thapsigargin-induced ER stress, while a reduction in the amount of Sec62 protein makes the cells more sensitive to this stressor. Thus, an increased Sec62 synthesis in cells has a protective effect against thapsigargin-initiated apoptosis. This can be due to an indirect prevention of the calcium efflux from the ER by Sec62 and thereby the intrinsically pathway of apoptosis is inhibited. A further indication, that Sec62 plays a role in the stress response pathway, was gained by a proteomic analysis of Sec62-depleted PC3 cells.

An important point in my work was to examine the invasion ability of cancer cells in which *SEC62* was depleted by siRNA treatment. Background of this experiment was the fact that the frequency of Sec62 overproduction raised with an increasing dedifferentiation of prostate cancer cells and thus Sec62 appeared to function in metastasis. The knock down of SEC62 resulted in all examined tumor cell lines in an impressive decrease in invasion potential without any negative influence on the vitality and the proliferation of the cells. One reason for this observation could be the involvement of Sec62 in the biogenesis of proteins responsible for the invasion of cancer cells and, due to the knock down of Sec62 don't reach the ER or the membrane anymore and thus cannot be transported to their site of action. Because migration is also a strongly calcium-regulated process and Sec62 appeared to be involved in calcium homeostasis, a decreased Sec62 protein content in carcinoma cells could also affect the migration by its influence on cytosolic calcium concentration. Sec62 may thus serve as a new target for an innovative therapy with siRNAs for the treatment not only of prostate cancer, but even of other tumor entities.

On the basis of the experimental data the conclusion can be drawn, that an increased incidence of Sec62 is involved in tumor-relevant cell biological processes such as invasion of surrounding tissue. This correlates with the histological diagnosed increased expression in prostate tumors that show an organ-border growth.

1. Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCa) ist in Deutschland die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes und nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache in der männlichen Bevölkerung (Krebsregister 2008 des Robert Koch Instituts). 2008 wurden allein im Saarland 736 Prostatakarzinome neu diagnostiziert und 169 Todesfälle registriert. Die Ursachen für die Entstehung des Prostatakarzinoms sind bisher noch weitgehend unbekannt, doch werden multifaktorielle Ursachen als Auslöser der Entstehung des PCa diskutiert (Flanders, 1984). Neben dem Alter als wichtigster Risikofaktor spielt die ethnographische Herkunft und damit verbundene Lebensgewohnheiten eine entscheidende Rolle. Während sich unter Asiaten die niedrigsten Neuerkrankungen aufweisen, zeigt die afroamerikanische Bevölkerung die höchste Inzidenz weltweit (Powell, 2007). Dabei scheint auch die Ernährung einen Einfluss auf die Entstehung des Prostatakarzinoms zu haben, wobei einem vermehrten Fett- und Fleischkonsum ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zugeschrieben wird (Gann et al., 1994). Tritt die Erkrankung vor dem 50. Lebensjahr auf, so ist eine genetische Disposition, die oft auch mit einer familiären Häufung einhergeht, zu vermuten. Für Männer, deren männliche Verwandte ersten Grades (Vater oder Bruder) an einem Prostatakarzinom erkrankt waren, ist das Risiko zu erkranken um das 2- bis 3-Fache erhöht (Johns und Houlston, 2003). Etwa 10% der Prostatakarzinome sind erblich bedingt.

Androgene, wie Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) sind ebenso wie der Androgenrezeptor (AR) bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms von großer Relevanz, da das primäre Karzinom in seinem Wachstum hormonabhängig ist. Testosteron wird in der Prostatazelle mittels 5α -Reduktase zu dem biologisch 5-fach aktiveren DHT reduziert. Durch die Bindung von DHT an den zytoplasmatischen AR, kommt es zur Konformationsänderung, wodurch Hitzeschockproteine vom AR abdissoziieren. Durch Dimerisierung des AR wird eine Kernimportsequenz freigesetzt, und der AR-Komplex transloziert in den Zellkern (Black und Paschal, 2004). Dort bindet er an „androgene responsive elements“ (ARE) im Enhancer- bzw. Promotorbereich seiner Zielgene. In nicht neoplastischen Zellen reguliert der AR auf diese Weise Wachstum, Proliferation und Apoptose der Zellen. In Prostatakarzinomzellen ist das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation gestört, und es kommt aufgrund des Ungleichge-

wichts zu unkontrolliertem Wachstum der Zellen, ausgelöst durch hormonelle Stimulation. Aus diesem Grund spielt die Androgenablation bzw. die Blockade des AR durch Antiandrogene bei der Therapie des metastasierenden Prostatakarzinoms eine zentrale Rolle. Nach primärer Hormondeprivation kommt es jedoch bei Patienten mit einem initial hormonabhängigen Prostatakarzinom zum Progress durch hormonunabhängige Tumorzellen.

1.1.1 Das kastrationsresistente Prostatakarzinom

Die hohe Mortalitätsrate beim Prostatakarzinom ist auf das kastrationsresistente Prostatakarzinom („castrate-refractory prostate cancer“, CRPCa) zurückzuführen. Dieses stellt eine besondere Herausforderung für die Therapie dar. Als kastrationsresistent bezeichnet man ein Prostatakarzinom, das Progression zeigt, obwohl der Testosteronspiegel auf Kastrationsniveau gehalten bzw. reduziert wird. Die Entwicklung eines hormonsensitiven und androgenabhängigen zu einem kastrationsresistenten Karzinom ist ein komplexer multifaktorieller Prozess mit klonaler Selektion und Adaptation, währenddessen sich eine große Zahl molekularer Mechanismen abspielen. Jedoch sind die genauen Ursachen für eine Hormonunabhängigkeit und Hormonresistenz bis dato nicht geklärt. Es scheinen jedoch unterschiedliche Pathomechanismen einen Beitrag zur Entstehung kastrationsresistenter Zellpopulationen zu leisten. Viele davon betreffen den Androgenrezeptor bzw. seine Signalkaskade. Hierzu gibt es verschiedene Hypothesen.

Die erste Möglichkeit besteht darin, dass sich Prostatakarzinomzellen an sehr geringe Mengen von Androgenen anpassen können, was einerseits durch Amplifikation des Androgenrezeptors oder andererseits durch eine höhere Empfindlichkeit des Rezeptors für Androgene (Adaptationstheorie) erfolgen kann. Die Adaptationstheorie geht im Prostatakarzinom von homogenen hormonsensiblen Zellklonen aus. Diese adaptieren sich nach primärer Androgenblockade an ein androgenarmes Milieu und führen so zur Progression. Hier könnte nur eine komplette Androgenblockade, der testikulären und adrenalen Androgene, ein effizientes therapeutisches Verfahren darstellen (Labrie et al., 1982). Ebenso können im androgenarmen Milieu Amplifikationen des Androgenrezeptors dazu führen, dass schon geringste Veränderungen des Androgenspiegels zu einer Rezeptorantwort, sprich einer Wachstumsstimulation und damit zum Tumorprogress führen können (Visakorpi et al., 1995a).

Die zweite Option liegt darin, dass das Auftreten von Mutationen im *AR*-Gen zur Synthese eines im Bereich der Hormonbindungsdomäne veränderten Proteins führt. Der Rezeptor kann nun nicht mehr nur durch die Androgene Testosteron bzw. DHT aktiviert werden, sondern auch durch andere Steroidhormone wie Antiandrogene oder auch Östrogene und Progesteron (Elo et al., 1995). Mutationen des für den Androgenrezeptor kodierenden Gens lassen sich in 50% der Metastasen des Prostatakarzinoms nachweisen (Taplin et al., 1995).

Als dritte Möglichkeit wird eine ligandenunabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors durch Wachstumsfaktoren diskutiert. Nachgewiesen wurde diese Aktivierung des ARs für die Wachstumsfaktoren IGF („insulin like growth factor“), KGF („keratinocyte growth factor“) und EGF („epidermal growth factor“) sowie für Cytokine wie IL-6 (Feldman und Feldman, 2001). Diese können über die entsprechenden Tyrosinkinaserzeptoren (IGF-R, KGF-R, EGF-R, IL-6-R) den AR phosphorylieren und transaktivieren.

Der vierte Mechanismus zeigt, dass Prostatakarzinomzellen durch Hochregulation von antiapoptotischen Molekülen wie Bcl2 („b-cell lymphoma 2“) die Fähigkeit erlangen, ohne den Einfluss des ARs zu überleben. Studien haben gezeigt, dass im CRPCa zunehmend Proteine zur Steuerung der Apoptose synthetisiert werden, wodurch der Zelltod verhindert wird, und es zur Tumorprogression kommt (McDonnell et al., 1992). Eine erhöhte Konzentration dieser antiapoptotischen Proteine wie Bcl2, scheint ebenfalls für eine Resistenz gegenüber Chemotherapie verantwortlich zu sein (Tu et al., 1995).

Des Weiteren konnten Debes und Tindall (2004) in Prostatakarzinomzellen eine Differenzierung zu neuroendokrinen Zellen nachweisen. Diese sind charakterisiert durch eine sehr geringe Proliferationsrate und stimulieren durch Ausschüttung von Neuropeptiden benachbarte Zellen zum Wachstum, was Tumorzellen ebenfalls ein Überleben ohne den Einfluss von Androgenen ermöglicht (Debes und Tindall, 2004).

Die letzte Möglichkeit beschreibt den Mechanismus der Regeneration des Tumors durch „cancer initiating cells“ (CIS) bzw. „cancer stem cells“(CSC). Tumorstammzellen besitzen selbst keinen AR, haben aber die Fähigkeit, sich in androgenabhängige sowie androgenunabhängige Zellen zu differenzieren. Dies führt dazu, dass neue undifferenzierte hormonunabhängige Karzinomzellen trotz Antiandrogentherapie entstehen können und weiter proliferieren (Pienta und Bradley, 2006).

1.1.2 Molekulargenetik des Prostatakarzinoms

Für das Prostatakarzinom ist ein Mehrschritt-Modell der Krebsentstehung wahrscheinlich (Bott et al., 2005), wobei die genauen molekularen Mechanismen, die zur Genese und Progression des Prostatakarzinoms führen, weitgehend unbekannt sind. Initiiert wird die Entstehung einer Tumorzelle durch eine Anhäufung unterschiedlicher genetischer Veränderungen, was zu unkontrolliertem Wachstum, Blockierung der Zelldifferenzierung, Störung des programmierten Zelltodes (Apoptose) und letzten Endes zur Tumorzellinvasion und Metastasierung führt.

Zytogenetische Analysen und die Anwendung der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) zeigten in den letzten Jahren eine Reihe von spezifischen karyotypischen Veränderungen beim Prostatakarzinom (Cher et al., 1996; Fu et al., 2000; Torring et al., 2007; Visakorpi et al., 1995b). Mehrere Arbeitsgruppen fanden DNA-Verluste auf den chromosomalen Regionen 5q, 6q, 8p, 13q, 16q und 18q und DNA-Gewinne auf 3q25-q26, 8q21-q22, 12q13-q21, 7q31 und Xq22-q25, 9q34.4-qter, 17q25-qter und 20q13.3-qter. Zugewinne werden vorwiegend in fortgeschrittenen und metastasierten Tumoren des Prostatakarzinoms gefunden (Nupponen und Visakorpi, 1999). Gewinne der Chromosomen 8 und X sowie *AR*-Amplifikationen stehen mit der Progression des Prostatakarzinoms in Verbindung (Miyoshi et al., 2000). 20 - 30% der hormonabhängigen rekurrenten Prostatakarzinome tragen *AR*-Genamplifikationen (Koivisto et al., 1997; Visakorpi et al., 1995a). Mit der Genamplifikation geht auch die Überexpression des *AR*-Gens einher, was durch Expressionsstudien nachgewiesen werden konnte. Gewinne von Chromosom 8 beim Prostatakarzinom sind nicht nur mit einem höheren Tumorstadium und höherem Tumorgrad assoziiert (Matsuyama et al., 2003; Tsuchiya et al., 2002), sondern auch mit höheren Metastasierungs- und Rezidivraten (Macoska et al., 2000) sowie einer höheren Mortalität (Sato et al., 1999).

Auf einigen dieser oben genannten Loci sind bekannte Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene lokalisiert, welche bereits in anderen Tumoren als verändert beschrieben wurden. Onkogene sind definiert als Gene deren Aktivierung das Tumorstadium fördert. Sie umfassen vor allem Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren. Sie liegen in Tumoren meistens amplifiziert oder mutiert vor. Da Onkogene rezessiv sind, reicht es aus, wenn nur ein Allel durch Mutation bzw. Deletion in der Zelle betroffen ist, um diese zu transformieren. Ein

bekanntes Onkogen, welches in einer Vielzahl von Tumoren, unter anderem auch beim Prostatakarzinom als amplifiziert beschrieben wird, ist das *c-MYC*-Gen (Jenkins et al., 1997). Durch seine Überexpression treten ruhende Zellen in den Zellzyklus ein, was eine Unterdrückung von Zelldifferenzierungsvorgängen zur Folge hat. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Onkogenen werden Gene als Tumorsuppressoren bezeichnet, wenn ihre Deletion bzw. Deaktivierung die Tumorentstehung und das Tumorwachstum begünstigt. In nicht neoplastischen Zellen lösen Tumorsuppressorgene Apoptose aus oder sind an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Tumorsuppressorgene sind im Unterschied zu Onkogenen rezessiv, was dazu führt, dass beide Allele verändert vorliegen müssen, damit es Auswirkungen auf die Zelle hat. Eine Strategie zur Identifizierung von Tumorsuppressorgenen ist die LOH-Analyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker. Zu den bedeutenden Tumorsuppressorgenen zählt *TP53*. Dieses Gen ist in zahlreichen Tumoren deletiert oder liegt in einer mutierten Form vor, was zu einem Funktionsverlust führt. p53 bindet im Zellkern an die DNA und wirkt als Transkriptionsfaktor. Nach DNA-Schädigung ist p53 in der Lage, durch Hemmung phosphatgruppenübertragender Enzyme, den Zellzyklus zu arretieren und Apoptose zu induzieren.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorangehenden Studien Gewinne auf Chromosom 3q25-26 beim Prostatakarzinom nachweisen (Sattler et al., 2000; Sattler et al., 1999). Diese Ergebnisse bestätigten die Daten von Cher et al. (1996), die in 45% androgenunabhängiger Prostatakarzinome und unbehandelter Metastasen Gewinne auf Chromosom 3q detektieren (Cher et al., 1996). Anhand von CGH-Studien an einem Xenograft des Prostatakarzinoms (Williams et al., 1997) und an der Prostatakarzinomzelllinie DU145 (Nupponen et al., 1998) konnten ebenfalls Gewinne auf 3q nachgewiesen werden. Durch Feinkartierung dieses Amplikons mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und quantitativer „real-time“-PCR konnte *SEC62* als wichtigstes Kandidatengen mit der höchsten Amplifikationsrate (50%) in Prostatakarzinomen identifiziert werden. Dabei zeigten alle analysierten Prostatakarzinome eine Überexpression von *SEC62* auf mRNA-Ebene (Jung et al., 2006). Die *SEC62*-mRNA Überexpression beschränkt sich jedoch nicht nur auf Tumore mit einer *SEC62*-Amplifikation (Jung et al., 2006). Diese Forschungsergebnisse bilden die Grundlage dieser Arbeit.

Nicht nur beim Prostatakarzinom sind Gewinne von genetischem Material auf Chromosom 3q beschrieben, sondern auch bei Karzinomen des HNO-Bereiches (Singh et al., 2001), bei gynäkologischen Tumoren (Stoltzfus et al., 2005), beim Bronchialkarzinom

(Pelosi et al., 2007) und dem Ösophaguskarzinom (Imoto et al., 2001). Jedoch ergibt sich auf molekularer Ebene, hinsichtlich der Kandidatengene dieser Region, ein sehr heterogenes Bild. Während *SOX2* das wahrscheinlichste Zielgen in Ösophaguskarzinomen zu sein scheint (Gen et al., 2010), wurde in Ovarialkarzinomen eine biologische Rolle für *PIK3CA* (Woenckhaus et al., 2007), in Zervixkarzinomen für *hTERC* (Alameda et al., 2009) und in Karzinomen des HNO-Bereiches für *SCCRO* und *PIK3CA* (Estilo et al., 2003) nachgewiesen.

Die Entstehung und der Verlauf von Tumoren werden außerdem durch epigenetische Regulation der Genexpression beeinflusst. Die Regulierung erfolgt durch DNA-Hyper- sowie Hypomethylierung, Phosphorylierung und Histonmodifikation. Gefunden werden Hypermethylierungen im Bereich von Promotoren und den ersten Exons, wobei lediglich die von einem Guanin gefolgte Cytosinbase (CpG-Dinukleotid) betroffen ist. Als Folge wird während des „gene silencing“ die Expression eines bestimmten Gens gehemmt. Im Gegensatz dazu kommt es durch Hypomethylierung zur Genaktivierung (Jones und Baylin, 2002). Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass man anhand des CpG-Methylierungsmusters unterschiedlicher Gene zwischen normalem Prostatagewebe und Prostatakarzinomgewebe mit hoher Sensitivität und Spezifität differenzieren kann (Yegnasubramanian et al., 2004).

Neueren Studien zufolge sind Tumore aus einer heterogenen Zellpopulation aufgebaut, wobei nur eine kleine Subpopulation der Zellen die Kapazität besitzt, klonales Wachstum zu initiieren (Lawson und Witte, 2007). Die verschiedenen Tumorzellpopulationen weisen ein unterschiedliches Potential zur Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung auf. Sie sind hierarchisch gegliedert, wobei putative Tumorstammzellen an der Spitze stehen. Diese stellen eine undifferenzierte Population von Tumorzellen dar, die zur Selbsterneuerung und zu unbegrenzter Proliferation fähig sind. Tumorstammzellen bringen eine große Anzahl Progenitor- bzw. differenzierter Zellen hervor, die den Primärtumor bilden. Sie scheinen für die Tumorinitiation, -homöostase und -progression in einigen soliden Tumoren verantwortlich zu sein (Er, 2009; Singh et al., 2004; Sullivan et al., 2010). Auch beim Prostatakarzinom ist die Existenz putativer Tumorstammzellen wahrscheinlich. Diese zeichnen sich durch das Vorhandensein spezifischer Oberflächenmoleküle und Signaltransduktionswege aus. Einigen Forschergruppen gelang z.B. durch den Nachweis der Oberflächenmarker CD133 und CD44 sowie des Zelloberflächenproteins $\alpha_2\beta_1$ -Integrin beim Prostatakarzinom mutmaßliche Tumorstammzellen zu identifi-

zieren (Klarmann et al., 2009; Vander Griend et al., 2008). Diese Population, sich sehr langsam teilender Tumorstammzellen, scheint für die geringe Wirkung von Chemotherapeutika beim Prostatakarzinom mit verantwortlich zu sein. Daraus resultierend setzt man derzeit beim Prostatakarzinom besonders auf neue gezielte Therapien, deren Wirkung unabhängig von der Zellproliferation ist. Man versucht Tumorstammzellen als Angriffspunkte für „targeted therapies“ zu nutzen, um diese noch wirksamer zu gestalten.

1.1.2.1 Amplifikationen beim Prostatakarzinom

Eine Form genetischer Instabilitäten sind Genamplifikationen, die durch Vervielfachung einer DNA-Sequenz bzw. eines Gens entstehen. Der amplifizierte Sequenzabschnitt wird als Amplikon bezeichnet. Fukumoto et al. (1988) gehen davon aus, dass in Tumoren Amplifikationen selektiert werden, um die Expression eines bzw. mehrerer Gene drastisch zu steigern, wodurch eine natürliche Limitierung der Wachstumsrate durch begrenzt verfügbare Genprodukte aufgehoben wird (Fukumoto et al., 1988). Im Gegensatz dazu lassen sich in nicht-neoplastischen Zellen keine Amplifikationen nachweisen, was zeigt, dass Mechanismen existieren, welche diese Zellen davor schützen (Tlsty, 1990). Amplifizierte DNA kann in verschiedenen Formen vorliegen: als extrachromosomale „double-minutes“ (dmin) Chromosomen, als intrachromosomale „homogeneously staining regions“ (hsr) oder aber verstreut im gesamten Genom (Albertson, 2006; Schwab, 1999). „double-minutes“ sind paarweise vorliegende zirkuläre Chromatinstrukturen, welche die amplifizierte Sequenz enthalten (Debatisse et al., 1998). Da sie kein Zentromer enthalten, werden sie bei der Zellteilung als azentrische Fragmente zufällig auf die Tochterzellen verteilt. Sie replizieren sich unabhängig von den Chromosomen und ihre Anzahl kann in einer Zellpopulation stark variieren. „homogeneously staining regions“ sind terminale oder interstitielle Amplifikationen bestimmter DNA-Sequenzen. Diese Regionen zeigen nach einer Chromosomenbänderung kein typisches Bänderungsmuster, sondern sind als einheitlich gefärbte Chromosomenabschnitte sichtbar (Narayanan et al., 2006; Schwab, 1999). Der genaue Entstehungsmechanismus von Genamplifikationen ist bislang ungeklärt. Mögliche Initiationsmechanismen zur Förderung von Amplifikationen könnten jedoch Defekte in der DNA-Replikation, eine Dysfunktion der Telomere oder aber sog. „fragile sites“ darstellen (Albertson, 2006). Amplifikationen von Onkogenen treten relativ spät im Rahmen der Tumorprogression auf und verschaffen malignen Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellpopulationen (Brison, 1993).

1.1.3 Biomarker

Prostatakarzinome sind in ihrer klinischen Aggressivität sehr verschieden. Ein Teil der Karzinome, die aufgrund eines erhöhten PSA-Wertes gefunden werden, sind klinisch noch nicht manifest und werden es wahrscheinlich auch nicht. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existiert kein Verfahren, welches den Verlauf der Erkrankung voraussagen vermag und die klinisch bedeutsamen von klinisch irrelevanten Karzinomen mit hinreichender Sicherheit unterscheiden kann. Daher ist es von besonderem Interesse solche Biomarker für das Prostatakarzinom zu identifizieren, um die aggressiven von den klinisch unauffälligen Tumoren unterscheiden zu können.

Biomarker sind definiert als Substanzen, deren Nachweis eine Aussage über Vorliegen, Prognose oder Verlauf einer malignen Tumorerkrankung ermöglichen. Eine Vielzahl möglicher Moleküle konnte bereits mithilfe von Hochdurchsatzverfahren wie der cDNA-Microarray-Technologie identifiziert werden. Hierbei werden die Gen-Expressionsmuster von Patienten mit Prostatakrebs mit denen von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) verglichen (Luo et al., 2001). Diese Methode erlaubt die Analyse der Expression von Genen auf RNA-Ebene, jedoch können keine Aussagen in Bezug auf die Konzentration oder Funktion des fertigen Proteins getroffen werden. Aus diesem Grund erfolgt die Validierung putativer Marker auf Proteinebene beispielsweise mithilfe der Immunhistochemie (IHC). Zu diesem Zweck steht ein weiteres Hochdurchsatzverfahren, die Tissue-Microarray-Technologie (TMA-Technologie), zur Verfügung. Unter Verwendung dieser Methode können Hunderte Gewebeproben parallel auf einem einzigen Objektträger, in einem Durchgang, unter denselben standardisierten Bedingungen analysiert werden (Kuefer et al., 2004). Eine weitere sehr innovative Methode bei der Identifizierung von Biomarkern stellt die Kombination von 2D-DIGE und Massenspektrometrie dar. Hierbei werden die Proteome von Normalgewebe mit Karzinomgewebe verglichen. Mit dieser Technik lassen sich bis zu tausend Proteine auftrennen und analysieren. Durch Vergleich der Proteinprofile können charakteristische Unterschiede detektiert werden, wodurch sich Rückschlüsse auf die pathologischen Prozesse ziehen lassen. Trotz dieser Verfahren gibt es bis dato keinen bekannten Biomarker, der eine 100%-ige Spezifität und Sensitivität aufzeigt. Aus der Vielzahl der beschriebenen Tumormarker haben sich nur wenige in der Routine als brauchbar erwiesen. Hier sind einige Tumormarker des Prostatakarzinoms dargestellt.

1.1.3.1 Biomarker für das Prostatakarzinom

Prostata-spezifisches Antigen (PSA)

Unter den Biomarkern des Prostatakarzinoms hat die PSA-Konzentration im Serum die größte klinische Bedeutung. Eingesetzt wird die PSA-Bestimmung für die Diagnose, die postoperative Kontrolle und die Therapiekontrolle. Das PSA stellt dabei jedoch keinen Tumormarker im eigentlichen Sinne dar, denn ein Anstieg im Serum kann sowohl bei Vorliegen einer Prostatitis, einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) wie auch bei einem Karzinom nachgewiesen werden. Somit ist das PSA zwar ein organspezifischer, aber kein tumorspezifischer Prostatamarker. Das PSA ist eine Glykoprotein-Serin-Protease aus der Familie der glandulären Kallikreingene und wird von den Epithelzellen der Prostata gebildet. Es findet sich in hohen Konzentrationen im Seminalplasma und dient der Verflüssigung des Ejakulats. Seine Bildung steht unter der Kontrolle von Androgenen.

Schwierig ist die Bestimmung eines Grenzwertes, um die optimale Unterscheidung zwischen gut- und bösartiger Veränderung der Prostata zu ermöglichen. Bei den meisten international angewandten Testverfahren wurde ein „cut-off“ von 4 ng/ml PSA im Serum festgelegt (Crawford et al., 1996). Von Fachgesellschaften liegen Empfehlungen vor schon bei PSA-Werten unter 4 ng/ml eine Biopsie in Betracht zu ziehen, da so diagnostizierte Karzinome eine ausgezeichnete Prognose aufweisen (Catalona, 1997). Bei PSA-Werten über 10 ng/ml wird nur noch ein Drittel der Tumore in einem organbegrenzten Stadium diagnostiziert (Kleer et al., 1993). Zur besseren Differenzierung zwischen Prostatakarzinom und BPH werden das freie PSA und die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit herangezogen. Eingesetzt wird die PSA-Bestimmung nicht nur im Rahmen der Früherkennung, sondern auch zur Diagnose der Tumorausdehnung. Der Tumor ist bei Werten unter 10 ng/ml fast immer organbegrenzt lokalisiert; auch sind die Lymphknoten nur sehr selten befallen und Knochenmetastasen sind fast nie zu finden. Organüberschreitende Ausdehnung des Tumors zeigt sich dagegen bei PSA-Werten über 10 ng/ml und einem hohen Gleason-Score von 6 bis 10. Die Bestimmung des PSA-Wertes wird ebenfalls zur Beurteilung eines Therapieerfolges eingesetzt. Dabei wird ein Abfall des präoperativen PSA-Wertes nach abgeschlossener Therapie als Merkmal einer Remission gewertet. Kommt es jedoch zu einem erneuten Anstieg des PSA-Wertes, so ist dies ein frühes Anzeichen für einen Tumorprogress.

PCa-3

PCa-3 ist ein prostataspezifisches Gen, namens *DD3*, das in Prostatakarzinomen eine 60- bis 100-Fache Überexpression zeigt (Bussemakers et al., 1999). Diese erhöhte *PCa-3* Expression lässt sich in 95% der untersuchten Prostatakarzinomen nachweisen (Hessels et al., 2003). *PCa-3* ist im Gegensatz zum PSA spezifisch für das Prostatakarzinom. Seit einigen Jahren steht ein *PCa-3*-Test zur Verfügung, der Prostatazellen aus einer Urinprobe analysiert. Der Test basiert auf der Quantifizierung der *PCa-3*-mRNA und der *PSA*-mRNA im Spontanurin nach Prostatamassage. Der *PCa-3*-Score wird ermittelt, indem man das Verhältnis von *PCa3*-mRNA zu *PSA*-mRNA bildet. Durch Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Rebiopsie bei einem Score über 35 sinnvoll ist (Marks et al., 2007). Hierbei beträgt die Sensitivität 58% und die Spezifität 72%. Der *PCa-3*-Test kann als zusätzliches Testverfahren im Grauzonenbereich der Diagnostik des Prostatakarzinoms eingesetzt werden, zum Beispiel wenn das PSA erhöht ist, die digital-rektale Untersuchung (DRU) und der transrektaler Ultraschall (TRUS) jedoch ohne Befund sind (Stamey et al., 1993).

Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR)

AMACR ist ein Enzym, das an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt ist (Ferdinandusse et al., 2000). Sie wurde erstmalig im Jahr 2000 als differenziell exprimiertes Gen der Prostata beschrieben (Xu et al., 2000). Beim Vergleich von Prostatakarzinomgewebe mit gesundem Gewebe wurde eine 9-fach erhöhte Expression von *AMACR* festgestellt (Luo et al., 2002). In einer Gewebe-Microarray-Studie ließ sich in verschiedenen Tumorstadien von Prostatakarzinompatienten eine erhöhte Proteinmenge von *AMACR* mit einer 100%-igen Spezifität sowie einer 97%-igen Sensibilität nachweisen (Rubin et al., 2002). Die Untersuchung von Patientenserien zeigte, dass *AMACR* sensitiver und spezifischer als der PSA-Wert zwischen Karzinom- und Normalgewebe differenzieren kann (Sreekumar et al., 2004). In einer im Jahr 2008 durchgeführten Studie wurden insgesamt 640 radikale Prostatektomiepräparate auf den Gehalt von *AMACR* hin analysiert (Kristiansen et al., 2008). In 95% der Fälle zeigte sich eine stärkere Synthese von *AMACR* im Karzinom als im angrenzenden Normalgewebe. Lediglich 5% der Karzinomgewebe war *AMACR*-negativ. Klinische Anwendung findet der immunhistochemische Nachweis von *AMACR* in Kombination mit p63, GOLPH2 (Golgi-

Phosphoprotein 2) und FASN (Fettsäuresynthase) bei der Beurteilung histopathologischer Präparate (Kristiansen, 2009).

Genfusionsprodukt “transmembrane protease serine 2”/“erythroblast transformation-specific transcription factor”

Die am häufigsten gefundene chromosomale Veränderung beim Prostatakarzinom ist eine Genfusion von “transmembrane protease serine 2” (*TMPRSS2*) und den „erythroblast transformation-specific transcription factor”(ETS)-Genen aus der Familie der Transkriptionsfaktoren (Tomlins et al., 2005), wobei in 90% der Fälle das sogenannte „ETS related gene“ (*ERG*) Fusionspartner von *TMPRSS2* ist. Das prostata-spezifische *TMPRSS2*-Gen, das zur Familie der Serin-Proteasen gehört, wird durch Androgene aktiviert. Durch die Genfusion kommt es schon bei sehr geringen Androgenkonzentrationen, wie unter Hormondepletion beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom, zur Überexpression der betroffenen *ETS*-Gene (Kumar-Sinha et al., 2008). Ein verstärkter Nachweis dieser Genfusion ist mit einer erhöhten Identifizierung metastasierter Erkrankungen und/oder karzinombedingten Versterben assoziiert (Demichelis et al., 2007). In weiteren Untersuchungen konnte eine Verbindung zwischen der Genfusion und biologisch aggressiven Prostatakarzinomen gefunden werden (Kumar-Sinha et al., 2008; Perner et al., 2007). Ebenfalls zeigen Patienten mit einem erhöhten Gleason Score (> 7) deutlich häufiger eine *TEMPRSS2/ETS* Genfusion als Patienten mit niedrigem Gleason Score (Demichelis et al., 2007).

1.2 Mechanismus der Tumorinvasion

Die Hauptursache für die Morbidität beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom sind Knochenmetastasen. Eine Schlüsselrolle bei der Metastasierung maligner Tumoren spielt die Tumorinvasion in das angrenzende Wirtsgewebe. Bei diesem komplexen pathologischen Vorgang lösen sich die Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors heraus und dringen aktiv in das angrenzende Wirtsgewebe und in die Gefäße ein.

Eine Voraussetzung für die lokale Invasion in benachbartes Gewebe ist die epithelial- mesenchymale Transition (EMT). Diese erfordert von den Tumorzellen eine Änderung ihres epithelialen in einen mesenchymalen Charakter (Thiery und Sleeman, 2006). Dies bedeutet, dass nicht migrierende, polarisierte Zellen, die in einen Zellverband integriert sind, ihre Zell-Zellkontakte sowie ihre Zell-Matrixverbindungen lösen und zu migrierenden, unpolarierten, invasiven, mesenchymalen Zellen werden (Yilmaz und Christofori, 2009). Die Ursache liegt in der Veränderung des Expressionsmusters von an der Zelladhäsion beteiligten Komponenten wie z.B. E-Cadherin (Adherens-Junctions). Dabei wirken transkriptionelle Repressoren als Trigger der EMT. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören Mitglieder der Familie der Zinkfinger-Homöodomänentranskriptionsfaktoren ZEB1 (Postigo und Dean, 1997) und ZEB2 (Comijn et al., 2001) sowie Mitglieder der Snail-Familie wie die Transkriptionsfaktoren Snail (Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000), Slug (Bolos et al., 2003), Twist (Yang et al., 2004) sowie E12/47 (Perez-Moreno et al., 2001). Sie supprimieren indirekt und direkt die Genexpression des kalzium-abhängigen Zelladhäsionsproteins E-Cadherin (epithelialer Marker) (Spaderna et al., 2008; Yang und Weinberg, 2008) und initiieren z.B. die Expression von Vimentin (mesenchymaler Marker). Der Verlust der Expression dieses Zelloberflächenmoleküls E-Cadherin führt zum Verlust der Zell-Zell-Adhäsion im Tumor, wodurch sich maligne Zellen aus dem Zellverband lösen (Birchmeier und Behrens, 1994).

Um in angrenzendes, gesundes Gewebe eindringen zu können, müssen Tumorzellen die extrazelluläre Matrix (EZM) bzw. die Basallamina abbauen oder umstrukturieren (Albertson, 2006). An dieser Degradation sind unterschiedliche Klassen von Proteinasen wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), Cathepsine und Serin-Proteasen, beteiligt. Zu den Serinproteasen gehören die Urokinase Plasminogen-Aktivatoren (uPA), welche die Reaktion von inaktivem Plasminogen in das aktive Plasmin katalysieren (Laufs et al., 2006). Plasmin ist für die Degradation vieler EZM-Komponenten verantwortlich.

Die Proteolyse der EZM erfolgt vorwiegend durch an der Zelloberfläche lokalisierte Proteasen, die an Rezeptoren gebunden sein können, von den Tumorzellen sezerniert werden oder von Stromazellen nach Stimulation durch die Tumorzellen produziert werden. Eine erhöhte Expression der für diese Proteasen kodierenden Gene gilt als Indikator für die Metastasierungswahrscheinlichkeit. Das Invasionspotential von Tumorzellen korreliert dabei direkt mit der MMP-Synthese (Baker et al., 2000; Liotta et al., 1980). Während der Tumorprogression werden die Gene, die für diese Proteasen kodieren, überexprimiert und die Expression ihrer Inhibitoren („tissue inhibitors of metalloproteinases“ (*TIMPs*)) supprimiert (Hanahan und Weinberg, 2000). Eine verminderte *TIMP*-Expression geht mit erhöhter Metastasierung einher (Crawford und Matrisian, 1994). Somit ist ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs ein wichtiges Indiz für die Invasivität von Tumorzellen. Darüber hinaus sind diese Proteasen nicht nur an der Degradation der EZM beteiligt, sondern auch an weiteren Schritten der Metastasierung und Tumorprogression. Sie spielen beispielsweise während der Angiogenese (Stetler-Stevenson, 1999) oder aber während der Prozessierung von Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren (Werb, 1997) und der Prozessierung von E-Cadherin eine wichtige Rolle (Liu et al., 2006).

Ein weiterer zentraler Punkt bei der Metastasierung ist die gesteigerte Motilität von Tumorzellen, an der das tumorzelleigene Aktincytoskelett maßgeblich beteiligt ist. Dieser Vorgang wird von Rho-GTPasen wie Cdc42, Rac1 und RhoA und Integrinen vermittelt. Die Rho-GTPasen regulieren Signalwege, die mit der Zell-Adhäsion, Umstrukturierung des Cytoskeletts und der Zellmigration in Verbindung stehen (Malliri und Collard, 2003). Die für die Motilität verantwortlichen Faktoren werden sowohl vom gesunden Gewebe, als auch von den Tumorzellen selbst ausgeschüttet. Die migrierenden Tumorzellen durchlaufen, während der Fortbewegung durch das degradierte Gewebe, vier verschiedene Phasen. Dabei bilden sich am Leitsaum der Tumorzelle Pseudopodien aus, wobei Substrate der EZM gebunden werden. Die ganze Zelle kontrahiert, was zu einer Vorwärtsbewegung der Zelle führt (Adams, 2001). Die Aktin-Polymerisation spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Pseudopodien. Gesteuert wird diese über Oberflächenrezeptoren wie Integrine und Wachstumsfaktoren (Ayala et al., 2008; Clark und Weaver, 2008). An der Zelloberfläche lokalisierte Integrine sind wichtig für die zelluläre Signaltransduktion, da sie mittels ihrer zytoplasmatischen Domänen die Komponenten des Aktinskeletts der Zelle mit der EZM verbinden (Aplin und Juliano, 1999; Giancotti und Ruoslahti, 1999). Integrin aktiviert an den Pseudopodien MMP's, Plasmin und weitere Proteasen, wodurch die

stromale Kompartimentierung durchbrochen wird (Liotta und Kohn, 2001). Danen et al. (1993) konnten zeigen, dass Integrine an der Tumorprogression beteiligt sind und ihre Expression in menschlichen Tumoren mit der Zellbeweglichkeit und dem metastatischen Potential korreliert (Danen et al., 1993).

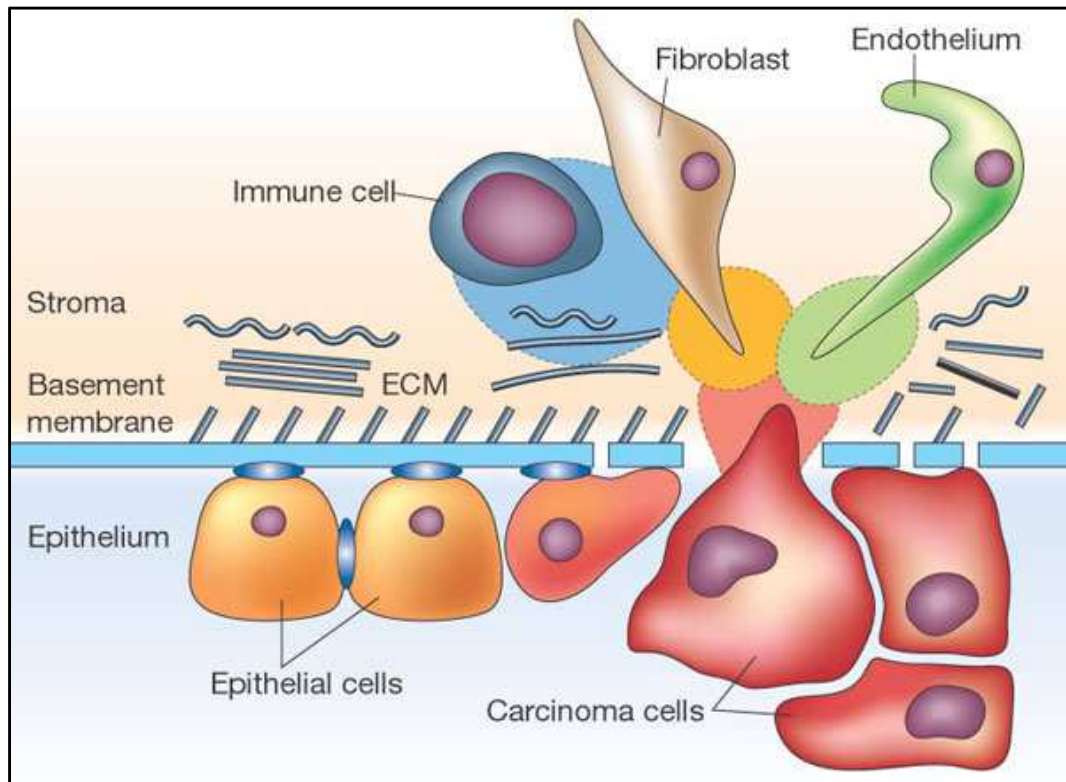


Abb. 1: Prozess der Invasion von Tumorzellen (Liotta und Kohn, 2001)

Während der Tumorprogression und Metastasierung spielen aber auch die Zellen der Mikroumgebung eine wichtige Rolle (siehe Abbildung 1). Es handelt sich hierbei um stromale Zellen wie Fibroblasten, um endotheliale Zellen (Hanahan und Weinberg, 2000) und um inflammatorische Zellen wie z.B. Makrophagen und Mastzellen. Diese Zellen, werden durch die Tumorzellen rekrutiert bzw. aktiviert. Aufgrund der parakrinen Wechselwirkungen werden u.a. Wachstum, Überleben, Invasion und Metastasierung der Tumorzellen gefördert (Joyce und Pollard, 2009; Vasiljeva et al., 2006).

Letzten Endes kommt es zur Intravasation in die Blut- und Lymphgefäße, was dazu führt, dass sich die Tumorzellen über den Blutkreislauf im Körper verteilen. Entkommen diese der körpereigenen Immunabwehr, so sind sie in der Lage, sich in den Mikrogefäßen verschiedener Organe festzusetzen, wo sie durch Extravasation aus den Gefäßen auswandern und in neuer Umgebung Kolonien (Metastasen) bilden. Beim fortge-

schrittenen Prostatakarzinom kommt es überwiegend zu einer lymphogenen Absiedlung in die regionalen und pelvinen Lymphknoten. Aber auch eine hämatogene Streuung in die Lendenwirbelsäule, das Becken und andere Knochenstrukturen ist möglich.

1.3 Das endoplasmatische Retikulum

Eine der wichtigsten Schritte in der Biosynthese der meisten sekretorischen und Membranproteine ist ihre Translokation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Blobel und Dobberstein, 1975). Das ER ist der Ort an dem, neben der Proteinfaltung und posttranslationalen Modifikation, auch der Proteintransport von sekretorischen und Transmembranproteinen stattfindet. Ihm kommt auch eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion zu, da das ER auch als intrazellulärer Kalziumspeicher dient.

Der Proteintransport erfolgt im Säuger meist cotranslational über den ER-Translokationsapparat. Die Proteine werden beim cotranslationalen Proteintransport noch während ihrer Synthese am Ribosom durch die ER-Membran transportiert. Beim posttranslationalen Transport werden die Proteine vollständig im Zytoplasma synthetisiert und anschließend durch die ER-Membran transportiert. Proteine, die für den Transport ins ER bestimmt sind, besitzen in der Regel in ihrer Aminosäuresequenz ein N-Terminal lokalisiertes Signalpeptid, das sie spezifisch zur ER-Membran leitet (Blobel und Dobberstein, 1975).

1.3.1 Das ER-Translokon

Der zentrale Bestandteil des ER-Translokationsapparates bildet der heterotrimere Sec61-Komplex, der aus den Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ besteht (Görlich und Rapoport, 1993; Hartmann et al., 1994). Der Sec61-Komplex ist dabei nicht nur am Transport der Proteine in das ER-Lumen beteiligt, sondern auch am retrograden Transport fehlgefalteter Proteine ins Zytosol (Pilon et al., 1997). Die ER-Membranproteine Sec62 und Sec63, die miteinander und mit dem Sec61-Komplex assoziieren können, scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle beim Proteintransport über die ER-Membran zu spielen (siehe Abbildung 2) (Daimon et al., 1997; Meyer et al., 2000; Skowronek et al., 1999; Tyedmers et al., 2000). Die Proteine Sec62 und Sec63 wurden erstmals in der Hefe identifiziert, wo sie essentiell für den posttranslationalen Proteintransport sind. Das Sec63 Protein besitzt eine J-Domäne und interagiert dadurch mit BiP/GRP78 als HSP40

Cochaperon. Welche genaue Funktion diese beiden Proteine ausüben, ist bis heute unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Proteine miteinander interagieren (Meyer et al., 2000; Müller et al., 2010b; Tyedmers et al., 2000).

In Abbildung 2 ist der Ablauf des cotranslationalen Transports von Vorläuferpolypeptiden und der daran beteiligten Untereinheiten des Translokationsapparates am endoplasmatischen Retikulum dargestellt. Der „signal recognition particle“ (SRP) erkennt die Signalsequenz der Polypeptidkette und bindet diese. Es kommt durch Interaktion mit dem Ribosom (hellblau) zum Elongationsarrest. Der Komplex aus SRP, Polypeptidkette und Ribosom bindet an die ER-Membran, so dass der SRP mit seinem Rezeptor und das Ribosom mit dem Sec61-Komplex interagieren können. Durch den SRP wird die Signalsequenz der Polypeptidkette auf den Sec61-Komplex transferiert, wodurch sich der Translokationskanal zum Lumen hin öffnet. Der C-Terminus wird durch die andauernde Elongation der Polypeptidkette durch die Membran geschoben. Der Signalpeptidase-Komplex (Spase) spaltet die Signalsequenz von der wachsenden Polypeptidkette ab und die restliche naszierende Polypeptidkette wird durch das Translokon ins Lumen des ER transportiert (Zimmermann et al., 2006).

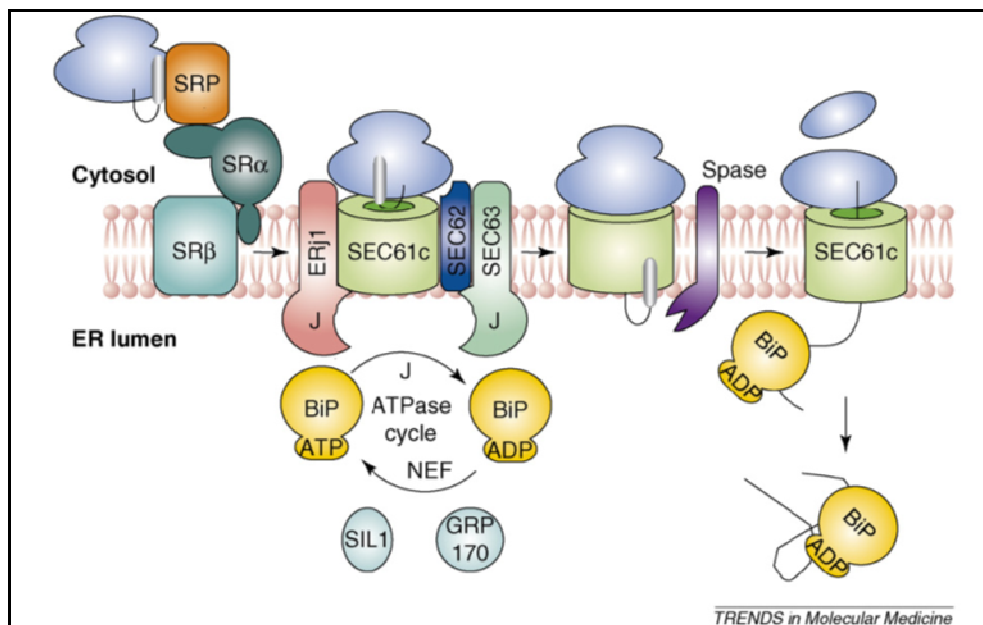


Abb. 2: ER-Translokasekomplex mit seinen Proteinuntereinheiten (Zimmermann et al., 2006)

1.3.2 Das ER-Membranprotein Sec62

Gegenstand meiner Arbeit ist die Charakterisierung des ER-Membranprotein Sec62, wobei der Fokus auf der pathologischen Funktion dieses Proteins liegt. In nicht-neoplastischen Zellen scheint Sec62 Teil eines multifunktionalen Transportkomplexes zu sein, da es im äquimolaren Verhältnis zu Sec61 in der ER-Membran von Hundepankreas-mikrosomen vorliegt, was die Untersuchung von Tyedmers et al. (2000) nahe legen (Tyedmers et al., 2000). Sec62 kann über zwei basische Oligopeptidmotive in seiner N-terminalen zytosolischen Domäne mit Ribosomen interagieren. Die Bindung erfolgt am Tunnelausgang des Ribosoms bzw. in seiner Nähe. Diese Interaktion bewirkt eine Translationshemmung, wobei die Inhibierung auf der Ebene der Initiation erfolgt. Sec62 ist somit in der Lage die Translation zu regulieren (Müller et al., 2010b). Sec62 könnte in Kooperation mit Sec63 eine Alternative zum ERj1-Protein darstellen, das ebenfalls durch seine zytosolische Domäne in Kontakt mit Ribosomen steht und durch seine luminale Domäne BiP/GRP78 zum Sec61-Komplex rekrutiert (Blau et al., 2005; Dudek et al., 2005; Dudek et al., 2002). Müller und Kollegen (2010) postulieren in ihrer Arbeit, dass Sec62 Einfluss auf die Proteintranslokation zum ER nehmen kann und indirekt, durch Interaktion mit dem Sec63 Protein, mit BiP/GRP78, dem Hauptregulator der „unfolded protein response“ (UPR) interagiert (Müller et al., 2010b).

Neben seiner vorrangig beschriebenen physiologischen Funktion scheint Sec62 aber auch bei der Entwicklung bzw. Progression von Tumoren, eine pathophysiologische Funktion auszuüben (Jung et al., 2006). Die Grundlage dieser Arbeit wurde von Jung et al. 2006 geliefert. Die Autoren zeigten, dass *SEC62* in Prostatakarzinomen amplifiziert und überexprimiert vorliegt. Neuere Studien zeigen, dass nicht nur die mRNA-Menge, sondern auch der Proteingehalt im Prostatakarzinomgewebe erhöht ist. Der erhöhte Sec62-Proteingehalt findet sich insbesondere in fortgeschrittenen Tumoren (Gleason Score ≥ 7 , 56%) und pT3b Tumoren, die die muskuläre Samenblasenwand infiltrieren. Die erhöhte Proteinmenge geht infolgedessen mit einer gesteigerten Tumoraggressivität und mit einer Verschlechterung der Prognose für die Patienten einher (Greiner et al., 2011a). Damit könnte Sec62 eine Rolle bei der Invasion bzw. Metastasierung spielen.

Des Weiteren wurde Sec62 in der pfam („protein families database of alignments“)-Proteindatenbank (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF03839>) sowie in einem Übersichtsartikel von Saier et al. (2000) als putativer nicht selektiver Kationenkanal charakterisiert (Saier, 2000), der durch das marine Toxin Maitotoxin induziert werden

kann (Estacion et al., 1996). Somit könnte Sec62 unter normalen physiologischen Bedingungen als Ionenkanal in der Prostata fungieren. Kommt es jedoch zur Hochregulierung des Sec62-Proteingehaltes, könnte dies zu einer Zunahme der Ionenkanalaktivität führen, was sich in einem Proliferationsvorteil für die Karzinomzelle äußert. Es hat sich gezeigt, dass Ionenkanalproteine in der Pathophysiologie der Krebsentstehung eine Rolle spielen und regulierenden Einfluss auf Mechanismen der Tumordinvasion (Lastraioli et al., 2004) und Apoptose (Wang et al., 2002) nehmen.

1.3.3 ER-Stress

Durch physiologische und biochemische Veränderungen im ER wie z.B. veränderte Proteinglykosylierung, Hypoxie, Verschiebung des Redox-Gleichgewichts oder Störung der Kalzium-Homöostase, kommt es im ER zur Akkumulation ungefalteter Proteine, was zu ER-Stress führt. Die Zelle aktiviert als Antwort auf diesen Stress einen Signaltransduktionsweg, der als „unfolded protein response“ (UPR) bezeichnet wird (siehe Abbildung 3).

Durch Inhibierung der Translation und Förderung der Proteinfaltung, -sekretion und -degradierung kommt es zu einer Reduktion der ungefalteten Proteine. Induziert wird die UPR über drei transmembrane Rezeptoren, die Proteinkinase PERK („pancreatic ER-kinase-like ER-kinase“), IRE1 („inositol-requiring enzyme 1“) und dem Transkriptionsfaktor ATF6 („activating transcription factor 6“). Unter normalen physiologischen Bedingungen sind PERK, IRE1 und ATF6 über ihren N-Terminus im ER-Lumen an das ER-Chaperon BiP/GRP78 gebunden und dadurch inaktiv. Bei Akkumulation ungefalteter oder fehlgefalteter Proteine im Lumen des ER, dissoziiert BiP/GRP78 von den Rezeptoren und bindet an die fehlgefalteten Proteine, wodurch die UPR aktiviert wird.

Aufgrund dessen dimerisiert PERK, wodurch deren aktivierende Autophosphorylierung (Bertolotti et al., 2000) induziert wird. Die aktivierte Kinase phosphoryliert die α -Untereinheit des eIF2 („eukaryotic initiation factor 2“) im Zytoplasma, was zur Inhibition der „Cap-abhängigen“ Translation führt, und somit die weitere Akkumulation fehlerhafter Proteine hemmt. Manche mRNA's enthalten interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES), wodurch sie diesen translationalen Stopp umgehen können. Dazu zählt ATF4 („activating transcription factor 4“), ein Transkriptionsfaktor, der dafür zuständig ist den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten und die Zelle vor weiterem oxidativem Stress schützt (Harding et al., 2003). ATF4 reguliert die Expression von Genen, die für die Aufrechterhaltung der ER-Homöostase benötigt werden. Bei länger anhaltendem ER-Stress induziert ATF4 die

Expression des proapoptotischen Faktors CHOP (CCAAT/“enhancer-binding protein homologous protein“), wodurch Apoptose ausgelöst wird (Yoshida, 2007).

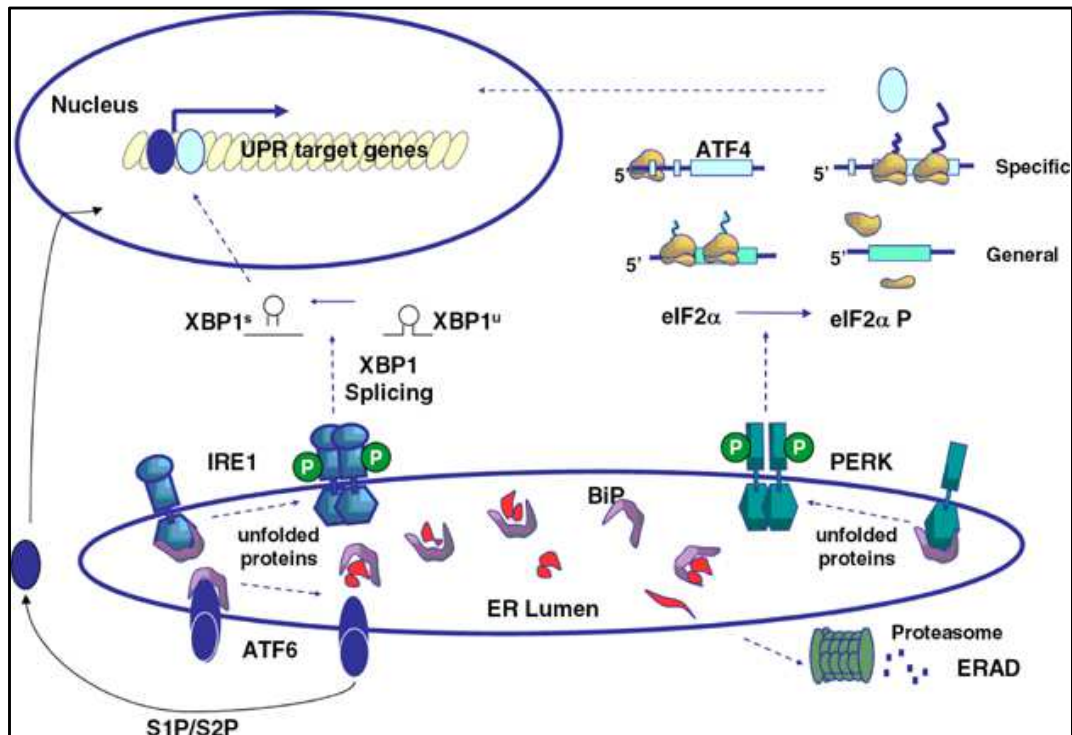


Abb. 3: Signalwege der „unfolded protein response“ (UPR) (Wu und Kaufman, 2006)

Der ER-Transmembranrezeptor ATF6 wird, in gleicher Weise wie PERK, durch die Dissoziation von BiP/GRP78 aktiviert. Daraufhin transloziert ATF6 zum Golgi-Apparat, wo er durch Spaltung der Proteasen S1 und S2 aktiviert wird. ATF6 wird in dieser Form in den Nucleus transportiert, initiiert dort durch Bindung an ERSE („ER-stress response elements“) die Transkription von CHOP, XBP1 und Chaperonen wie BiP/GRP78, und wirkt somit in den IRE1-Signalweg (Haze et al., 1999; Shen und Prywes, 2004).

Der dritte ER-Transmembranrezeptor IRE1 wird ebenfalls durch Dissoziation von BiP/GRP78 aktiviert. Dadurch kommt es zur Oligomerisierung, Transphosphorylierung und Aktivierung von IRE1 (Bertolotti et al., 2000). Aktiviertes IRE1 besitzt eine Endoribonukleasefunktion, womit IRE1 ein 26-Nukleotid Intron aus der mRNA von XBP („x-box binding protein“) spaltet und somit posttranskriptionell modifiziert. Die Spleißvariante XBP1 ist ein aktiver Transkriptionsfaktor (Calfon et al., 2002), der in den Kern transloziert, wo er an UPRE („unfolded protein response elements“) bindet und die Transkription unterschiedlicher Zielgene induziert, darunter ER-Chaperone und den Transkriptionsfaktor CHOP.

Damit funktionsunfähige Proteine nicht den sekretorischen Weg erreichen, werden diese im ER erkannt und der „ER associated degradation“ (ERAD) zugeführt (Brodsky und McCracken, 1997). Der Abbau erfolgt nach retrograder Translokation aus dem ER durch das zytoplasmatische 26S-Proteasom. Dieses setzt sich aus einem proteolytischen 20S-Kernpartikel und einem regulatorischen 19S-Komplex zusammen (Voges et al., 1999). Der regulatorische Komplex ist für die Erkennung, Bindung und Entfaltung der ubiquitinierten Proteine zuständig. Dabei stellt die Ubiquitinierung das Signal für den Abbau des Proteins durch das Proteasom dar (Pickart, 2000). Die Übertragung auf das Zielprotein erfolgt durch eine Enzymkaskade im Zytosol. Dazu muss jedoch das Zielprotein aus dem ER in das Zytosol transportiert werden. Dieser retrograde Transport erfolgt über das oben beschriebene ER-Translokon (Sec61-Komplex mit seinen Komponenten). Kann der andauernde ER-Stress nicht kompensiert werden, so führt eine dauerhaft aktivierte UPR zur Induktion von Apoptose, die durch die Signaltransduktionswege, welche durch PERK, ATF6 und IRE1 aktiviert werden, vermittelt wird (Szegezdi et al., 2006). Dabei übernimmt CHOP die Rolle des Vermittlers.

ER-Stress kann aber auch durch verschiedene Substanzen initiiert werden wie z.B. Tunicamycin, DTT oder Thapsigargin. Tunicamycin ist ein Antibiotikum, das die N-Glycosylierung von Proteinen im ER inhibiert. Dagegen verhindert DTT die Ausbildung von Disulfid-Brücken bei der Proteinfaltung. Thapsigargin, ein Sesquiterpen-Lakton aus der Pflanze *Thapsia garganica*, hemmt spezifisch die Ca^{2+} -ATPase des ER (Thastrup et al., 1990) und bewirkt in hohen Konzentrationen eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den Mitochondrien (Vercesi et al., 1993). Als Folge der Hemmung der Ca^{2+} -ATPase nimmt die Konzentration der Ca^{2+} -Ionen im ER-Lumen ab, was dazu führt, dass die Ca^{2+} -abhängigen Enzyme des ER ihre Funktion nicht mehr korrekt ausüben können. Dabei induziert diese Substanz vorwiegend den PERK- und IRE1-Signalweg während der UPR (DuRose et al., 2006). Kann der Stress nicht kompensiert werden, wird als Konsequenz die Apoptose induziert (Denmeade et al., 2003). Dabei gewinnt eine zweite Funktion des ER, als Ca^{2+} -Speicher, an Bedeutung. Das antiapoptotische Protein Bcl2 sowie die proapoptotischen Proteine BAX und BAC regulieren die Ca^{2+} -Homöostase im ER und induzieren Apoptose (Pinton et al., 2000; Scorrano et al., 2003). Apoptose wird meistens durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER induziert, was durch IRE1 α veranlasst wird (Klee et al., 2009). Thapsigargin und seine Derivate werden in der Literatur als potentielles Therapeutikum für das Prostatakarzinom diskutiert, da eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol zu einer

Degradation des AR führt und die Zellen infolge dessen nicht mehr hormonstimuliert wachsen (Christensen et al., 2009; Denmeade und Isaacs, 2005; Denmeade et al., 2003; Isaacs, 2005; Vander Griend et al., 2009).

1.3.4 Pathophysiologische Funktion von ER-Proteinen bei humanen Erkrankungen

Da der Transport in das ER den wichtigsten Schritt in der Biosynthese der meisten sekretorischen Proteine und vieler Membranproteine (Palade, 1975) darstellt, führen Mutationen bzw. Dysregulationen der Komponenten der Translokationsmaschinerie zu schwerwiegenden Krankheiten wie z.B. Krebs. Bis heute sind einige Erkrankungen bekannt, die auf Pathologien im Proteintransport zurückzuführen sind.

Senderek et al. entdeckte 2005 Mutationen im *SIL1*-Gen als Ursache für das Marinesco-Sjögren-Syndrom (MSS) (Senderek et al., 2005). MSS ist eine sehr seltene autosomal rezessive Erkrankung, deren Hauptsymptome bilaterale Katarakte, Myopathie, psychomotorische Retardierung und zerebelläre Ataxie darstellen. Der Nukleotid austauschfaktor Sil1 reguliert die Aktivität des Chaperons BiP/GRP78 im ER. BiP/GRP78 wiederum ist als Chaperon an der Proteinfaltung im ER und an der cotranslationalen Translokation von Proteinen in das ER beteiligt. Im Weiteren wirkt dieses Protein an der retrograden Translokation von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER mit. Kommt es durch die Mutation von *SIL1* zum Ausfall dieses Proteins, welches die Funktion von BiP/GRP78 reguliert, führt dies vermutlich zu einer verminderten Synthese von Proteinen, die für die Entwicklung und Funktion der betroffenen Organe verantwortlich sind. Somit kann BiP/GRP78 seine eigentliche Funktion nicht mehr ausüben, wodurch:

1. Vorläuferproteine nicht mehr ins ER transportiert werden können;
2. Proteine nicht mehr korrekt gefaltet werden und es zur Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen kommt und
3. sekretorische und Membranproteine nicht mehr zu ihrem Funktionsort gelangen (Anttonen et al., 2005; Senderek et al., 2005; Zoghbi, 2005).

Mutationen im *SEC63*-Gen, ein am Import von Proteinen ins ER beteiligtes Chaperon, finden sich bei der autosomal dominant vererbten polyzystischen Lebererkrankung (ADPLD) (Davila et al., 2004; Drenth et al., 2005), allerdings nur in

einer Subgruppe. Die gefundenen Mutationen wie „nonsense“- und „frameshift“-Mutationen, führen zu einer vorzeitigen Termination, was zu einem Funktionsverlust von Sec63 führt. Das *SEC63*-Gen gehört des Weiteren zu den am häufigsten mutierten Genen in „hereditary non-polyposis colorectal cancer“ (HNPCC) assoziierten Dünndarmkrebs (Schulmann et al., 2005) und mikrosatelliteninstabilen Magentumoren und kolorektalen Tumoren (Mori et al., 2002). Beim Darmkrebs werden „frameshift“-Mutationen beobachtet, wohingegen die gastrointestinalen Tumore Veränderungen mit biallelischem Charakter zeigen, was in beiden Fällen zu einem Funktionsverlust von Sec63 führt.

Zielsetzung

Das Prostatakarzinom gehört weltweit zu den häufigsten Krebsentitäten und ist aufgrund der späten Diagnose mit einer schlechten Prognose assoziiert. Aus diesem Grund sind Biomarker erforderlich mit dem frühzeitig Patienten entdeckt werden, die im Laufe der Erkrankung kastrationsresistente Prostatakarzinome entwickeln, die nicht therapierbar sind. Bei dieser Form des Prostatakarzinoms steht die Identifizierung von Zielstrukturen für „targeted therapies“ im Vordergrund, die einen Einfluss haben auf die Metastasierungsfähigkeit des Tumors.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der pathophysiologischen Funktion von Sec62 bei der Entwicklung und Progression von Prostatakarzinomen, um ein besseres Verständnis der Funktionsweise zu erhalten und eventuell zukünftig die Entwicklung neuer therapeutischer Zielstrukturen zu ermöglichen. Ebenso im Fokus dieser Untersuchung stand die Charakterisierung von Sec62 als neuer diagnostischer oder prognostischer Marker. Die Ergebnisse, die aus dieser Untersuchung resultieren, sollten dann an anderen Tumorentitäten geprüft werden. Als Modellsysteme dienten in dieser Arbeit Tumorzelllinien.

Um die Bedeutung von Sec62 als diagnostischer und prognostischer Marker in Tumoren aufzuklären wurden folgende Fragestellungen untersucht: Ist die Amplifikation bzw. Überexpression von *SEC62* ein spezifisches Phänomen des Prostatakarzinoms oder kann sie auch in anderen Tumoren nachgewiesen werden? Hintergrund dieses Versuches waren Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, die *SEC62* als das Gen identifizierten, das beim Prostatakarzinom auf Chromosom 3q25-q26 die höchste Amplifikationsrate aufzeigte. Die Überexpression dieses Gens wurde auf mRNA- und Proteinebene bestätigt. Es sollten eine Reihe von Tumorentitäten anderer Organsysteme auf Amplifikation und Überexpression von *SEC62* überprüft werden, um mögliche Zusammenhänge zwischen erhöhter Kopienzahl und vermehrter Genexpression zu entdecken. In anderen Tumoren wie z.B. dem Mammakarzinom hat sich gezeigt, dass Amplifikationen eine prognostische und diagnostische Signifikanz aufweisen. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob sich Mutationen im *SEC62*-Gen in Prostatakarzinomzelllinien nachweisen lassen. Diese Fragestellung sollte anhand von Sequenzierungen verschiedener Prostatakarzinomzelllinien und gesunder Probanden untersucht werden, da Mutationen zum Funktionsverlust oder zur Funktionsänderung des Proteins führen können.

Ein weiteres sehr wichtiges Ziel dieser Arbeit war es zu analysieren, ob ein erhöhter Sec62-Proteingehalt auch bei anderen Tumorentitäten vorliegt und ob Sec62 das Potential zu einem klinischen Marker zur Differenzierung von Karzinom- und Normalgewebe in diesen Tumoren hat. Für diesen Versuchsansatz stand uns ein Multi-Tumor-Gewebearray zur Verfügung.

In funktionellen Studien sollte die putative Rolle von Sec62 bei der Tumorentstehung und -progression aufgeklärt werden. Da Sec62 vermehrt in organüberschreitenden Prostatakarzinomen nachgewiesen werden konnte, bestand die Möglichkeit das Sec62 an der Tumordinvasion in benachbartes Gewebe beteiligt ist. Somit sollte mithilfe eines standardisierten Invasionsystems die Auswirkungen eines *SEC62* „knock down“ in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 sowie anderen Tumoren auf das Invasionsverhalten untersucht werden, wobei auch die Auswirkungen auf das zellbiologische Verhalten analysiert werden sollten.

Um Aussagen darüber treffen zu können, ob ER-Stress der ausschlaggebende Faktor für die erhöhte Sec62-Synthese sein könnte, sollte mittels ER-Stressoren die UPR induziert und der Proteingehalt von Sec62 mittels Western Blot nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt sollte aufgeklärt werden, welche Auswirkungen eine erhöhte Sec62-Menge in Prostatakarzinomzellen auf eine mögliche Therapie mit Thapsigargin hat. Im Rahmen dessen sollte die Beeinflussung der Pathways mittels Proteomuntersuchung nach Inhibition von *SEC62* in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose	Biozym	Oldendorf
APS	Serva	Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Sigma	Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
BSA	Sigma	Taufkirchen
DAPI	Linares	Wertheim
DMF	Sigma	Taufkirchen
DMSO	Sigma	Taufkirchen
Ethanol absolut	VWR	Darmstadt
Ethanol vergällt	Zentrales Chemikalienlager	Saarbrücken
Ethidiumbromid	Merck	Darmstadt
Formamid	Sigma	Taufkirchen
Glycerin	Merck	Darmstadt
Glycin	Merck	Darmstadt
HCl	Merck	Darmstadt
KCl	Merck	Darmstadt
Magermilchpulver	Reformhaus	Saarbrücken
Methanol	Zentrales Chemikalienlager	Saarbrücken
Natriumacetat	Merck	Darmstadt
NaH_2PO_4	Merck	Darmstadt
Na_2HPO_4	Merck	Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren	Sigma	Taufkirchen
PBS	Sigma	Taufkirchen
PFA	Merck	Darmstadt
Phenol-Chloroform-Isoamyl	Roth	Karlsruhe
SDS	Serva	Heidelberg
SSC 20x	Sigma	Taufkirchen
TEMED	Serva	Heidelberg

Thapsigargin	Calbiochem	Darmstadt
Tris	Sigma	Taufkirchen
TritonX 100	Roche Diagnostics	Mannheim
Tunicamycin	Calbiochem	Darmstadt
Tween 20	Sigma	Taufkirchen

2.1.2 Verbrauchsmaterial

6 Well-Companionplate	Becton Dickinson	Heidelberg
6 Well-Matrigel™-Invasionskammern, 8 µm	Becton Dickinson	Heidelberg
24 Well-Companionplate	Becton Dickinson	Heidelberg
24 Well-Matrigel™-Invasionskammern, 8 µm mit FluoroBlok-Membran	Becton Dickinson	Heidelberg
96 Well-Mikrotiterplatte	Becton Dickinson	Heidelberg
Alexa Fluor 488-conjugated goat-anti-rabbit IgG	Invitrogen	Eggenstein
AllStars Neg. Control siRNA	Qiagen	Hilden
Anti-Digoxigenin-Cy3	Dianova	Hamburg
Bio-Anti-StreptavidinVector	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Chromosome 3 Satellite Probe red D3Z1	Qbiogene	Heidelberg
Cot-DNA	Invitrogen	Eggenstein
CyDye DIGE Fluor Cy2, Cy3, Cy5	Amersham	Freiburg
CyDye Post Labelling Reactive Dye Pack	Amersham	Freiburg
DeStreak Rehydration Lösung	GE-Healthcare	München
DMEM	Sigma	Taufkirchen
DNA-Molekulargewichtsmarker (100 bp)	Roche	Mannheim
dNTP's	Invitrogen	Eggenstein
ECL™Plex goat-anti-rabbit Cy5	GE-Healthcare	München
FKS	Sigma	Taufkirchen
GAPDH	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
Goat-anti-mouse Cy3	Dianova	Hamburg
GRP78	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
HiPerfect	Qiagen	Hilden

H ₂ O _{dd}	Delta Select	Pfullingen
IEF-Streifen pH 3-11	GE-Healthcare	München
Immobilon-P	Millipore	Schwalbach
Kryoröhrchen	Greiner Labortechnik	Frickenhausen
Loading Dye Buffer 6x	Fermentas	St. Leon-Rot
Oligo(dT) ₁₈ -Primer	Operon	Ebersberg
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot
Pharmalyte 3-10 für IEF	GE-Healthcare	München
Pipetten (1/2/5/10/25 ml) Falcon	Becton Dickinson	Heidelberg
Pipettenspitzen	Greiner Labortechnik	Frickenhausen
Propidiumjodid	Sigma	Taufkirchen
RPMI	Sigma	Taufkirchen
RPMI ohne Phenolrot	Sigma	Taufkirchen
SEC62 UTR siRNA	Ambion	Foster City, USA
SEC62 #1 siRNA	Ambion	Foster City, USA
Streptavidin-FITC	Vector Laboratories	Burlingame, USA
SuperFrost Ultra Plus Objektträger	Thermo Scientific	Braunschweig
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	Foster City, USA
Trypsin EDTA-Lösung 1x	Sigma	Taufkirchen
Vector Vectashield Mounting Medium für Fluoreszenz	Linaris	Wertheim
Vector Vectashield Mounting Medium für Fluoreszenz mit Dapi	Linaris	Wertheim
Zellkulturflaschen 75 cm ² , 25 cm ²	Becton Dickinson	Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, konisch (15/50 ml)	Becton Dickinson	Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, rundboden (14 ml)	Becton Dickinson	Heidelberg

2.1.3 Geräte

Blotting-Kammer	Biochemie	München
Brutschrank HeraCell	Heraeus Instruments	Hanau
Camera Control Unit	Nikon	Düsseldorf
ELISA Reader Lambda E	Operon	Ebersberg

Ettan DALTwelve Elektrophorese-Einheit	Amersham	Freiburg
Ettan IPGphor II (IEF)	Amersham	Freiburg
Ettan Spot Picker	Amersham	Freiburg
Feinwaage	Kern	Balingen
Fluoreszenzmikroskop Eclipse E600	Nikon	Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX61	Olympus	Hamburg
Gelkammern für Agarosegele	Owl Scientific	Rochester, USA
Gelkammern für SDS-Gele	Biochemie	Homburg
Heizplatte	Medax Nagel	Kiel
Imago Compact Imaging System	B&L Systems	Maarsen, NL
Kamera DM100 Digital Net Camera	Nikon	Düsseldorf
Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg
pH-Meter inoLab	WTW	Weilheim
Real time Thermocycler HT 7900	Applied Biosystems	Foster City, USA
Schüttler Vortex Genie2	Scientific Industries	Bohemia, USA
Spannungsgerät für Agarose-Gelelektrophorese	Pharma Biotech	Freiburg
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	peqLab	Erlangen
Sterilbank HERASafe	Heraeus	Hanau
Thermomixer	Eppendorf	Hamburg
Tischzentrifuge Hyspin 16K	Anachem	Bedfortshire, UK
Typhoon Trio image reader	Amersham	Freiburg
Umkehrmikroskop Axiovert S100	Zeiss	Oberkochen
Wasserbad	Julabo	Seelbach
Zentrifuge 5415C	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge 5804	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge B4i	Jouan	Frankreich

2.1.4 Enzyme und Kits

Enzyme:

Expand Long Template PCR-System	Roche	Mannheim
Hot Start Taq	Qiagen	Hilden
Pepsin	Sigma	Taufkirchen
Proof Start DNA Polymerase	Qiagen	Hilden

Proteinase K	Merck	Darmstadt
Reverse Transkriptase (SuperSript® II RT)	Invitrogen	Karlsruhe
RNaseA	Roche	Mannheim
RNaseH	Stratagene	Heidelberg
RNaseOut	Invitrogen	Karlsruhe

Kits:

2D Clean Up Kit	Amersham	Freiburg
2D Quant Kit	Amersham	Freiburg
Bio Prime Kit	Invitrogen	Karlsruhe
Cell Death Detection ELISA ^{Plus} , CDD ⁺	Roche	Mannheim
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche	Mannheim
Cytotoxicity Detection Kit ^{Plus} , LDH ⁺	Roche	Mannheim
Nucleo Spin RNA II	Machery Nagel	Düren
PCR Purifikation Kit	Qiagen	Hilden
WST-1	Roche	Mannheim

2.1.5 Primer für Sequenzierung

Die für die Sequenzierung der *SEC62*-Exons (GeneID 7095) verwendeten Oligonukleotide wurden bei Operon (Ebersberg) synthetisiert. Alle Sequenzen sind in 5'- 3' Orientierung angegeben. Die Auswahl der Primerpaare für die PCR-Amplifikation und die Sequenzierung erfolgte mit dem Programm Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).

Tab. 1: Verwendete Oligonukleotide

Primer für die Sequenzierung von <i>SEC62</i>	Sequenz
Exon 1 Forward	5`GAGAAGGCACCGCTAAGGAC
Exon 1 Reverse	5`CACCTCGCCCTTGCTTTC
Exon 2 Forward	5`GGCCTGTACTCCACTTGAAAA
Exon 2 Reverse	5`TTTTAAACTTCTACATATCCCAAATG
Exon 3 Forward	5`TTTTTGTTGCCAGAGTGTTGA
Exon 3 Reverse	5`CACTACATTTAATGATGTAAGGAGCTT
Exon 4 Forward	5`TCAGGTCTTGATATTTTTGCTTTTC
Exon 4 Reverse	5`GGCCAGTAGTGTTTCATGTGC
Exon 5 Forward	5`GACTGTATGAACATCATATTTCTTGCT
Exon 5 Reverse	5`TGAAGGCATCAAACATCTTTCT
Exon 6 Forward	5`GAAGAACCACTACTACTGAAGGAAAGA
Exon 6 Reverse	5`TCTGTAACTACCTTGACCATTTTTCT
Exon 7 Forward	5`TTTTTCCCCCAGGGATATGT
Exon 7 Reverse	5`CCTGAGTTTTGAGATTTGACTCAG
Exon 8 Forward	5`ACCACGCCCAGCACTAATC
Exon 8 Reverse	5`GGACCGAATATAACTGCTTGAA

2.1.6 Primer für “real time”-PCR

Die TaqMan® Gene Expression Assays wurden von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.

Tab. 2: Verwendete TaqMan® Gene Expression Assays

Assay ID	Gen Symbol	Gen Name
Hs00541815_m1	<i>SEC62</i>	<i>SEC62</i> homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
Hs00427620_m1	<i>TBP</i>	TATA box binding protein

2.1.7 Zelllinien

Tab. 3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	DSMZ oder ATCC Nr.	Herkunft	Kultur- medium
A549	ACC 107	Humane nichtkleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie, Adenokarzinom	DMEM
COLO320	ACC 144	Humane kolorektale Karzinomzelllinie	RPMI 1640
DU145	ACC 261	Humane Prostatakarzinomzelllinie, isoliert aus einer Hirnmetastase, androgeninsensitiv	RPMI 1640
H1299	CRL-5803	Humane nichtkleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie, isoliert aus einer Lymphknotenmetastase	RPMI 1640
HDF		Humane dermale Fibroblastenzelllinie, etabliert am Institut für Molekularbiologie „in vitro“	DMEM
HT29	ACC 299	Humane Kolonkarzinomzelllinie, aus einem gut differenzierten Adenokarzinom des Kolons etabliert	DMEM
HT1080	ACC 315	Humane Fibrosarkomzelllinie	DMEM
LNCaP	ACC 256	Humane Prostatakarzinomzelllinie, isoliert aus einer Lymphknotenmetastase, hormonsensitiv	RPMI 1640 phenolrotfrei
MCF7	ACC 115	Humane epitheliale Mammakarzinomzelllinie, Adenokarzinom, isoliert aus Pleuraerguss	DMEM
PC3	ACC 465	Humane Prostatakarzinomzelllinie, isoliert aus einer Knochenmetastase, androgeninsensitiv	DMEM
RT4	ACC 412	Humane gut differenzierte papilläre Urothelkarzinomzelllinie	RPMI 1640
T24	ACC 376	Humane Harnblasenkarzinomzelllinie, isoliert aus einem Primärtumor	DMEM
TX3868		aus dem Xenograft der primären humanen Glioblastomzelllinie T3868 isolierte Zelllinie, etabliert am Institut für Humangenetik, UdS	DMEM

2.1.8 Zellkulturmedien

Tab. 4: Verwendete Zellkulturmedien mit Zusätzen

Medium (+ Bestellnummer)	Zusätze
DMEM (D5796)	10% FKS
	1% Penicillin/ Streptomycin
	1% nicht essentielle Aminosäuren
Kryomedium: DMEM (D5796)	10% FKS
	1% nicht essentielle Aminosäuren
	10% DMSO
RPMI 1640 (R8758)	10% FKS
	1% Penicillin/ Streptomycin
RPMI 1640 phenolrotfrei (R7509)	10% FKS
	1% Penicillin/ Streptomycin
	2 mM Glutamin

2.1.9 Software

Chromas lite 2.0

DeCyder™ image analyse Software 6.5

EclipseNet

ImageQuant 5.1

SDS 2.1.1

Software ISIS 2.5

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung von Zellen

Die aufgeführten Zelllinien (siehe 2.1.7) wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90% im Verhältnis 1:5 im entsprechenden Medium (siehe 2.1.8) subkultiviert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche abzulösen, wurden 5 ml 1x Trypsin EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und Trypsin durch Zugabe von 5 ml frischem Medium inaktiviert. Nach 3 minütigem zentrifugieren bei 210xg, wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. In die Zellkulturflasche wurden 12 ml Medium vorgelegt und die entsprechende Menge an Zellsuspension hinzugefügt.

2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen (2 ml Kryomedium) wurden in 8 ml Medium aufgenommen und 3 min bei 210xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 12 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden beim Erreichen einer Konfluenz von 80% mithilfe von Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 2 ml Kryomedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Um ein langsames Absinken der Temperatur zu gewährleisten wurden die Röhrchen in einen Styroporbehälter verpackt, 24 h bei -80°C gelagert und anschließend in der Gasphase flüssigen Stickstoffs langfristig gelagert.

2.2.1.4 Zellzählung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche abzulösen, wurden 5 ml Trypsin EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und für 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zugabe von 5 ml frischem Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 210xg, wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 4 ml frischem Medium resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension wurden unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen in 4 großen Quadraten gezählt. Die Zellzahl wurde mit der unten angegebenen Formel berechnet.

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Gesamte Zellzahl}}{4 \text{ Quadrate}} \times 10^4$$

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellviabilitybestimmungen mittels WST-1 Test

Bei dem WST-1 Test handelt es sich um einen kolorimetrischen Viabilitytest. Succinatdehydrogenasen vitaler Zellen spalten das Tetrazoliumsalz zum rötlichen Formazansalz. Die Farbintensität korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen und kann im ELISA Reader Lambda E kolorimetrisch bestimmt werden.

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 1×10^4 in 200 µl Medium pro Well in eine 96 Well-Mikrotiterplatte ausgesät und unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach Durchführung des unter Punkt 2.2.2.5 beschriebenen Versuchsprotokolls erfolgte die Zugabe von 20 µl WST-1 Reagenz pro Well. Nach jeweils 30, 60 und 90 minütiger Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde das farbige Reaktionsprodukt durch Absorptionsmessung bei 450 nm und der Referenzwellenlänge von 690 nm im ELISA Reader Lambda E quantifiziert. Wenn nicht beim jeweiligen Experiment anders angegeben, wurden pro Ansatz Triplikate durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.2.2 Apoptose-Nachweis

Mithilfe des Cell Death Detection^{Plus} ELISA (Roche) lässt sich DNA-Fragmentierung in Zelllysaten feststellen und somit Apoptose messen. Die Apoptose ist charakterisiert durch bläschenförmige Ausstülpungen der Plasmamembran, Kondensation des Zytoplasmas und Aktivierung einer endogenen Endonuklease, wodurch es zur Anreicherung der Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma der sterbenden Zelle kommt. Der Test basiert auf dem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip unter Verwendung zweier Antikörper gegen DNA und Histon-Proteine. Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten. Im ersten Inkubationsschritt wird ein biotinylierter Anti-Histon-Antikörper adsorptiv am Boden einer mit Steptavidin beschichteten Mikrotiterplatte gebunden. Die in der Probe enthaltenen Nukleosomen binden über ihren Histon-Anteil an den biotinylierten Histon-Antikörper. Der zweite Peroxidase-konjugierte Antikörper bindet den DNA-Anteil der Nukleosomen. Nach Auswaschen des ungebundenen Peroxidase-Konjugates wird dem Testansatz im Überschuss ABTS als Substrat zugefügt. Das Substrat wird durch den Peroxidase-konjugierten DNA-Antikörper umgesetzt und es kommt zu einem Farbumschlag.

Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. In 96 Well-Mikrotiterplatten wurden jeweils 1×10^4 Zellen in 200 μ l des entsprechenden Mediums ausgesät und unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Weitere Kontrollen wie Positiv- und Negativkontrolle (Inkubationspuffer) waren gebrauchsfertig im CDD⁺ Kit enthalten. Gemessen wurde die Absorption bei 405 nm und der Referenzwellenlänge von 490 nm mit dem ELISA Reader Lambda E. Wenn nicht beim jeweiligen Experiment anders angegeben, wurden pro Ansatz Triplikate durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Zur Auswertung des Apoptoseassays wurde ein so genannter „enrichment factor“ (EN) nach unten stehender Formel berechnet.

$$EN = \frac{\text{mittlere Absorption der behandelte n Zellen}}{\text{mittlere Absorption der unbehandelten Zellen}}$$

Er gibt die spezifische Anreicherung von Mono- und Oligonukleosomen an, die ins Zytoplasma apoptotischer Zellen freigesetzt wurden. Bei einem EN von 1 ist der Anteil apoptotischer Zellen in Probe und Kontrolle gleich. Bei einem Wert größer 1 ist der Anteil apoptotischer Zellen in der Probe im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

2.2.2.3 Nekrose-Nachweis

Die Nekrose ist charakterisiert durch Kondensation der Kernsubstanz und durch Anschwellen der Zellorganellen. Die Folge ist das Platzen der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran. Dadurch werden Stoffe aus dem Zytoplasma freigesetzt. Eine schnelle Methode zum Nachweis von Nekrose ist die Bestimmung der Aktivität des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand von Zellen mithilfe des Cytotoxicity Detection Kit^{Plus} (Roche). Die Aktivität dieses Enzyms wird nach zwei enzymatischen Schritten gemessen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, während NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert Diaphorase H/H^+ auf das Tetrazoliumsalz, das dadurch zu Formazansalz reduziert wird.

In 96 Well-Mikrotiterplatten wurden jeweils 1×10^4 Zellen in 200 μl des entsprechenden Mediums ausgesät und unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle dienten lysierte Zellen. Für den LDH-Test wurden 100 μl des zellfreien Überstandes aus der Mikrotiterplatte abgenommen und in eine neue 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde ein Reaktions-Mix frisch angesetzt, indem man 2,5 μl Catalyst mit 112,5 μl Dye-Lösung mischt. Der zellfreie Überstand wurde mit 100 μl Reaktions-Mix versetzt und zur enzymatischen Farbreaktion 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurden 50 μl Stopp-Lösung in die Wells pipettiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm mit dem ELISA Reader Lambda E. Wenn nicht beim jeweiligen Experiment anders angegeben, wurden pro Ansatz Triplikate durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.2.4 Proliferations-Nachweis

Mithilfe des Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (Roche) wurde die Bestimmung der Zellproliferation durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Markierung neu synthetisierter DNA durch den Einbau des Thymidinanalogons 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen. Die Inkubation der Zellen mit BrdU erfolgte in diesem Versuch für 6 Stunden. BrdU wurde anschließend durch spezifische BrdU-Antikörper mit konjugierter Meerrettichperoxidase (POD) detektiert, welche das zugegebene Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff umsetzt.

Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. In 96 Well-Mikrotiterplatten wurden jeweils 1×10^4 Zellen in 200 μ l des entsprechenden Mediums ausgesät und unter Standardbedingungen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Gemessen wurde die Absorption bei 450 nm und der Referenzwellenlänge von 660 nm mit dem ELISA Reader Lambda E. Wenn nicht beim jeweiligen Experiment anders angegeben, wurden pro Ansatz Triplikate durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.2.5 Transfektion der Zelllinien mit siRNA

RNA-Interferenz (RNAi) ist eine Methode zur posttranskriptionalen Genunterdrückung mithilfe von kleinen (21 - 28 Nukleotide) Doppelstrang-RNAs, den sogenannten „small interfering RNAs“ (siRNA). Die kleinen doppelsträngigen RNA-Moleküle, deren Sequenz komplementär zu der Sequenz der mRNA des stillzulegenden Gens ist, werden in einen Riboprotein-Komplex, den sogenannten „RNA induced silencing complex“ (RISC), integriert und spezifisch einer der beiden RNA-Stränge entfernt. Der RISC kann nun an die komplementäre Ziel-mRNA binden und diese spalten. Intrazelluläre Exonukleasen bauen schnell die entstandenen RNA-Fragmente ab. Durch die RNA-Interferenz wird die mRNA des Zielgens herunterreguliert und infolgedessen posttranskriptionell die Genexpression spezifisch reprimiert.

Transiente Transfektion von Tumorzelllinien mit siRNA:

Die Transfektionen sowie deren Kontrolle mittels Western Blot wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Markus Greiner am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg durchgeführt. Für die Transfektion von siRNA Oligonukleotiden wurde das Transfektionsreagenz HiPerFect von Qiagen verwendet. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion 1:2 subkultiviert. Vor der Transfektion wurden jeweils $2,4 \times 10^5$ Zellen in eine 6 Well-Companionplate ausgesät. Für jeden Ansatz wurden 1,2 μl der siRNA mit 99 μl OptiMEM ohne Zusätze verdünnt, anschließend 12 μl HiPerFect zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Hinterher wurde der Ansatz auf die unmittelbar zuvor ausgesäten Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgte die Nachtransfektion der Zellen mit siRNA in gleicher Weise. Die Zellernte für die Invasionsassays wurde nach weiteren 24 h durchgeführt. Die Effizienz der Depletion wurde mittels Western Blot überprüft.

Tab. 5: Verwendete siRNA's

Bezeichnung der verwendeten siRNA's	Sequenz der siRNA's
SEC62 UTR siRNA	CGUAAAGUGUAUUCUGUACtt
SEC62 #1 siRNA	GGCUGUGGCCAAGUAUCUUtt
Kontroll siRNA	AllStars Neg. Control siRNA

2.2.2.6 Invasionsassay

Die Fähigkeit von Tumorzellen durch eine mit MatrigelTM beschichtete PET-Membran zu wachsen, kann für eine Aussage über das invasive Potential der Zellen verwendet werden. Dabei simuliert die Matrigelschicht die Basallamina *in vitro*. Als „Lockmittel“ zum Durchwachsen der MatrigelTM-beschichteten Membran dient ein Serum-Konzentrationsgradient. MatrigelTM ist eine rekonstruierte Basalmembran, die aus einem Engelberth-Holm-Swarm-Sarkom der Maus, einem Tumor, der reich ist an Proteinen der extrazellulären Matrix, isoliert wurde. Es besteht aus Laminin, Kollagen Typ IV, Heparan-Sulfat, Proteoglykanen und Entactin. Zudem sind Wachstumsfaktoren, einschließlich FGF und TGF- β enthalten.

Zur Durchführung des Invasionsassays wurden BioCoatTM-MatrigelTM Invasionkammern verwendet. Die Invasionskammer besteht aus einer PET-Membran mit einer Porengröße

von 8 μm und ist mit einer gleichmäßigen Matrigelschicht überzogen. Zur Vorbereitung des Versuches wurden die bei -20°C gelagerten 6 Well-Matrigel™ Invasionskammern mit 2 ml 37°C warmem, sterilem 1x PBS überschichtet und 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Während dessen wurden sowohl die siRNA (*SEC62* UTR siRNA, *SEC62* #1 siRNA und Kontroll siRNA (AllStars Neg. Control siRNA)) transfizierten als auch die unbehandelten Zellen trypsiniert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und das Trypsin-EDTA durch Zugabe von frischem Medium inaktiviert. Die Lösung wurde 3 min bei $210\times g$ zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem 0,5% FKS-haltigen Medium resuspendiert. Nach Zellzählung (siehe 2.2.1.4) wurde eine Zellsuspension von $2,3\times 10^5$ Zellen/ml des entsprechenden 0,5% FKS-haltigen Kulturmediums hergestellt. 1,5 ml dieser Suspension wurden in die bereits rehydrierten 6 Well-Matrigel™ Invasionskammern ausgesät, wobei jeweils Triplikate der verschiedenen Ansätze eingesetzt wurden. Die Invasionskammern wurden in die 6 Well-Companionplate, die 3 ml Medium mit 10% FKS enthielten, gesetzt. Anschließend wurden die Kammern für 48 h bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Die Untersuchung wurde an folgenden Tumorzelllinien durchgeführt: PC3 (androgenabhängige Prostatakarzinomzelllinie, HT1080 (Fibrosarkomzelllinie), A549 (nichtkleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie), H1299 (nichtkleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie), T24 (Blasenkarzinomzelllinie), TX3868 (Glioblastomzelllinie).

Nach der Inkubationszeit folgte das Waschen der 9 Kammern in PBS. Die auf der Unterseite der mit Matrigel™ beschichteten PET-Membran befindlichen invasiv gewachsenen Zellen wurden durch 10 minütige Inkubation mit Trypsin-EDTA im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 abgelöst und für die quantitative Auswertung gezählt, ein Mittelwert der Triplikate gebildet und die Zellzahlen untereinander verglichen.

Zur Bestimmung der Vitalität (siehe 2.2.2.1), Zytotoxizität (siehe 2.2.2.3) und Proliferation (siehe 2.2.2.4) wurden 1×10^4 Zellen in einem parallelen Versuchsansatz in 200 μl Medium auf 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Nach 48 h erfolgte die Auswertung.

Zur Überprüfung des *SEC62*-„knock down“ wurden die Zellen zusätzlich im Western Blot analysiert.

Tab. 6: Für den Invasionsassay verwendete Lösungen

Blockierungslösung:	80 ml	0,1 M Tris/HCL
	3 g	BSA
	20 ml	FKS

Immunfluoreszenzfärbung von Sec62:

In 24 Well-Matrigel™ Invasionskammern mit FluoroBlok-Membran wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen (Becton Dickinson) ausgesät. Der Versuchsaufbau war analog zum 6 Wellsystem. Die Auswertung erfolgte jedoch nach Sec62-Immunfluoreszenzfärbung der invasiv gewachsenen Zellen und anschließender Dokumentation der Färbung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie. Dazu wurden zuvor die Zellen der unteren Seite der Membran mit PBS gewaschen, 10 min mit 100% igem, -20°C kaltem Methanol fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 10 min blockiert, die Inserts mit dem Sec62-Primärantikörper (1:100 mit PBS/ 0,1% BSA verdünnt) 60 min inkubiert, gewaschen und anschließend 30 min mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488-conjugated goat-anti-rabbit IgG (1:1000 mit PBS/ 0,1% BSA verdünnt) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS, erfolgte eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid (Konz. 2,5 mg/ml, 1:1000 PBS verdünnt) für 1 min. Schließlich wurde die Membran, nach dem letzten Waschschrift, mithilfe eines Skalpell aus geschnitten, die Seite mit den invasiv gewachsenen Zellen nach oben auf einen Objektträger gelegt und mit DAPI-Antifade eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mittels Nikon Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop. Zur Dokumentation wurde die Software EclipseNet verwendet.

2.2.2.7 Induktion von ER-Stress

Zur Induktion von ER-Stress wurden Prostatakarzinomzelllinien (DU145, LNCaP und PC3) und die Hautfibroblastenzelllinie (HDF) mit den ER-Stressinduktoren Thapsigargin und Tunicamycin in den angegebenen Endkonzentrationen inkubiert. Untersucht wurde der Einfluss von ER-Stress auf die Apoptoseinduktion und den Proteingehalt von Sec62 in den behandelten Zelllinien.

Tab. 7: Verwendete Stressoren und die entsprechenden Konzentrationen

Stressor	Konzentration
Tunicamycin	0,25 - 4 $\mu\text{g/ml}$ (Stammlsg. 2 mg/ml DMSO)
Thapsigargin	0,25 - 1 μM (Stammlsg. 1 mg/ml DMSO)

Die in 75 cm^2 Zellkulturflaschen kultivierten Zellen wurden zunächst wie in 2.2.1.1 beschrieben geerntet und mithilfe der Neubauer-Zählkammer (siehe 2.2.1.4) gezählt. Anschließend wurden in eine 6 Well-Companionplate $2,5 \times 10^5$ Zellen in 3 ml Medium ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. 24 h später wurden die ER-Stressinduktoren in den entsprechenden Konzentrationen hinzugefügt und für 48 h weiterkultiviert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot analysiert (siehe 2.2.4.1). Wenn nicht beim jeweiligen Experiment anders angegeben, wurden pro Ansatz Triplikate durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Zur Bestimmung der Apoptoseinduktion (siehe 2.2.2.2) wurden in einem parallelen Versuchsansatz 1×10^4 Zellen/200 μl Medium in 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h erfolgte die Zugabe der ER-Stressoren, weitere 48 h später wurden die Versuche ausgewertet. Da die ER-Stressoren in DMSO gelöst wurden, wurde eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt, um einen Effekt von DMSO auszuschließen. Als Positivkontrolle für die Apoptoseinduktion diente die im Kit enthaltene Kontrolle. Pro Ansatz wurden Triplikate durchgeführt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen

Die Isolierung der DNA erfolgte aus den Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC3. Die Zellkulturen (75 cm^2 Kulturflasche) wurden für die DNA-Isolierung trypsiniert, zentrifugiert (210xg) und das Pellet in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 4,5 ml SE-Puffer und 0,5 ml 10% iger SDS-Lösung resuspendiert, eine Spatelspitze Proteinase K hinzugegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung der DNA durch Zugabe von 2 ml gesättigter 6 M NaCl-Lösung. Nach Zugabe von 7 ml PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl) wurde der Ansatz auf einem Überkopfschüttler 1 h gemischt und danach 10 min bei 1000xg zentrifugiert. Die obere

wässrige Phase wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Zum Fällen der DNA wurde das gleiche Volumen -20°C kalten Isopropanols hinzugegeben. Nach leichtem Schütteln wurde die DNA für 30 min bei $1000\times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen, dem Pellet 70% iger Ethanol zugegeben und anschließend erneut 5 min bei $18000\times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in $100\ \mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDrop-Spektrophotometer (siehe 2.2.3.4).

Tab. 8: Für die DNA-Isolierung verwendete Puffer und Lösungen

SE-Puffer:	4,4 g	NaCl
	7,3 g	EDTA
	ad 1000 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

2.2.3.2 Isolierung genomischer DNA aus Blut

10 ml EDTA-Blut wurde in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 30 ml Erythrozyten-Lysepuffer, zwecks selektiver Hämolyse der Erythrozyten, durchmischt und 20 min auf Eis inkubiert. Das entstandene Lysat wurde 10 min bei $210\times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 4,5 ml SE-Puffer und 0,5 ml 10% iger SDS-Lösung resuspendiert, eine Spatelspitze Proteinase K hinzugegeben und über Nacht bei 55°C inkubiert. Die weitere DNA-Aufreinigung erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDrop-Spektrophotometer (siehe 2.2.3.4).

Tab. 9: Für die DNA-Isolierung verwendete Puffer und Lösungen

Lysepuffer: pH 7,4	8,3 g	NH_4Cl
	0,03 g	EDTA
	1 g	KHCO_3
	ad 1000 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
SE-Puffer:	4,4 g	NaCl
	7,3 g	EDTA
	ad 1000 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

2.2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde der Nucleospin RNA II Kit verwendet. Er basiert auf dem Prinzip einer Säulen-Affinitätschromatographie. Die Isolierung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDrop-Spektrophotometer (siehe 2.2.3.4). Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3.4 Quantifizierung und Reinheitskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmungen der isolierten RNA- und DNA-Proben erfolgten mit dem NanoDrop-Spektrophotometer. Die RNA- und DNA-Konzentration wurden durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} sollte für reine RNA etwa 1,9 - 2,1 und für DNA 1,8 - 1,9 betragen.

2.2.3.5 Reverse Transkription

Pro Reaktionsansatz wurde 5 μg Gesamt-RNA, die aus Zelllinien mit dem Nucleospin RNA II Kit extrahiert wurde (siehe 2.2.3.3), eingesetzt. Für die Umschreibung wurden Oligo(dT)₁₈-Primer eingesetzt. Diese binden an den Poly-A-Schwanz der mRNA und dienen als Start-Sequenzen für die Reverse Transkriptase, die den komplementären cDNA-Strang synthetisiert. Die Reverse Transkription wurde in einem 20 μl Ansatz durchgeführt. Zusammenpipettiert wurden 1 μl dNTPs (10 mM), 1 μl Oligo(dT)₁₈ Primer, 5 μg RNA und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ (ad 12 μl). Um die RNA zu denaturieren wurde der Ansatz 5 min bei 65°C inkubiert. Nach der Denaturierung wurden 4 μl First Strand Puffer, 2 μl DTT und 1 μl RNaseOUT zugegeben und für 2 min bei 42°C inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte mit der Superscript II (200 U) bei 42°C für 50 min. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C für 15 min inaktiviert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDrop-Spektrophotometer (siehe 2.2.3.4). Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3.6 Polymerase Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische DNA-Bereiche *in vitro* zu amplifizieren. Die Methode basiert auf einer zyklischen Abfolge von Denaturierung der Template-DNA, Anlagerung sequenzspezifischer Primer und Synthese einer komplementären DNA-Kopie durch eine DNA-Polymerase mit Proofreading-funktion. Durch die zyklischen Wiederholungen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz im Reaktionsansatz.

PCR für Sequenzierung:

Zur spezifischen Amplifikation der *SEC62*-Exons wurde die PCR verwendet. Das *SEC62*-Gen besteht aus 8 Exons. In Abbildung 4 sind die zytogenetische und die physikalische Position von *SEC62* auf Chromosom 3 dargestellt.

Eingesetzt wurden jeweils 50 ng der aus Zelllinien und Lymphozyten isolierten DNA. Für die problematischen PCR-Reaktionen der Primer 4, 5 und 8 wurde das Expand Long Template PCR-System eingesetzt. Die restlichen PCR-Reaktionen wurden mit der Proof Start DNA-Polymerase durchgeführt.

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde die amplifizierte DNA mithilfe des PCR-Purifikation-Kits unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen nach der Anleitung des Herstellers gereinigt. Die Qualität der amplifizierten PCR-Produkte wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (siehe 2.2.3.7). 200 ng der aufgereinigten PCR-Produkte mit den dazugehörigen Primern wurden der Firma GENterprise GmbH zur Sequenzierung überlassen (siehe 2.2.3.10).

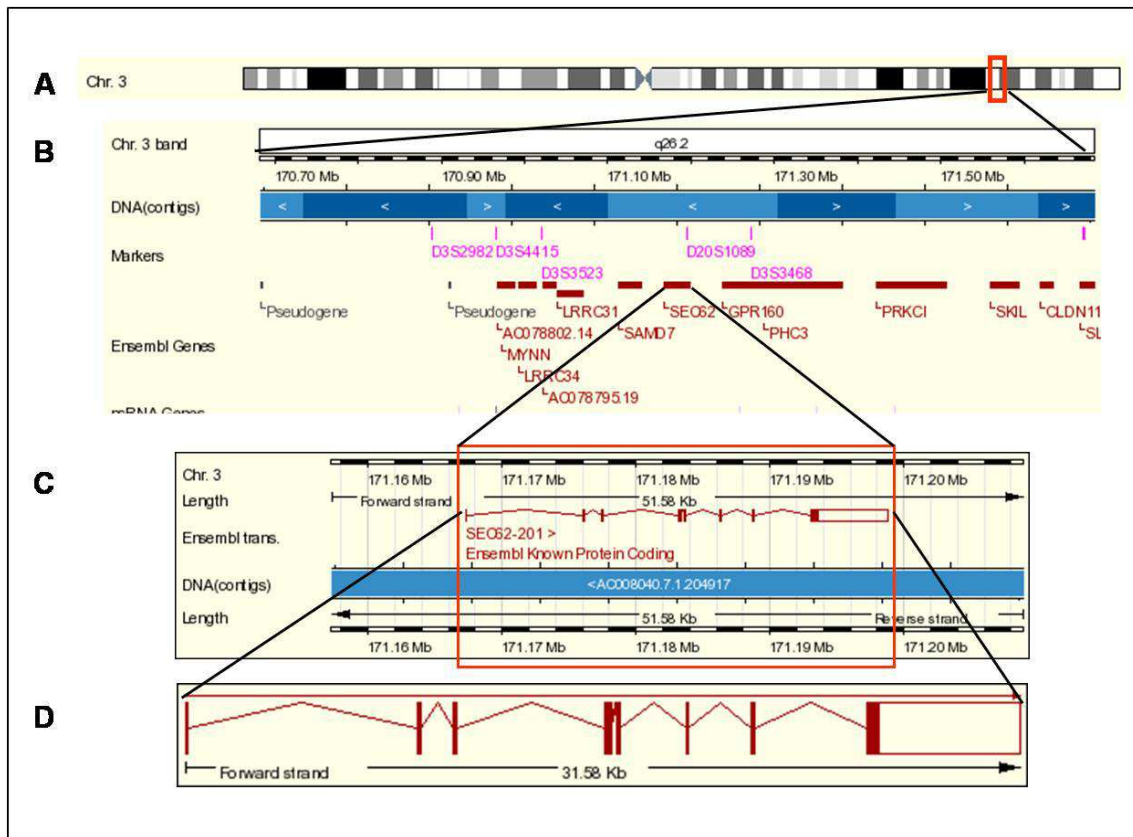


Abb. 4: Physikalische und zytogenetische Lokalisierung von *SEC62*. **A** Lokalisierung von *SEC62* auf Chromosom 3 (rot umrandet). **B** Region im Überblick mit genauer Lage des *SEC62* Gens und den benachbarten Genen. **C** und **D** Transkript von *SEC62* (Abbildung aus ENSEMBL)

Pipettierschema:

DNA (50 ng/μl)	1 μl
dNTP`s (10 mM)	1,5 μl
Puffer	5 μl
Primer forward	1 μl
Primer reverse	1 μl
Polymerase	1 μl
H ₂ O _{dd}	39,5 μl

PCR-Programm für Primer 1, 2, 3, 6 und 7:

1x	95°C	5 min
40x	94°C	1 min
	56°C	1 min
	72°C	2 min
1x	72 °C	10 min

PCR-Programm für Primer 4, 5 und 8:

1x	94°C	5 min
35x	94°C	1 min
	57°C	1 min
	68°C	2 min
1x	68°C	5 min

2.2.3.7 Agarosegelelektrophorese

Mithilfe der Gelelektrophorese können DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld voneinander getrennt werden. SeaKem® Le Agarose wurde mit einer Endkonzentration von 1% in TAE-Puffer aufgekocht und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Zur Bestimmung der Größe einzelner Nukleinsäurefragmente wurde 1 µl DNA-Molekulargewichtsmarker (100 bp Leiter) mit auf das Gel aufgetragen. Die Visualisierung der aufgetrennten Moleküle erfolgte durch den interkalierenden DNA-Farbstoff Ethidiumbromid, welcher den Gelen zugesetzt wurde (Endkonzentration: 0,1 µl/ml). Nach beendeter Elektrophorese wurden die DNA-Banden der Gele mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem IMAGO Compact Imaging System zur Dokumentation fotografiert.

Tab. 10: Für die Agarosegelelektrophorese verwendete Puffer

TAE-Laufpuffer: pH 8	7,2 g	Tris Acetat
	0,3 g	EDTA
	ad 1000 ml	H ₂ O _{dd}

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) dient dem Nachweis von strukturellen und numerischen Chromosomenabberationen. Das Prinzip der FISH beruht auf der spezifischen Bindung von markierten DNA-Einzelstrangfragmenten (Sonden) an die komplementäre DNA-Zielsequenz der zu untersuchenden Zelle. Die Sonde wird durch den Einbau modifizierter Nukleotide wie z.B. Biotin oder Digoxigenin, markiert. Diese modifizierten Nukleotide tragen ein kovalent gebundenes Reportermolekül, welches nach der Hybridisierungsreaktion durch den Einsatz spezifischer fluoreszenzgekoppelter Antikörpersysteme detektiert wird. Die verwendete Sonde wurde aus BAC's („bacterial artificial chromosomes“) generiert. Der BAC-Klon RP11-379 K17 enthält die Sequenz für das humane *SEC62*-Gen. Die zytogenetische Position des Klons liegt auf Chromosom 3q26.2 und die physikalische Position zwischen 169.618 Mb und 169.821 Mb (siehe Abbildung 5). Als Kontrolle diente die kommerziell erhältliche Digoxigenin-markierte Zentromersonde für das Chromosom 3 D3Z1. In allen Fällen wurde eine Doppelhybridisierung vorgenommen.

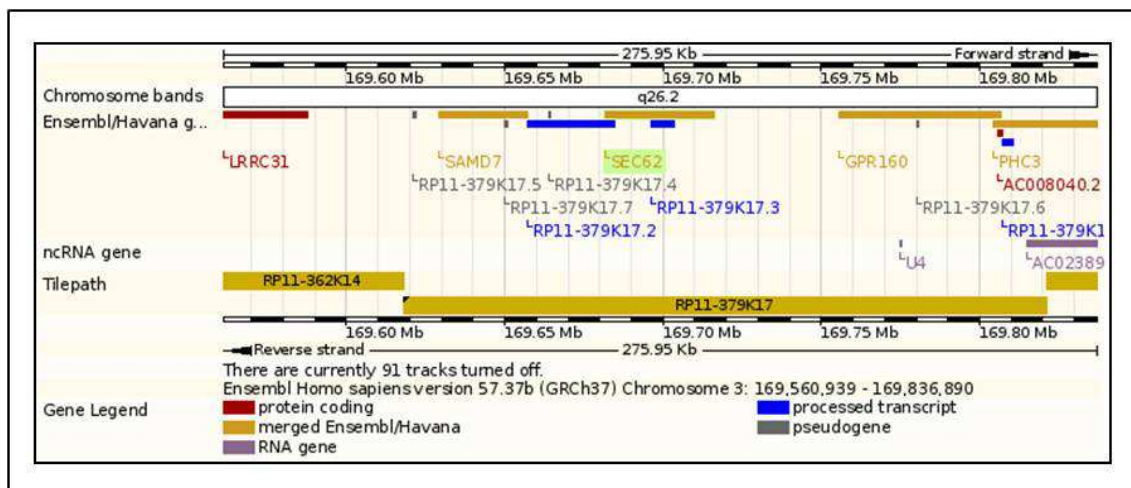


Abb. 5: Zytogenetische und physikalische Position des BAC-Klons RP11-379 K17

Herstellung von DNA-Sonden:

Der verwendete BAC-Klon RP11-379 K17 wurde vom BACPAC Resources Center Children's Hospital (Oakland Research Institute, Oakland, CA) bezogen. Er hat eine Länge von 202.918 kb. Zur Anreicherung wurden rekombinante *E.coli*-Bakterien in 1 l LB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Chloramphenicol (12,5 µg/ml) über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die BAC-Isolierung erfolgte gemäß Herstellerangaben mittels Plasmid Maxi Kit.

ALU-PCR:

Zur Amplifikation der in der BAC-Klon-DNA enthaltenen humanen DNA (einschließlich *SEC62*-Sequenz) wurde eine sogenannte ALU-PCR durchgeführt. ALU-Sequenzen sind repetitive Sequenzen, die sich nur im menschlichen Genom befinden. Mithilfe dieser speziellen PCR ist es möglich nur diese genomischen Sequenzen zu amplifizieren. Es werden spezielle Primer mit variabler Basensequenz verwendet, so dass die Primer an die unterschiedlichen repetitiven Sequenzen binden können, welche auf diese Weise amplifiziert werden. Die PCR wurde mit folgenden Primern durchgeführt:

Y= Pyrimidin, R= Purin

Primer	Sequenz
AluBari-1	5` GGATTACAGGYRTGAGCCA 3`
AluBari-2	5` RCCAYTGCACTCCAGCCTG 3`

Pipettierschema:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
DNA RP11-379 K17 (400 ng/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
PCR-Puffer 10x	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP`s (10mM)	5 µl	5 µl	5 µl
Primer AluBari-1	1 µl	/	1 µl
Primer AluBari-2	/	1 µl	1 µl
Hot Start Taq	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	36,5 µl	36,5 µl	36,5 µl

Es wurden drei Reaktionen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde nur der erste Primer zugegeben, im zweiten Ansatz nur der zweite und im dritten Ansatz wurden beide Primer zugesetzt. Damit sollte eine möglichst komplette Amplifikation der ALU-Sequenzen erreicht werden.

PCR-Programm:

1x	95°C	15 min
40x	95°C	1 min
	65°C	1 min
	72°C	4 min
1x	72°C	10 min

Zur Kontrolle der Amplifikation in der ALU-PCR wurde ein Aliquot von 3 µl der Reaktionsansätze in einem 1% igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.3.7). Für die Markierung wurden alle 3 Reaktionsansätze gepoolt.

Markierung der DNA-Sonden durch Random Priming:

Die Markierung der ALU-PCR-Produkte erfolgte mit dem BioPrime DNA Labeling Systems. Zu 100 ng DNA wurden 20 µl 2,5x Random Primer und TE-Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 30 µl dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend 1 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 5 µl 10x dNTP-Mix, 14 µl H₂O_{dd} und 1 µl Klenow-Fragment wurde der Ansatz gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte mit 5 µl Stopp-Puffer. Die markierte DNA wurde mit 5,5 µl 3 M Natriumacetat und 137,5 µl -20°C kalten 96% igen Ethanol für 30 min bei -80°C präzipitiert. Der Ansatz wurde dann bei 18000xg zentrifugiert, das Pellet mit 100 µl -20°C kalten 70% igen Ethanol gewaschen, nach erneutem Zentrifugieren getrocknet und in 20 µl H₂O_{dd} gelöst.

Dot Blot:

Die Effizienz des Biotineinbaus in die DNA-Sonde wurde durch einen Dot Blot quantifiziert. Von der markierten DNA wurden zunächst 5 Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) in 6x SSC-Puffer hergestellt. Je 2 µl der verdünnten DNA wurden auf eine Nitrozellulose-Membran pipettiert, 30 min getrocknet und anschließend die DNA durch UV-Crosslinking für 2 min bei 1200 µJoule/cm² an die Membran kovalent

gebunden. Die Membran wurde dann 30 min in Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen abzudecken. Nach kurzem Waschen der Membran in TN-Puffer erfolgte eine Inkubation mit Puffer 1 für 30 min. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in TN-Puffer und eine 10 minütige Äquilibriumierung in Dot-Puffer. Für die abschließende Farbreaktion wurde die Membran 30 min im Dunkeln in Puffer 2 inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 70% igen Ethanol. Bei erfolgreicher Biotinylierung sollten sämtliche DNA-Verdünnungen auf der Membran zu erkennen sein.

Tab. 11: Für den Dot Blot verwendete Puffer und Lösungen

TN-Puffer: pH 7,5	1,1 g	Trisbase
	8,76 g	NaCl
	ad 1000 ml	H ₂ O _{dd}
Blockierungslösung:	1 g	Magermilchpulver
	30 ml	20x SSC
	70 ml	H ₂ O _{dd}
Dot-Puffer: pH 9,5	12,1 g	Trisbase
	8,76 g	NaCl
	10,16 g	MgCl ₂
	ad 1000 ml	H ₂ O _{dd}
Puffer 1:	3 ml	TN-Puffer
	3µl	Streptavidin alkalische Phosphatase
Puffer 2:	5,7 ml	TN-Puffer
	33 µl	NBT (4-Nitro-blue-tetrazolium-chlorid)
	25 µl	BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat)

Chromosomenpräparation aus Zellkulturen:

Die Anzucht der permanenten Zelllinien für die Chromosomenpräparation erfolgte in 25 cm² Kulturflaschen. Am Vortag der Chromosomenpräparation wurde ein Medienwechsel vorgenommen, um die Zellteilung zu stimulieren. Vor der Chromosomenpräparation wurden die Zellkulturen mit 1 Tropfen Colcemid versetzt und für 40 min im Brutschrank inkubiert. Das Medium der Zellen wurde abgesaugt. Nach Zugabe einer Trypsin EDTA Lösung für 5 min bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen vom Boden

der Zellkulturflasche gelöst und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 210xg für 3 min wurde der Überstand verworfen. Zu dem Pellet wurde innerhalb von 3 min tropfenweise eine hypotone Lösung (0,0375 M KCl, 37°C) hinzugegeben. Nach erneuter Sedimentation wurde der Überstand verworfen. Zu dem Pellet wurde tropfenweise eine -20°C kalte Fixierlösung (3:1 Methanol/Eisessig) zugegeben und ständig resuspendiert. Die Lösung wurde für 1 h bei -20°C inkubiert. Sie wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in -20°C kalter Fixierlösung resuspendiert. Nach anschließender Zentrifugation, erfolgten die Zugabe von Fixierlösung und das Auftropfen auf angefeuchtete Objektträger. Diese werden anschließend auf einer Heizplatte (80°C) getrocknet.

Sondenvorbehandlung:

500 ng Biotin-markierte *SEC62*-Sonde, 500 ng Digoxigenin-markierte Chromosom 3 Zentromer Sonde sowie 12 µg Cot-1 DNA und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat wurden gemischt. Nach Zugabe von 3 Volumen Ethanol (absolut) wurde die DNA 1 h bei -70°C gefällt und anschließend für 30 min bei 18000xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA in 100 µl 70% igen Ethanol gewaschen (Zentrifugation 10 min, 18000xg bei 4°C) und für 20 min getrocknet und anschließend in 2,5 µl deionisiertem Formamid 30 min auf einem Schüttler gelöst. Nach Zugabe von 2,5 µl 20% Dextransulfat/4x SSC wurde die DNA-Lösung weitere 30 min geschüttelt, danach für 5 min bei 75°C denaturiert und ein Preannealing im 37°C Wasserbad für 30 min durchgeführt.

Vorbehandlung der Chromosomenpräparate und Hybridisierung:

Auf den Objektträger wurden 100 µl RNaseA-Lösung gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Präparate dreimal 5 min mit 2x SSC gewaschen. Zum Verdau der Proteine erfolgte ein Pepsin-Verdau für 1 min bei 37°C in einer Küvette. Folgend wurden die Objektträger 5 min PBS gewaschen, 10 min in 4% PFA inkubiert und danach die Präparate 5 min mit 2x SSC gewaschen. Je 3 min bei RT wurden die Chromosomenpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80% und 96%) dehydriert. Nach dem Lufttrocknen wurden die Objektträger mit 100 µl Denaturierungslösung überschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und für 1 min bei 75°C auf der Heizplatte inkubiert. Es erfolgte erneut eine Dehydrierung der Präparate für je 3 min mit einer -20°C kalten aufsteigenden

Alkoholreihe (70%, 80% und 96%) mit anschließender Lufttrocknung. Die vorbehandelten Objektträger wurden auf einer Heizplatte erwärmt (37°C), die DNA-Proben auf die Metaphasenspots gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet. Zur Hybridisierung erfolgte eine Inkubation der Objektträger für drei Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer.

Tab. 12: Für die Chromosomenvorbereitung verwendete Puffer und Lösungen

RNaseA-Lösung:	1 µl	RNaseA (10 mg/ml)
	99 µl	2x SSC
Pepsin-Verdauungslösung:	50 µl	Pepsin (100 µg/ml)
	135 µl	2 N HCl
	100 ml	H ₂ O _{dd}
Denaturierungslösung:	7 ml	deionisiertes Formamid
	3 ml	2x SSC
4% PFA:	40 g	PFA
	ad 1000 ml	PBS

Stringenzwaschung und Detektion:

Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Objektträger dreimal 5 min in Waschlösung 1 (45°C), zweimal 5 min in Waschlösung 2 (45°C), einmal 5 min in Waschlösung 3 (RT) und 10 min in Waschlösung 4 (RT) gewaschen, um unspezifisch gebundene Fragmente zu lösen. Es folgte ein 30-minütiger Blockierungsschritt in einer feuchten Kammer bei 37°C. Zu Detektion des Biotin-Signals wurde eine Inkubation mit 100 µl Blockierungslösung (siehe Dot Blot) und 1 µl Streptavidin-FITC für 45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C durchgeführt. Nach drei fünfminütigen Waschungen in Waschlösung 4 bei 37°C erfolgte die Detektion des Digoxigenin-Signals mit gleichzeitiger Verstärkung des Biotin-Signals durch Inkubation mit 100 µl Blockierungslösung, 1 µl Anti-Digoxigenin-Cy3 und 1 µl Bio-Anti-Streptavidin bei 37°C für 30 min in der feuchten Kammer. Durch weiteres Waschen von dreimal 5 min in Lösung 4 bei 37°C erfolgte eine weitere Signalverstärkung durch Zugabe von Streptavidin-FITC (1:100) und Goat-anti-mouse-Cy3 (1:100) in Blockierungslösung für 30 min bei 37°C. Die Präparate wurden dreimal für 5 min mit Lösung 4 gewaschen, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, luftge-

trocknet und in Vectashild DAPI-Antifade zur Kerngegenfärbung eingedeckt und mikroskopiert.

Tab. 13: Für die Stringenzwaschung und Detektion verwendete Puffer und Lösungen

Waschlösung 1:	500 ml	Formamid
	50 ml	20x SSC
	450 ml	H ₂ O _{dd}
Waschlösung 2:	100 ml	20x SSC
	900 ml	H ₂ O _{dd}
Waschlösung 3:	0,5 ml	20x SSC
	99,5 ml	H ₂ O _{dd}
Waschlösung 4:	200 ml	20x SSC
	1 ml	TritonX 100
	800 ml	H ₂ O _{dd}

Auswertung:

Die Auswertung der Präparate erfolgte am Olympus BX61 Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 600-fach), das mit folgenden Fluoreszenzfiltern ausgestattet war.

Tab. 14: Filtercharakteristika der Fluoreszenzfilter

	Anregungsfilter [nm]	Emissionsfilter [nm]	Strahlenteiler Transmission [nm]
DAPI	360 - 370	> 420	400
FITC	460 - 490	515 - 550	505
Rhodamin	520 - 550	> 580	565

Pro Präparat wurden 200 Interphasekerne auf die Anzahl ihrer Fluoreszenzsignale ausgezählt. Das Auszählen der Präparate erfolgte nach Kriterien von Hopman et al. (1991) (Hopman et al., 1991), wobei überlappende Kerne nicht gewertet wurden. Metaphasen wurden mittels einer CCD-Kamera digitalisiert und mit der ISIS Software bearbeitet und gespeichert.

Zur Qualitätsbestimmung und Überprüfung der Hybridisierungsbedingungen wurden beide Sonden simultan auf Chromosomen eines gesunden Spenders hybridisiert. Für jede Sonde wurden jeweils zwei Signale erwartet. Dabei ergab sich eine Streuung um diesen

Erwartungswert. Die Streuung ist auf Fehlhybridisierungen oder somatische Chromosomenpaarungen zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass auch bei den Präparaten der Tumorzelllinien eine Streuung in gleicher Größenordnung um den tatsächlichen Wert auftritt.

Um zu entscheiden, ob die untersuchten Tumorzelllinien signifikante Aberrationen aufweisen, wurde die zu erwartende Streuung in die Auswertung mit einbezogen.

Hierzu wurden zunächst die Mittelwerte (in Prozent) aus den Ergebnissen der Kontrollgewebe für 0 bis ≥ 3 Signale ermittelt und anschließend die Standardabweichung, die ein Maß für die Streuung darstellt, berechnet.

$$\bar{X} = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n X_i$$

\bar{X} = Mittelwert n = Gesamtzahl der Signale

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} * \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

s = Standardabweichung \bar{X} = Mittelwert n = Gesamtzahl der Signale

Aus diesen Werten (Mittelwert (\bar{X}) \pm Standardabweichung (s)) wurden Intervalle ermittelt, innerhalb dessen ein Wert noch als normal angesehen werden kann. Liegen die berechneten Werte der Tumorzelllinien außerhalb der Intervalle, wurde die Probe als statistisch signifikant verändert klassifiziert. Die auf diese Weise berechneten Mittelwerte, Standardabweichungen und Toleranzintervalle sind in Punkt 3.1. dargestellt.

2.2.3.8 “real time”-PCR (RT-PCR)

Die Quantifizierung von mRNA wurde in einer RT-PCR mithilfe des HT7900 von Applied Biosystems und TaqMan® Genexpressionassays durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem in 2.2.3.5 beschriebenen Protokoll. Die RT-PCR ist eine Methode, die es ermöglicht, die Anzahl der gebildeten DNA-Moleküle schon während der Reaktion zu erfassen.

Die DNA-Menge wird mithilfe von TaqMan-Proben durch den Fluoreszenz-(Förster)-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bestimmt. An eine Oligonuklotidsonde, die an interne Sequenzen der PCR-Produkte bindet, ist am 5'-Ende ein Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) gebunden, am 3'-Ende befindet sich ein sogenannte Quencher, dessen Absorptionsspektrum dem Emissionsspektrum des Reporterfarbstoffes entspricht. Sobald der Reporterfarbstoff angeregt wird, transferiert er die Energie auf den Quencher, so dass keine Fluoreszenz detektiert werden kann. Durch die 5'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase wird bei erfolgreicher Replikation die Sonde gespalten und somit der Reporter vom Quencher räumlich getrennt. Der Förster-Resonanz-Energie-Transfer ist nun nicht mehr möglich und die Emission des Reporterfarbstoffes kann proportional zur Degradation der Sonden und entsprechend der Zunahme des PCR-Produkts detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal steigt während der PCR proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes an. Der Ct-Wert (cycle of threshold) entspricht dem Zeitpunkt bzw. dem Zyklus der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von dem Hintergrundfluoreszenz abhebt. Je niedriger der Ct-Wert ist, desto mehr Kopien des Zielgens sind zu Beginn in der Probe enthalten.

Die PCR erfolgte in einer 96 Well-Mikrotiterplatte in Triplikaten mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl pro Well.

Pipettierschema:

cDNA Template (50 ng/µl)	1 µl
TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x)	10 µl
TaqMan® Gene Expression Assay	1 µl
H ₂ O _{dd}	ad 20µl

PCR-Programm:

1x	95°C	10 min
40x	95°C	15 s
	60°C	1 min

Relative Quantifizierung

Die relative Expression der zu untersuchenden Gene in den *SEC62* siRNA transfizierten und Kontroll siRNA transfizierten PC3-Zellen wurde auf unbehandelte PC3-Zellen bezogen. Die Proben wurden als Triplikate gemessen, wobei der Ct-Wert der drei Messungen eine Standardabweichung von $s = 0,5$ nicht überschreiten durfte. Als endogene Kontrolle wird ein Referenzgen, ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen, zusätzlich amplifiziert. Es handelt sich dabei um ein Gen, das ubiquitär vorkommt und in den verwendeten Zellen konstant exprimiert wird. In diesem Versuch diente *TBP* (TATA box binding protein) als Referenzgen. Zur relativen Quantifizierung kam die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Pfaffl, 2001) zur Anwendung. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der gemittelte Ct-Wert des Referenzgens vom gemittelten Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (entspricht ΔCt). Nach dieser Normierung wird vom ΔCt -Wert der Probe der ΔCt -Wert der Kontrolle (hier PC3-Zellen unbehandelt) abgezogen ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Der relative Expressionsunterschied (Ratio) zwischen Probe und Kontrolle ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Probe} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

2.2.3.9 Sequenzierung

Sequenzierungen der PCR-Produkte (siehe 2.2.3.6) wurden bei der Firma GENTERprise GmbH (Mainz) in Auftrag gegeben, wobei die Probenvorbereitung nach Firmenanleitung durchgeführt wurde. Die Sequenzierung der Templates erfolgte von beiden Seiten. Zur Auswertung der Elektropherogramme kam das Programm Chromas zum Einsatz. Die Sequenzen wurden mit dem BLAST-Algorithmus verifiziert.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Western Blot

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt, dabei werden Proteine der Größe nach aufgetrennt. Mittels Anlagerung des anionischen Detergens SDS an hydrophobe Gruppen innerhalb der Proteine kann eine gleichmäßige negative Ladung erzielt werden, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird (Laemmli, 1970). Unter Verwendung von diskontinuierlichen Gelsystemen, bestehend aus einem niederprozentigen Sammelgel und einem höherprozentigen Trenngel, wird dafür gesorgt, dass sich die auf das Sammelgel aufgetragenen Proteine am Übergang zum Trenngel sammeln und in das Trenngel einlaufen. Hierdurch wird eine bessere Trennschärfe erreicht.

Tab. 15: Für die SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendete Puffer und Lösungen

Laufpuffer: 5-fach	15 g	Tris base
	72 g	Glycin
	5 g	SDS
	ad 1000 ml	H ₂ O _{dd}
Proteinprobenpuffer: 2-fach	1,875 ml	H ₂ O _{dd}
	1,875 ml	0,5 M Tris pH 6,8
	3 ml	Glycerin (50% (v/v))
	0,3 g	SDS
	0,2 g	Bromphenolblau
	0,75 ml	β-Mercaptoethanol

Mit 20 µl 2-fach Proteinprobenpuffer wurden die zu analysierenden Proteinproben gemischt, Glasbeads dazu gegeben, für 10 min bei 56°C im Heizblock inkubiert, 30 min geschüttelt und wieder für 10 min bei 56°C im Heizblock inkubiert. Danach erfolgte eine kurze Zentrifugation (10 s, 15800xg) der Ansätze und der Auftrag der Proben auf ein SDS-Gel. Zur genauen Bestimmung der Größe der Proteine wurde zusätzlich 1 µl „prestained“ Protein-Molekulargewichtsmarker aufgetragen und nachfolgend die Elektrophoresekam-

mer vollständig mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurde eine Stromstärke von 45 mA für 3 h angelegt. Der Lauf endete, wenn die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

Tab. 16: Schema zur Herstellung der SDS-Gele

Komponenten	12,5% Trenngel	4% Sammelgel
H ₂ O _{dd}	2,86 ml	5,01 ml
40% Acrylamid	4,69 ml	0,9 ml
2% Bisacrylamid	1,25 ml	0,24 ml
1,825 M Tris pH 8,8	6 ml	
1 M Tris pH 6,8		0,9 µl
10% SDS (w/v)	150 µl	72 µl
20% APS (w/v)	45 µl	67,5 µl
TEMED	5 µl	10,05 µl
Gesamtvolumen	15 ml	7,2 ml

Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen:

Nach der SDS-Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran mittels einer Nass-Blot-Kammer. Der Transfer erfolgt durch ein elektrisches Feld. Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten, dann kurz bei RT in Methanol geschwenkt und anschließend für 5 min bei RT in Transferpuffer inkubiert. Im Vorfeld zugeschnittene 3M Whatman-Papiere und zwei Schwämme wurden ebenfalls mit Transferpuffer getränkt. In die Halteapparatur des Blotsystems wurde ein Schwamm, ein 3M Whatman-Papier, das Gel, die PVDF-Membran, ein weiteres 3M Whatman-Papier und ein weiterer Schwamm aufgelegt, die Halteapparatur des Blotsystems zusammengedrückt und in die Tank-Blot-Apparatur eingesetzt. Dann wurde Transferpuffer eingefüllt und der Transfer erfolgte unter Kühlen und Rühren über Nacht bei 450 mA.

Tab. 17: Für Elektrotransfer von Proteinen verwendete Puffer und Lösungen

Transferpuffer:	7,2 g	Glycin
	1,5 g	Tris
	ad 1000 ml	H ₂ O _{dd}

Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membran:

Um eine unspezifische Anlagerung von Antikörpern zu verhindern, wurden vor der eigentlichen Immundetektion die proteinfreien Regionen der PVDF-Membran blockiert. Hierzu wurde die Membran für 30 min mit 10 ml Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit 10 ml Blockierungslösung mit dem Primär-Antikörper (Sec62 1:100, GRP78 1:500 u. GAPDH 1:1000) inkubiert. Nun wurde die Membran für 5 min zunächst in PBS-Puffer, dann zweimal für 5 min in PBST-Puffer und nochmals für 5 min in PBS-Puffer gewaschen und schließlich mit dem Sekundär-Antikörper ECLTMPlex goat-anti-rabbit Cy5 (1:1000) inkubiert. Nach der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper wurde erneut wie oben beschrieben mit PBS/PBST gewaschen, im Anschluss getrocknet und mit dem Thyphoon Trio eingescannt. Für Cy5 wurde der entsprechende Filter verwendet und die Membran mit 20 µm Auflösung eingescannt.

Tab. 18: Für Immundetektion verwendete Puffer und Lösungen

PBS-Puffer: 10-fach pH 7,3	88 g	NaCl
	6 g	NaH ₂ PO ₄
	28,4 g	Na ₂ HPO ₄
	ad 1000 ml	H ₂ O _{dd}
PBS-Puffer:	25 ml	PBS-Puffer 10-fach
	ad 250 ml	H ₂ O _{dd}
PBST-Puffer:	25 ml	PBS-Puffer 10-fach
	625 µl	Tween-20 0,25% (w/v)
	ad 250 ml	H ₂ O _{dd}
Blockierungslösung:	2,5 g	Magermilchpulver
	5 ml	PBS-Puffer 10-fach
	ad 50 ml	H ₂ O _{dd}

Auswertung:

Die gescannten Blots wurden mittels Image Quant TL Software 5.1 ausgewertet. Dazu wurden die entsprechenden Banden ausgewählt und deren Intensitäten berechnet. Für jede Spur wurden die Werte der Zielproteine anhand des Housekeeping Proteins GAPDH

normalisiert. Wenn nicht beim jeweiligen Experiment anders angegeben, wurden pro Ansatz Triplikate durchgeführt und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Normierung erfolgte auf unbehandelte Zellen, dazu wurden diese gleich 1 gesetzt.

2.2.4.2 Proteom-Analyse

Für den Vergleich von *SEC62* UTR siRNA transfizierten PC3-Zellen mit Kontroll siRNA transfizierten PC3-Zellen wurde die 2D Difference Gel Electrophoresis (DIGE) Technologie gewählt, um Veränderungen im Proteom zu detektieren und anschließend mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Hierfür wird die ϵ -Aminogruppe des Lysins der Proteine aus den unterschiedlich behandelten Zellen kovalent mit unterschiedlichen CyDye Fluorochrome (Cy2/Cy3/Cy5) markiert. Die Fluoreszenzmarkierung der Proben erfolgt vor der Separation der Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese. Nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden die Fluoreszenzsignale nach Anregung der CyDye Fluorochrome mithilfe des Typhoon Trio Scanners detektiert und mit der DeCyder Version 6.5 Software ausgewertet. Die mit der DeCyder Software ermittelten differenziellen Spots werden auf dem präparativen Gel lokalisiert, mit einem Spotpicker ausgestochen und massenspektrometrisch identifiziert. Die Proteomanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Markus Greiner (Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg) durchgeführt.

Probenvorbereitung und Proteinextraktion für DIGE:

In zwei unabhängigen Experimenten wurden PC3-Zellen mit *SEC62* UTR siRNA und Kontroll siRNA transfiziert und 72 h nach der ersten Transfektion geerntet, gezählt, zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und lyophilisiert. 1×10^6 Zellen wurden in 100 μ l Labelingpuffer aufgenommen und im MP FastPrep24-Homogenizer für 30 s homogenisiert.

Protein-Präzipitation und Quantifizierung:

Die Präzipitation mittels 2D Clean-Up Kit trennt Proteine von Verunreinigungen wie Salzen, Lipiden, Nukleinsäuren und Detergenzien, wodurch auch die isoelektrische Fokussierung (IEF) und die Farbstoffmarkierungseffizienz verbessert werden. Die Präzipitation erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Das Proteinpellet wurde erneut

in 100 µl Labelingpuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte nach Angaben des Herstellers die Quantifizierung der Proteinproben mittels 2D Quant Kit.

Proteinmarkierung:

Die Cy-Farbstoffe wurden in DMF auf eine Konzentration von 400 pmol/µl verdünnt. Je 50 µg Gesamtproteinlysate wurden 400 pmol Farbstoffe eingesetzt. Die Markierungsreaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und durch Zugabe von 1 mM Lysin abgestoppt.

Tab. 19: Markierung der Proben mit den verschiedenen Cy-Farbstoffen

Ansatz:	siRNA	Cy3	Cy5	Cy2
1	SEC62 UTR siRNA	50 µg	0 µg	25 µg
2	SEC62 UTR siRNA	25 µg	25 µg	25 µg
3	Kontroll siRNA	25 µg	25 µg	25 µg
4	Kontroll siRNA	0 µg	50 µg	25 µg

Die Proben wurden wie unten aufgelistet zusammenpipettiert und DIGE-Sample-Puffer 2x bis zu einem maximalen Volumen von 400 µl zugegeben.

Tab. 20: Probenzusammensetzung für IEF-Streifen

Streifen 1 Analytisches Gel:	Ansatz 1 Cy3, Cy2
	Ansatz 3 Cy5, Cy2
Streifen 2 Analytisches Gel:	Ansatz 2 Cy3, Cy2
	Ansatz 4 Cy5, Cy2
Streifen 3 Analytisches Gel:	Ansatz 1 Cy3, Cy2
	Ansatz 2 Cy5, Cy2
Streifen 4 Analytisches Gel:	Ansatz 3 Cy3, Cy2
	Ansatz 4 Cy5, Cy2
Streifen 5 Präparatives Gel:	Ansatz 1 Cy3, Cy2
	Ansatz 2 Cy3, Cy2
	Ansatz 3 Cy5, Cy2
	Ansatz 4 Cy5, Cy2
	Ansatz 1, 2, 3 und 4 unmarkiert

Isoelektrische Fokussierung (IEF):

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur isoelektrischen Fokussierung (IEF) der Proteine bedient sich *Carrier Ampholyten*, welche in die Gellösung eingearbeitet sind. Der pH-Gradient bildet sich während der Elektrophorese allmählich aus. Um die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt zu trennen, wurden die IEF-Gelstreifen (pH 3 - 11, 24 cm) über Nacht in Rehydratisierungspuffer gequollen. Die Gelstreifen wurden in die Apparatur eingelegt und mit Mineralöl (Dry Strip Cover Fluid) überschichtet. Die Proben wurden auf der anodischen Seite der Gelstreifen aufgetragen und mit einigen Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit dem Ettan IPGphor nach folgendem Protokoll.

Programm:

1. Step	1 h	500 V
2. Gradient	13 h	1000 V
3. Gradient	4,5 h	10000 V
4. Step	2.5 h	10000 V

Äquilibration der IEF-Streifen:

Vor der zweiten Dimension wurden die IEF-Streifen zuerst 15 min in Äquilibrationlösung I und danach 15 min in Äquilibrationlösung II zur Reduzierung und Alkylierung inkubiert.

SDS-PAGE (2. Dimension):

Die analytischen und präparativen Gele wurden von der AG Schäfer Fachhochschule Zweibrücken zur Verfügung gestellt. Mittels 0,5% (w/v) Agaroselösung wurden die IEF-Streifen luftblasenfrei in den Gelkassetten fixiert. Die Trennung der Proteine erfolgte in der Ettan DALTwelve Elektrophorese-Einheit bei 5 W, zum Einlaufen der Proteine und anschließend bei 10 W bis die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Die Gele wurden nach Beendigung der Gelelektrophorese mit dem Typhoon Trio Scanner mit einer Auflösung von 100 µm eingescannt. Für jeden verwendeten Fluorophor wurde ein separates Bild erstellt und als Datei auf dem Computer abgespeichert.

Fluorophor	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Emissionsfilter [nm]	verwendeter Laser
Cy2	489	506	500 - 540	Blue (488)
Cy3	550	570	565 - 595	Green (532)
Cy5	649	670	655 - 685	Red (633)

Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mithilfe der DeCyder™-Software. Nachdem die Anzahl der detektierten Spots und die Lage der Referenzpunkte für den Spotpicker von der Software ermittelt waren, wurden die erhaltenen Rohdaten durch die Verwendung entsprechender Filter vorselektiert. Die Spotanzahl wurde auf 2000 herabgesetzt und die Proteinpeaks mit einer Steigung >2 wurden aus der Auswertung entfernt. Alle Spots, die eine 1,5-Fache Änderung aufwiesen, wurden als dereguliert definiert. Die x- und y-Koordinaten der deregulierten Proteinspots und die entsprechenden Referenzpunkte der Gele wurden in Form einer Datei (Picklist) abgespeichert und an den Spotpicker übertragen.

Ausstanzen von Proteinspots:

Die als dereguliert (Regulation $>1,5$ gegenüber den Kontroll-Zellen) bewerteten Proteinspots wurden für eine massenspektrometrische Analyse aus dem präparativen Gel ausgestanzt. Das zu bearbeitende Gel wurde hierfür unter H_2O_{dd} gelagert. Das Ausstanzen der Proteinspots erfolgt mittels eines automatischen Ettan Spotgelpicker. Die gepickten Proben werden in je ein Well einer 96 Well-Mikrotiterplatte überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

Auswertung:

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte am Institut für Analytical Sciences in Dortmund durch Dr. Rene Zahedi. Für jedes Protein wurden die Sequenzabdeckung und der EmPAI-Value (Ishihama et al., 2005) angegeben. Die resultierenden Peptidsequenzen wurden durch Datenbankvergleiche in der IPI human Datenbank von EBI (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html>) Proteinen zugeordnet. Anschließend wurde eine „gene ontology“-Analyse basierend auf der GO-Datenbank <http://www.geneontology.org/> durchgeführt.

Tab. 21: Zusammensetzung von Puffer und Lösungen für die 2D-DIGE

Labelingpuffer: pH 8,75	7,6 g	Thioharnstoff
	21 g	Harnstoff
	2 g	CHAPS
	0,15 g	Tris
	ad 50 ml	H ₂ O _{dd}
DIGE-Sample-Puffer 2-fach:	7,6 g	Thioharnstoff
	10,5 g	Harnstoff
	1 g	CHAPS
	500 µl	Pharmalyte 3-10nl
	0,5 g	DTT
	ad 25 ml	H ₂ O _{dd}
Rehydrierungspuffer:	3 ml	DeStreak Lösung
	15 µl	IPG-Puffer
SDS-Elektrophoresepuffer:	60,5 g	Tris
	288 g	Glycin
	20 g	SDS
	ad 2000 ml	H ₂ O _{dd}
DIGE-Puffer:	300 g	Tris
	750 ml	H ₂ O _{dd}
Äquibrierungslösung:	36 g	Harnstoff
	2 g	SDS
	3,5 ml	DIGE-Puffer
	35 ml	Glycerol
	ad 100 ml	H ₂ O _{dd}
Äquibrierungslösung I:	15 ml	Äquibrierungslösung
	150 mg	DTT
Äquibrierungslösung II:	15 ml	Äquibrierungslösung
	375 mg	Jodacetamid

2.2.4.3 Immunhistochemische Färbung von Multi-Tumor-Gewebearray

Der Multi-Tumor-Gewebearray wurde am Institut für Pathologie der Universität Basel zur Verfügung gestellt. Der Array besteht aus 2071 Gewebeproben, die sich in 1939 Spots von Primärtumoren aus 55 verschiedenen Tumorentitäten und deren Subtypen sowie 132 Proben aus Normalgeweben aufteilen. Der Multi-Tumor-Gewebearray wurde von Mitarbeitern der Pathologie der Universitätsklinik Homburg immunhistochemisch gefärbt (siehe Abbildung 6). Die Objektträger wurden über Nacht bei 4°C mit dem Sec62-Primärantikörper in einer Verdünnung 1:600 inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels Dako EnVision™ Kit, wobei die Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt wurde. Die Beurteilung der Färbung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Klassifiziert wurde zwischen gefärbt (Sec62 positiv) und ungefärbt (Sec62 negativ).

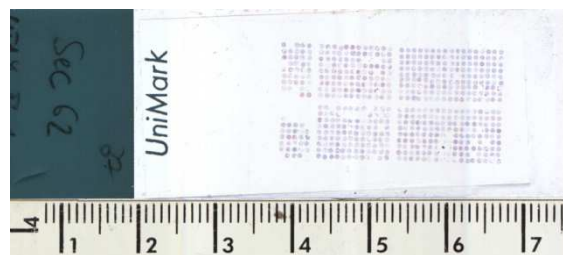


Abb. 6: Immunhistochemische Färbung von Sec62 eines Multi-Tumor-Gewebearray

3. Ergebnisse

3.1 Amplifikation von *SEC62* in Tumorzelllinien unterschiedlicher Organsysteme

Mithilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) an Prostatakarzinomen wurde in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe Gewinne von genetischem Material auf Chromosom 3q25-q26 nachgewiesen (Sattler et al., 2000). Dieser Bereich konnte nachfolgend mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) unter Verwendung von 22 BAC-Klonen in den Prostatakarzinomzelllinien PC3, DU145 und DU145MN1 auf 700 kb in der Region 3q26.2 eingegrenzt werden (Jung et al., 2006). Bei der weiteren Feinkartierung mit quantitativer „real-time“-PCR wurde das *SEC62*-Gen mit der höchsten Amplifikationshäufigkeit in 50% der untersuchten Prostatakarzinome (n=22) identifiziert, und seine Überexpression auf mRNA- und Proteinebene bestätigt (Jung et al., 2006).

Analog zu den Untersuchungen der Amplifikationen des *SEC62*-Gens beim Prostatakarzinom, wurden in der vorliegenden Arbeit FISH-Analysen an Tumorzelllinien verschiedener Organsysteme durchgeführt. Hierzu wurden neben der noch nicht untersuchten Prostatakarzinomzelllinie LNCaP, die Prostatakarzinomzelllinie PC3, die Harnblasenkarzinomzelllinien RT4 und T24, die Kolonkarzinomzelllinien HT29 und COLO320, die Mammakarzinomzelllinie MCF7 sowie die Fibrosarkomzelllinie HT1080 analysiert. Zur Differenzierung zwischen einer Polysomie von Chromosom 3 und einem distinkten Sequenzgewinn von *SEC62* wurde eine zentromerspezifische Sonde für Chromosom 3 (D3Z1) und der lokusspezifische BAC Klon RP11-379 K17 kohybridisiert (siehe 2.2.3.8), wobei der eingesetzte BAC-Klon die gesamte genomische Sequenz des *SEC62*-Gens überspannt.

Die Auswertung der Signale erfolgte nach den Kriterien von Hopman et al. (1991) durch Auszählen der spezifischen Sondensignale von 200 Interphasekernen (Hopman et al., 1991). Zur Qualitätsbestimmung und Überprüfung der Hybridisierungsbedingungen wurden Chromosomenpräparate von Blutlymphozyten eines gesunden Spenders mitgeführt. Die Streuung um den erwarteten Wert von zwei Signalen pro Zellkern (94% für *SEC62* bzw. 96,5% für Chromosom 3) ist auf Fehlhybridisierungen oder somatische Chromosomenpaarungen zurückzuführen (siehe Tab. 22). Es ist daher anzunehmen, dass

auch bei den Präparaten der Tumorzelllinien eine Streuung der gleichen Größenordnung um den tatsächlichen Wert auftritt.

Tab. 22: Anzahl der Signale für die *SEC62* lokusspezifische Sonde und die Chromosom 3 zentromerspezifische Sonde (#3) in % der untersuchten Zellkerne (n=200) aus Lymphozyten eines gesunden Spenders. \bar{X} = Mittelwert; s = Standardabweichung

Sonden		Anzahl der Signale pro Zelle in % der untersuchten Zellkerne (n=200)			
		0	1	2	≥ 3
<i>SEC62</i>	Intervall	0,5 - 4	2,5 - 4	93,5 - 94,5	0 - 1
	$\bar{X} + s$	2,3 \pm 2,5	3,3 \pm 1,1	94 \pm 0,7	0,5 \pm 0,7
#3	Intervall	0	1 - 3	96,5	0,5 - 2,5
	$\bar{X} + s$	0 \pm 0	2 \pm 1,4	96,5 \pm 0,7	1,5 \pm 1,4

Im Vergleich dazu fanden sich in allen untersuchten Tumorzelllinien (siehe Tab. 23) signifikante Aberrationen. Selektive Verluste von Chromosom 3 und *SEC62* konnten in der Prostatakarzinomzelllinie PC3, in den untersuchten Kolon- und Blasenkarzinomzelllinien sowie in der Fibrosarkomzelllinie HT1080 nachgewiesen werden, wohingegen in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP und Mammakarzinomzelllinie MCF7 keine Deletionen gefunden wurden. Die häufigsten Verluste (in 53% der untersuchten Zellen) wurden in HT1080 für Chromosom 3 beobachtet. Auffallend war, dass *SEC62* in allen Tumorzelllinien seltener als Chromosom 3 deletiert war. Selektive Gewinne von Chromosom 3 und *SEC62* fanden sich in allen analysierten Tumorzelllinien, wobei in LNCaP und MCF7 der Gewinn von Chromosom 3 (91,5% und 89,5%) mit einer gleichzeitigen Vermehrung des Gens (91% und 86%) einhergeht. Die Analyse der verbleibenden Tumorzelllinien zeigt, dass eine größere Anzahl an Zellen eine Genkopienzahlvermehrung von *SEC62* aufweist als Polysomien von Chromosom 3. Der deutlichste Unterschied wird in der Fibrosarkomzelllinie HT1080 ersichtlich. Hier weisen nur 17% der untersuchten Zellen Gewinne von Chromosom 3 auf, jedoch 56,5% eine Genkopienzahlvermehrung von *SEC62*. Die meisten Genkopienzahlgewinne von *SEC62* zeigte die Untersuchung von PC3-Zellen (63,5%). Mehr Genkopienzahlgewinne als Polysomien von Chromosom 3 finden sich ebenfalls in den Kolonkarzinomzelllinien HT29 (55,5% und 22%) und COLO320 (47% und 21,5%) sowie in den Blasenkarzinomzelllinien T24 (34,5% und 17,5%) und RT4 (34% und 11,5%).

Tab. 23: Anzahl der Signale für die *SEC62* lokusspezifische Sonde und die Chromosom 3 zentromerspezifische Sonde (#3) in % der untersuchten Zellkerne (n=200) aus Tumorzelllinien unterschiedlicher Organsysteme. Zusätzlich angegeben ist die durchschnittliche Anzahl der Signale pro Zelle.

Zelllinie	Sonden	Anzahl der Signale pro Zelle in % der untersuchten Zellkerne (n=200)				Durchschnittl. Anzahl der Signale pro Zelle
		0	1	2	≥3	\bar{x}
PC3	<i>SEC62</i>	1	10	25,5	63,5	2,98
	#3	9	24	31	36	2,3
LNCaP	<i>SEC62</i>	0	0	9	91	3,57
	#3	0,5	0	8	91,5	3,8
MCF7	<i>SEC62</i>	0	0,5	13,5	86	3,53
	#3	0	1	9,5	89,5	3,5
HT1080	<i>SEC62</i>	3	11	29,5	56,5	2,74
	#3	21	32,5	29,5	17	1,5
HT29	<i>SEC62</i>	1	11	32,5	55,5	2,73
	#3	4,5	32	41,5	22	1,8
COLO320	<i>SEC62</i>	1	10	42	47	2,59
	#3	4,5	29,5	44,5	21,5	1,9
T24	<i>SEC62</i>	0	15,5	50	34,5	2,21
	#3	1,5	37,5	43,5	17,5	1,8
RT4	<i>SEC62</i>	4,5	16,5	45	34	2,20
	#3	10,5	30,5	47,5	11,5	1,6

Dabei lässt der *SEC62*-Kopienzahlgewinn, ohne gleichzeitige Vermehrung von Chromosom 3, auf eine selektive Amplifikation von *SEC62* schließen. Die Untersuchung verdeutlicht, dass alle untersuchten Tumorzelllinien aus einem Mosaik unterschiedlicher Zellklone bestehen, was zu der heterogenen Verteilung innerhalb einer Zellpopulation führt. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass nicht nur Prostatakarzinomzelllinien *SEC62*-Genkopienzahlgewinne aufweisen, sondern auch in Zelllinien anderer Tumorentitäten ist diese Amplifikation nachweisbar.

Zur chromosomalen Lokalisierung des *SEC62*-Gens innerhalb des Genoms wurden FISH-Analysen an Metaphasen der untersuchten Zelllinien durchgeführt (siehe Abbildung 7). Für die Prostata-, Kolon- und Blasenkarzinomzelllinien wurden exemplarisch Zellen

von LNCaP, HT29 und T24 gezeigt. Die Auswertung erfolgte am Olympus BX61 Auflicht-Fluoreszenzmikroskop bei 600-facher Vergrößerung. In Abbildung 7 A ist eine Kontrollhybridisierung an einer Metaphase aus Blutlymphozyten eines gesunden Spenders dargestellt, wobei jeweils zwei Signale für *SEC62* und Chromosom 3 erkennbar sind. Alle Tumorzelllinien weisen Gewinne von *SEC62* auf, was die Ergebnisse der Hybridisierung an Interphasechromosomen bestätigt. Eine normale Verteilung der Chromosom 3 Signale wurde bei der Blasenkarzinomzelllinie T24 und der Fibrosarkomzelllinie HT1080 gefunden. Die Untersuchung von LNCaP Metaphasechromosomen sichert ebenfalls die oben aufgeführten Ergebnisse. Hier wird deutlich, dass eine Kopienzahlvermehrung des ganzen Chromosoms vorliegt und keine Amplifikation eines einzelnen Gens. Mit dieser Untersuchung kann insgesamt gezeigt werden, dass in den Tumorzelllinien mit Ausnahme von LNCaP, die vermehrten Genkopien von *SEC62* nicht ausschließlich auf Chromosom 3 liegen, sondern im Genom verteilt sind.

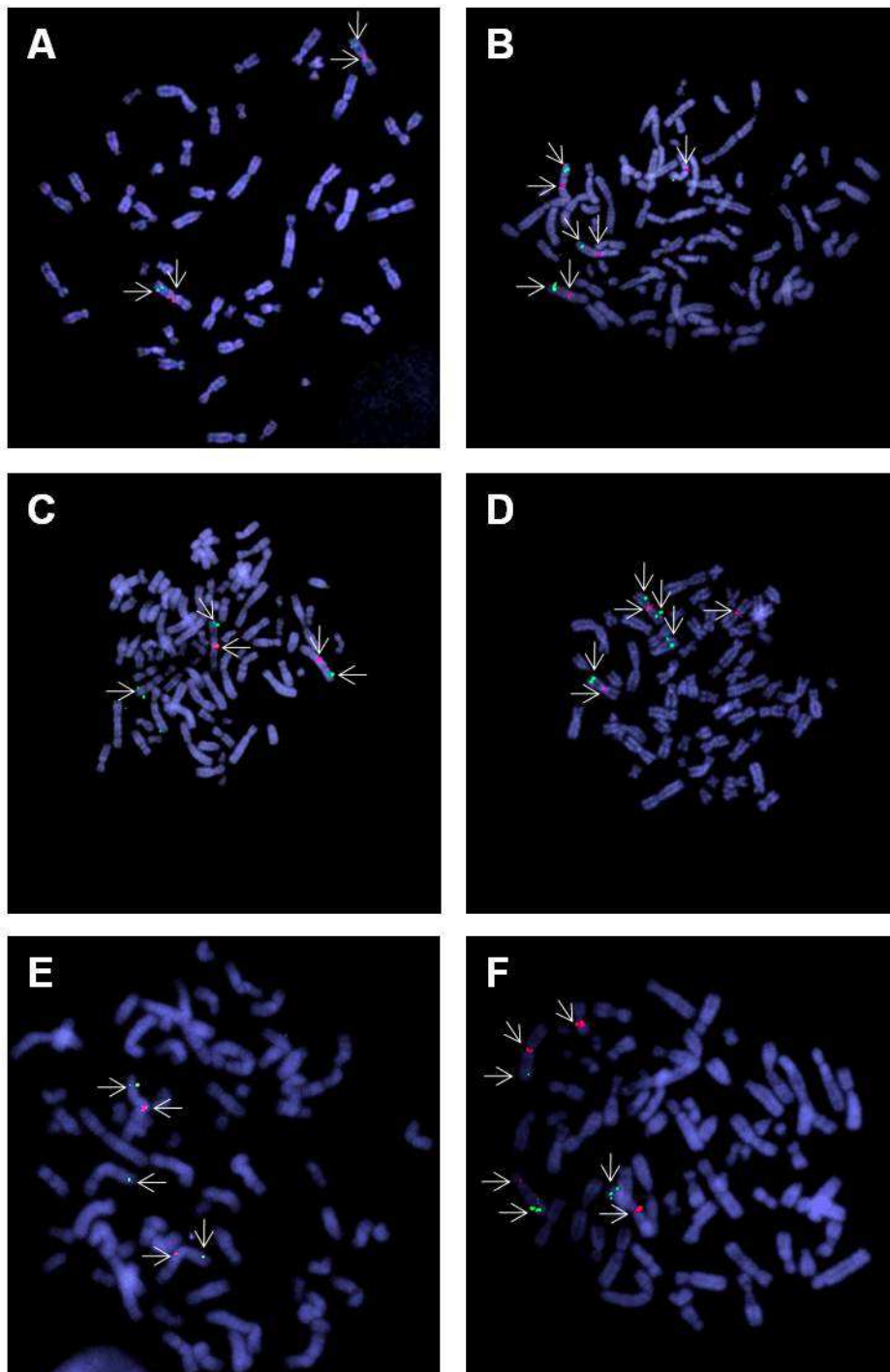


Abb. 7: Zwei-Farben-FISH-Hybridisierung an Metaphasechromosomen von Tumorzelllinien **A** Lymphozyten eines gesunden Spenders **B** Prostatakarzinomzelllinie LNCaP **C** Fibrosarkomzelllinie HT1080 **D** Kolonkarzinomzelllinie HT29 **E** Blasenkarzinomzelllinie T24 **F** Mammakarzinomzelllinie MCF7. Die grünen Signale zeigen die Lokalisierung von *SEC62* und die roten Signale zeigen die Lokalisierung des Zentromers von Chromosom 3 (siehe Pfeile).

3.2 Auswirkung von *SEC62*-Amplifikationen auf die Genexpression

Als Folge von Genamplifikationen kommt es in Tumoren meistens zur Überexpression des entsprechenden Gens auf mRNA- und Proteinebene. Da Jung et al. (2006) in 100% der untersuchten Prostatakarzinomgewebe eine *SEC62*-Überexpression auf mRNA-Ebene nachweisen konnten, wurde nun, basierend auf den bisherigen Amplifikationsdaten der untersuchten Tumorzelllinien, überprüft, ob die *SEC62*-Amplifikation gleichzeitig mit einer erhöhten Transkriptionsrate einhergeht (Jung et al., 2006). Die Analyse erfolgte an den in 3.1 untersuchten Tumorzelllinien. Die Quantifizierung der mRNA wurde in einer „real-time“-PCR mithilfe des HT7900 (Applied Biosystems) und TaqMan® Genexpressionassays durchgeführt, wobei die Normierung auf PC3-Zellen erfolgte. Für die Ermittlung der *SEC62*-Amplifikation wurde die Gesamtzahl der *SEC62*-Signale durch die Gesamtzahl der untersuchten Tumorzellkerne geteilt (siehe Tab. 23)

Wie in 3.1 gezeigt, weisen alle untersuchten Tumorzelllinien *SEC62*-Genkopienzahlgewinne auf (siehe Abb. 8), wobei LNCaP und MCF7 die meisten Gewinne zeigten. Beim Vergleich der Amplifikations- und Expressionsdaten wird deutlich, dass sich der DNA-Gewinn von *SEC62* nur in den Tumorzelllinien HT1080 und HT29 in einer Überexpression auswirkt. Interessanterweise ist in den Tumorzelllinien LNCaP, COLO320, MCF7 und T24 keine erhöhte *SEC62*-Expression im Vergleich zu PC3 nachweisbar. In der Blasenzelllinie RT4 hingegen findet sich, trotz Amplifikation, sogar eine geringere mRNA-Menge.

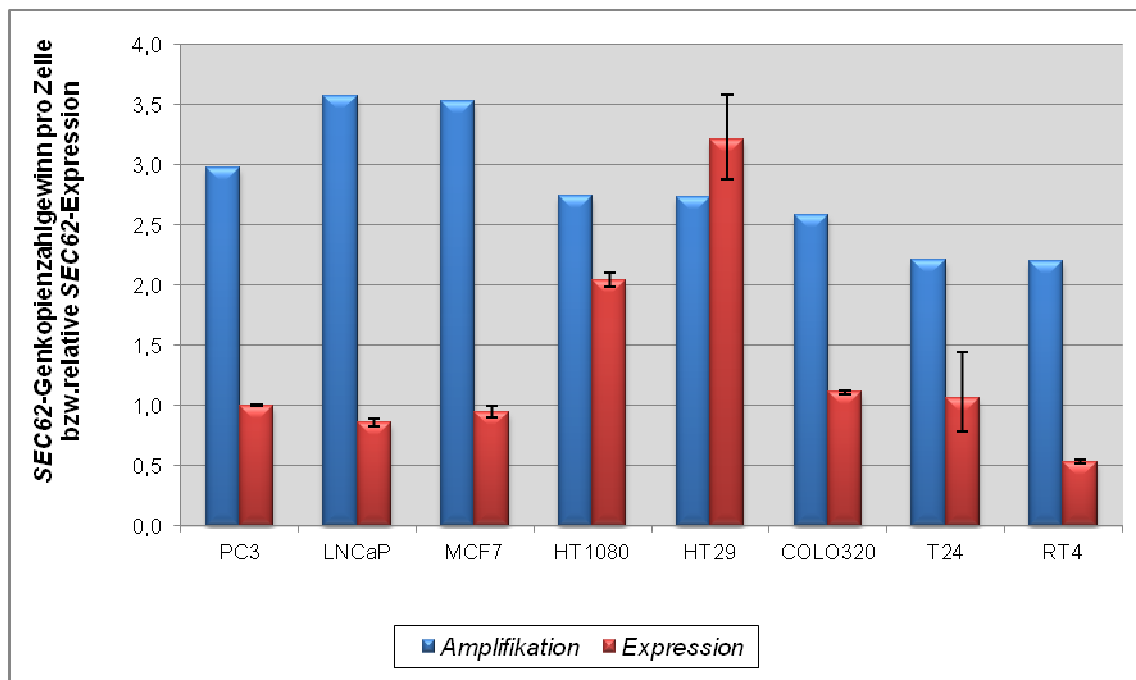


Abb. 8: Vergleich der *SEC62*-Amplifikation mit der Expression in verschiedenen Karzinomzelllinien. Für die Ermittlung der *SEC62*-Amplifikation wurde die Gesamtzahl der *SEC62*-Signale durch die Gesamtzahl der untersuchten Tumorzellkerne ($n=200$) geteilt (siehe Tabelle 23). Die Quantifizierung der mRNA wurde in einer RT-PCR mithilfe des HT7900 von Applied Biosystems und TaqMan® Genexpressionassays durchgeführt (siehe 2.2.3.9). Dargestellt ist die relative Menge an *SEC62*. Die Normierung erfolgte auf PC3-Zellen. Die Standardabweichung wurde aus dem Mittelwert der relativen Menge an *SEC62* ($n=3$) berechnet.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse veranschaulichen, dass andere Regulationsmechanismen wie z.B. epigenetische Mechanismen, Transkriptionsfaktoren, posttranslationale Modifikationen oder unterschiedliche miRNA-Expressionsprofile, für die vermehrte *SEC62*-Expression verantwortlich sein können und diese daher nicht auf den vermehrten DNA-Gehalt zurückzuführen ist.

3.3 Mutationsanalysen

Mutationen in Genen können zu einer Funktionsänderung des Genproduktes oder aber zum Funktionsverlust führen. Aufgrund dessen wurde untersucht, ob in Prostatakarzinomzelllinien Mutationen im *SEC62*-Gen vorliegen und diese für die Funktionsänderung in Karzinomen verantwortlich sind. Dazu wurde die kodierende DNA-Sequenz des *SEC62*-Gens in den Zelllinien DU145, LNCaP und PC3 sowie DNA aus Lymphozyten von zwei gesunden Probanden analysiert. Das auf Chromosom 3q26.2 lokalisierte *SEC62*-Gen besteht aus 8 Exonsequenzen, die ein aus 399 Aminosäuren bestehendes Protein kodieren.

Für die Untersuchung wurden die Exonsequenzen mittels spezifischer Primer durch PCR-Technik amplifiziert und sequenziert.

Bei der Auswertung der erhaltenen Sequenzen zeigten sich keine Mutationen in den Exonsequenzen der untersuchten Prostatakarzinomzelllinien im Vergleich zu den gesunden Probanden. Beim zusätzlichen Abgleich der Sequenzierungen mit den Sequenzen der Datenbank Ensemble Genome Browser wurden ebenfalls keine Unterschiede gefunden (siehe Beispiel Abb. 9). Durch das Fehlen von Mutationen im *SEC62*-Gen konnte gezeigt werden, dass andere Faktoren eine Rolle bei der Tumorgenese von Prostatakarzinomzelllinien spielen müssen.

Original	<pre> TGATTGCAGTAATAGCGGCCACCCTCTTCCCCCTTTGGCCAGCAGAAATGAGAGTAGGTG </pre>
Sequenzierung	<pre> TGATTGCAGTAATAGCGGCCACCCTCTTCCCCCTTTGGCCAGCAGAAATGAGAGTAGGTG </pre>
Original	<pre> TTTATTACCTCAGTGTGGGTGCAGGCTGTTTTGTAGCCAGTATTCTTCTCCTTGCTGTTG </pre>
Sequenzierung	<pre> TTTATTACCTCAGTGTGGGTGCAGGCTGTTTTGTAGCCAGTATTCTTCTCCTTGCTGTTG </pre>

Abb. 9: Beispiel eines Sequenzvergleiches von Exon 7. Vergleich der Exon 7 Sequenz aus der Datenbank (Datenbank Ensemble Genome Browser) mit der Sequenz aus der DNA-Sequenzierung von DU145. Der Sequenzvergleich wurde mit der Datenbank BLAST2 durchgeführt <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.

3.4 Immunhistochemische Sec62-Färbung an einem Multi-Tumor-Gewebearray

Ziel dieser Untersuchung war es, zu überprüfen, ob die tumorassoziierte Zunahme des Sec62-Proteingehalt nur für das Prostatakarzinom charakteristisch ist oder ob dieses Phänomen auch in anderen Tumoren vorliegt (siehe 2.2.4.3). Benutzt wurde hierfür ein Multi-Tumor-Gewebearray aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Basel (Schweiz). Der Gewebearray beinhaltet 2107 Gewebeprobe, die sich in 1975 Primärtumorspots aus 55 verschiedenen Tumorentitäten und deren Subtypen und 132 Proben aus Normalgeweben unterteilen. Insgesamt konnte in 1491 Gewebeslots (71%) Sec62 nachgewiesen werden. Die Tabellen 24 bis 30 zeigen eine Zusammenfassung der Auswertung. Als Sec62-positiv definiert wurden Gewebe, die eine geringe bis starke Färbung aufwiesen. Ungefärbtes Gewebe wurden als Sec62-negativ erklärt.

Die vielversprechendsten Befunde zeigten sich beim „Screening“ der Lungen- und Schilddrüsengewebe. In 93% bis 97% aller Lungentumorsubtypen konnte Sec62 nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde im Normalgewebe der Lunge kein Sec62-Signal detektiert (siehe Tab. 24 und Abb. 10).

Tab. 24: Sec62-Proteingehalt in normalem und neoplastischem Gewebe des respiratorischen Traktes

Gewebe	Proben (total)	Sec62 Positiv	Total Positive (%)
(n = 6)	n = 222	n= 192	insgesamt 86
Lunge, kleinzelliges Karzinom	42	39	93
Lunge, Plattenepithelkarzinom	43	41	95
Lunge, großzelliges Karzinom	24	23	96
Lunge, Adenokarzinom	78	76	97
Malignes Mesotheliom	25	13	52
Lunge, Normalgewebe	10	0	0

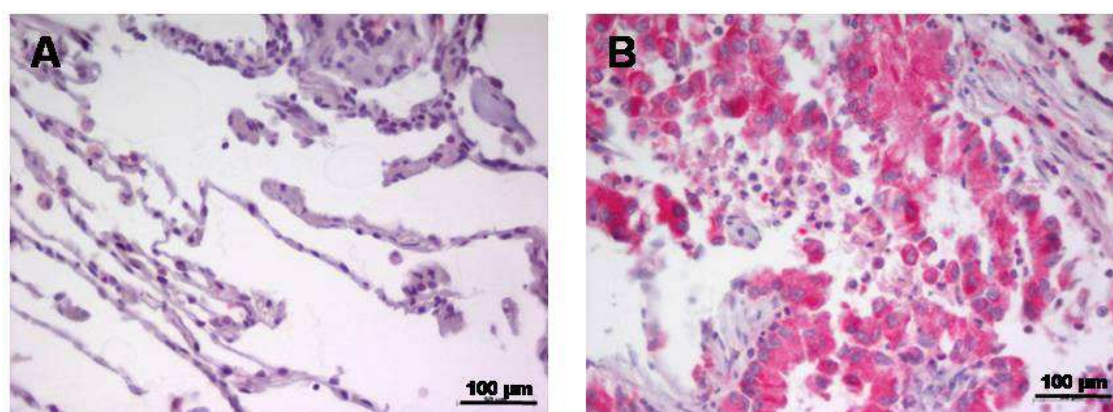
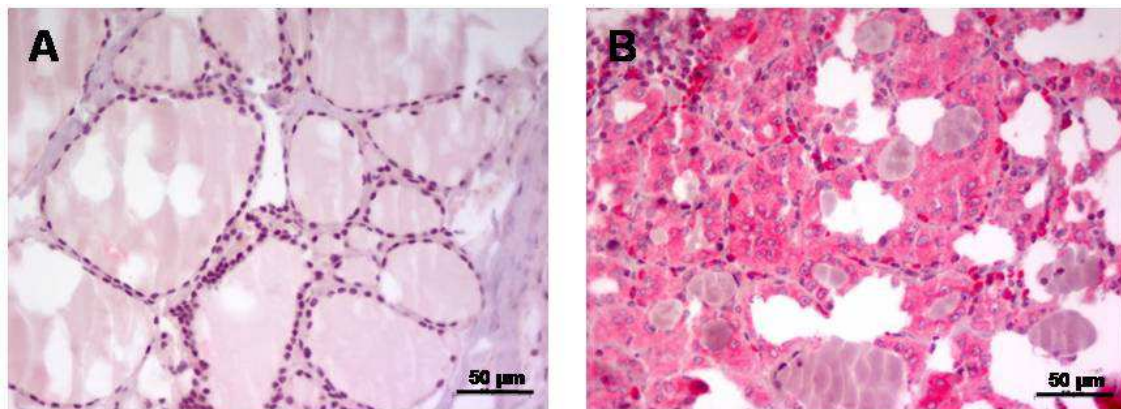


Abb. 10: Immunhistochemische Färbung von Sec62 in Tumorgewebe und Normalgewebe der Lunge. **A** keine Sec62 Färbung im Lungennormalgewebe **B** starke Sec62-Färbung (rot) im Lungenkarzinom. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blaue Kerne). Vergrößerung 400-fach.

Ebenso waren 100% der papillären Karzinome und 87% der follikulären Karzinome der Schilddrüse Sec62 positiv, während nur 14% der Schilddrüsennormalgewebe Sec62 positive Zellen aufzeigten (siehe Tab. 25 und Abb. 11). In beiden Fällen besteht die Möglichkeit der Verwendung von Sec62 als diagnostischer Marker, wobei es zur Abklärung noch weiterer Untersuchungen bedarf.

Tab. 25: Sec62-Proteingehalt in normalem und neoplastischem neuroendokrinem Gewebe

Gewebe	Proben (total)	Sec62 Positiv	Total Positive (%)
(n = 8)	n = 204	n= 143	70
Schilddrüse, Adenom	27	5	19
Schilddrüse, follikuläres Karzinom	47	41	87
Schilddrüse, papilläres Karzinom	28	28	100
Schilddrüse, Normalgewebe	14	2	14
Nebenschilddrüse, Adenom	36	24	67
Nebenschilddrüse, Normalgewebe	2	2	100
Karzinoid	36	28	78
Nebenniere, Adenom	14	13	93

**Abb. 11:** Immunhistochemische Färbung von Sec62 in Tumorgewebe und Normalgewebe der Schilddrüse. **A** keine Detektion von Sec62 im Normalgewebe der Schilddrüse **B** Nachweis von Sec62 im Karzinom der Schilddrüse (Rotfärbung). Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blaue Kerne). Vergrößerung 400-fach.

Tab. 26: Sec62-Proteingehalt in normalem und neoplastischem Gewebe des Urogenitaltraktes

Gewebe	Proben (total)	Sec62 Positiv	Total Positive (%)
(n = 14)	n = 423	n= 256	61
Prostatakarzinom, unbehandelt	35	17	49
Prostatakarzinom, hormonrefraktär	38	22	58
Prostata, Normalgewebe	14	7	50
Hoden, Seminom	48	0	0
Hoden, Nichtseminom	41	0	0
Hoden, Normalgewebe	17	15	88
Niere, chromophobes Karzinom	11	8	73
Niere, papilläres Karzinom	34	24	71
Niere, klarzelliges Karzinom	57	38	67
Niere, Onkozytom	22	20	91
Niere, Normalgewebe	5	5	100
Harnblase, TCC nicht invasiv (pTa)	35	35	100
Harnblase, TCC invasiv (pT2-4)	65	64	98
Harnblase, Normalgewebe	1	1	100

Die Untersuchungen der Prostatakarzinomgewebe konnten die Ergebnisse unserer Kooperationspartner aus der AG Grobholz (Institut für Pathologie, Uniklinik des Saarlandes) bestätigen (Greiner et al., 2011a). Auch in dieser Untersuchung wiesen ca. 50% der Prostatakarzinomgewebe (49% der unbehandelten Prostatakarzinome und 58% der hormonrefraktären Prostatakarzinome) eine Sec62-Färbung auf, wobei der Nachweis von Sec62 ebenfalls in 50% der Normalgewebesparts der Prostata gezeigt werden konnte (siehe Tab. 26 und Abb. 12).

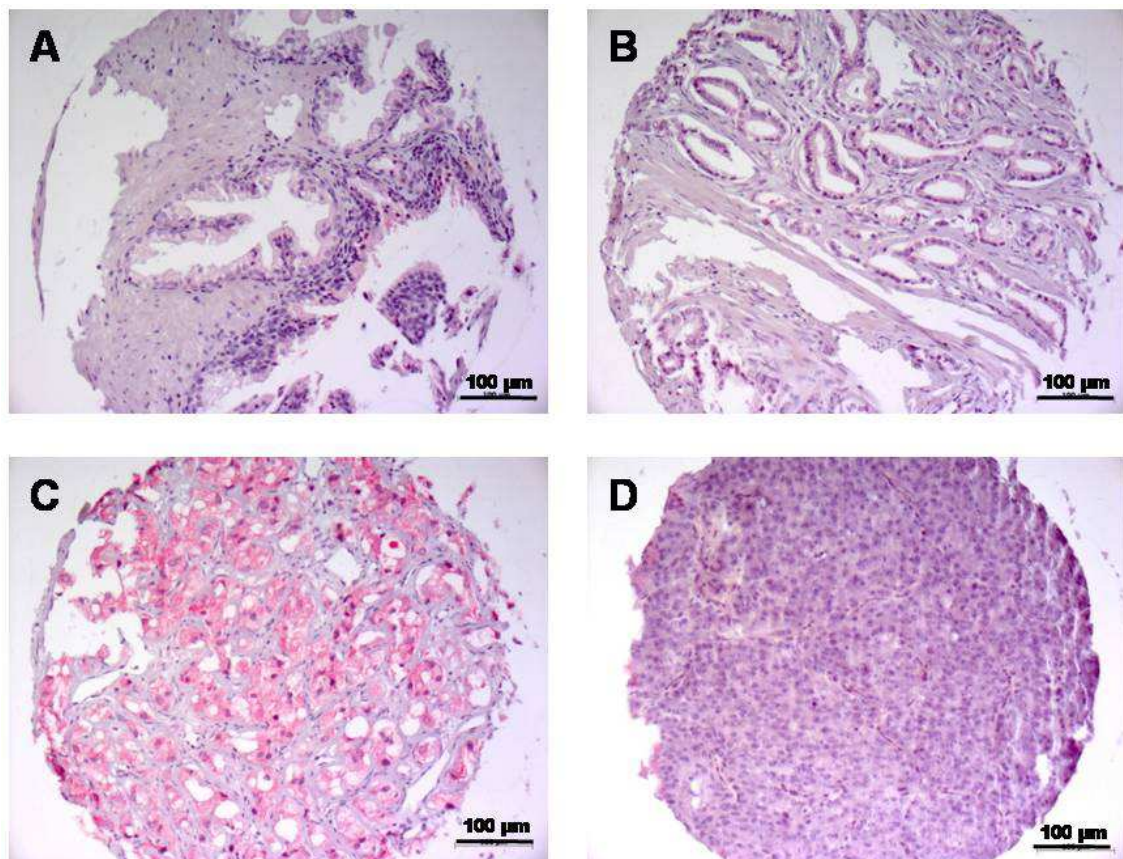


Abb. 12: Immunohistochemische Detektion von Sec62 in Karzinom- und Normalgewebe der Prostata. **A** schwache Färbung im Normalgewebe der Prostata. **B** schwache Sec62-Färbung im unbehandelten Prostatakarzinomgewebe **C** starke Sec62-Färbung im hormonrefraktären Prostatakarzinomgewebe **D** negative Sec62-Färbung im hormonrefraktären Prostatakarzinomgewebe. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blaue Kerne). Vergrößerung 100-fach.

Ein diagnostisches Potential von Sec62 zeigt sich ebenfalls bei der Unterscheidung von Pankreasnormal- und Tumorgewebe. Hier wird jedoch zum Lungengewebe ein gegensätzliches Sec62-Verteilungsmuster gefunden, indem 9% der Pankreastumore und 88% der korrespondierenden Normalgewebe Sec62-Signale aufweisen (siehe Tab. 27 und Abb. 13).

Tab. 27: Sec62-Proteingehalt in normalem und neoplastischem Gewebe des Verdauungstraktes

Gewebe	Proben (total)	Sec62 Positiv	Total Positive (%)
(n = 19)	n = 603	n= 390	65%
Speicheldrüse, pleomorphes Adenom	44	2	5
Speicheldrüse, Zylindrom	29	2	7
Speicheldrüse, Adenolymphom	22	2	9
Ösophagus, Adenokarzinom	8	1	13
Ösophagus, Plattenepithelkarzinom	36	11	31
Ösophagus, kleinzelliges Karzinom	1	0	0
Magen, diffuses Adenokarzinom	7	7	100
Magen, Normalgewebe	4	4	100
Pankreas, Adenokarzinom	43	4	9
Pankreas, Normalgewebe	8	7	88
Gallenblase, Adenokarzinom	44	20	45
Gallenblase, Normalgewebe	5	0	0
Dünndarm Karzinom	62	57	92
Dünndarm, Adenokarzinom	18	18	100
Dünndarm, Normalgewebe	4	4	100
Hepatozelluläres Karzinom	83	74	89
Leber, Normalgewebe	16	16	95
Kolon, Adenokarzinom	165	157	95
Kolon, Normalgewebe	4	4	100

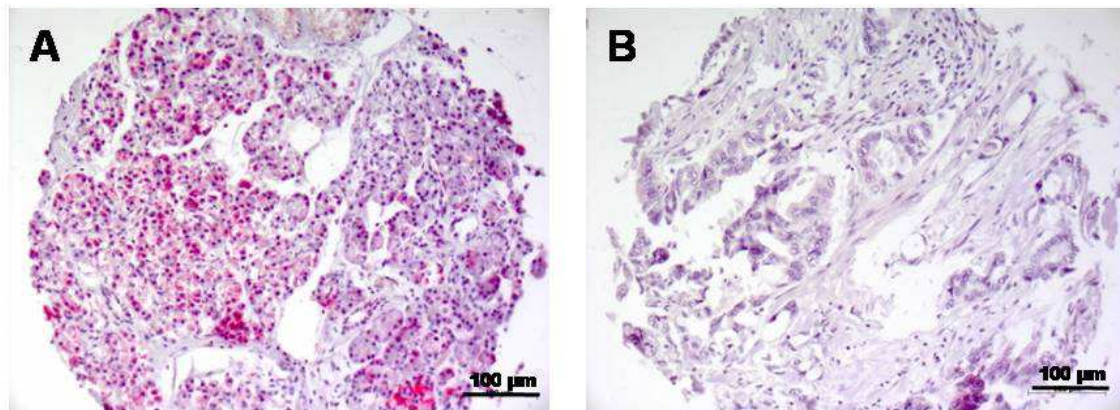


Abb. 13: Immunhistochemische Detektion von Sec62 in Karzinom- und Normalgewebe des Pankreas. **A** starke Sec62-Färbung im Normalgewebe des Pankreas **B** kein Nachweis von Sec62 im Karzinom des Pankreas. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blaue Kerne). Vergrößerung 100-fach.

Eine ähnliche Verteilung zeigte sich im Hodengewebe. Hier erfolgte kein Nachweis von Sec62, weder in den untersuchten Seminomen noch in den Nicht-Seminomen, während in 88% der Normalgewebe Sec62 detektiert wurde (siehe Tab. 26 und Abb. 14).

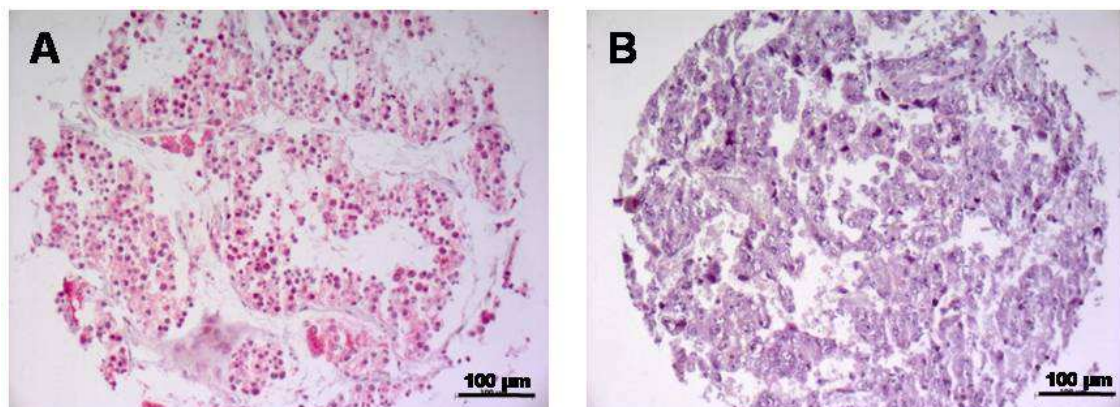


Abb. 14: Immunhistochemische Detektion von Sec62 in Karzinom- und Normalgewebe des Hodens. **A** starke Färbung von Sec62 im Normalgewebe des Hodens **B** kein Nachweis von Sec62 im Hodenkarzinom. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blaue Kerne). Vergrößerung 100-fach.

Tab. 28: Sec62-Proteingehalt in normalem und neoplastischem neuronalem Gewebe

Gewebe	Proben (total)	Sec62 Positiv	Total Positive (%)
(n = 7)	n = 192	n= 173	90
Oligodendrogliom	18	18	100
Astrozytom	38	36	95
multiformes Glioblastom	33	27	82
Meningiom	45	45	100
Schwanom	38	33	87
Weißer Substanz, Normalgewebe	5	5	100
Graue Substanz, Normalgewebe	15	9	60

Die weitere Auswertung der Gewebe des Multi-Tumorarrays (siehe Tab. 25 bis 30) lieferte, sowohl bei den urologischen Tumoren (Prostatakarzinom, Harnblasenkarzinom und Nierenzelltumore), als auch bei gynäkologischen Tumoren (Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und Zervixkarzinom) keinen Hinweis auf eine mögliche Eignung des Antikörpers für die klinische Anwendung. Darüber hinaus eignet sich Sec62 ebenfalls nicht als Marker bei den untersuchten Weichgewebetumoren, den neuronalen Tumoren und bei Tumoren des Verdauungstraktes.

Tab. 29: Sec62-Proteingehalt in normalem und neoplastischem Weichgewebe

Gewebe	Proben (total)	Sec62 Positiv	Total Positive (%)
(n = 6)	n = 145	n= 88	61
Liposarkom	19	6	32
Benignes Histozytom	14	8	57
Malignes fibröses Histozytom	24	21	88
Leiomyosarkom	41	39	95
Sehnenbogen, Riesenzelltumor	27	0	0
Kaposi Sarkom	20	14	70

Tab. 30: Sec62-Proteingehalt in normalem und neoplastischem gynäkologischem Gewebe

Gewebe	Proben (total)	Sec62 Positiv	Total Positive (%)
(n = 13)	n = 318	n= 249	78
Brustkrebs, lobuläres Karzinom	26	8	31
Brustkrebs, tubuläres Karzinom	10	7	70
Brustkrebs, duktales Karzinom	36	32	89
Brustkrebs, medulläres Karzinom	53	47	89
Brust, Normalgewebe	1	0	0
Ovarialkarzinom, endometrioid	34	32	94
Ovarialkarzinom, muzinös	15	10	67
Ovarialkarzinom, serös	40	30	75
Ovar, Normalgewebe	4	3	75
Vulva, Plattenepithelkarzinom	20	9	45
Endometrium, Karzinom	47	39	83
Endometrium, seröses Karzinom	29	29	100
Endometrium, Normalgewebe	3	3	100

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Sec62 zwar nicht beim Prostatakarzinom als klinischer Marker in der Diagnostik eingesetzt werden kann, jedoch bei anderen Tumorentitäten wie Lunge, Schilddrüse, Hoden und Pankreas.

3.5 Untersuchung zum Einfluss von ER-Stress auf den Sec62-Proteingehalt in Prostatakarzinomzelllinien

Da 50% der untersuchten Gewebe von Prostatakarzinompatienten einen erhöhten Sec62-Proteingehalt aufzeigen (Greiner et al., 2011a) stellt sich die Frage, wodurch oder warum es in Prostatakarzinomgeweben, die keine Amplifikation von *SEC62* aufzeigen, zu einer veränderten *SEC62*-Expression kommt. Um der Fragestellung nachzugehen, wurde untersucht ob das ER-Membranprotein Sec62 infolge von ER-Stress vermehrt synthetisiert wird, wie dies für einige ER-Proteine (z.B. BiP/GRP78 und GRP170) gezeigt ist.

Die Induktion von ER-Stress in den Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC3 (Hautfibroblasten (HDF), als Nicht-Tumor-Kontrolle) erfolgte mittels zwei unterschiedlicher Substanzen, Thapsigargin und Tunicamycin. Der Stressor Thapsigargin

ist ein Inhibitor der sarko-/endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Durch die Aktivität der SERCA-Pumpe wird ein für die Faltung von Proteinen notwendiger Ca^{2+} -Gradient zwischen dem ER-Lumen und dem Zytosol aufrecht erhalten. Sie pumpt Kalzium aus dem Zytosol ins ER (Thastrup et al., 1990). Durch Inhibition der SERCA-Pumpe wird die Wiederaufnahme von Kalzium ins ER verhindert. Dies führt zur Speicherentleerung, wodurch es zur Aktivierung der UPR kommt. Der Mechanismus der UPR-Aktivierung dient der Wiederherstellung physiologischer Bedingungen (Szegezdi et al., 2006). Der zweite Stressinduktor Tunicamycin ist ein Antibiotikum, das die N-Glykosylierung von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum inhibiert. Dies führt zu einer fehlerhaften Faltung von Glykoproteinen. Es kommt zur Akkumulation missgefalteter Proteine, wodurch ebenfalls die UPR aktiviert wird.

Zur Auswertung des Versuches wurde die Proteinsynthese von Sec62 mittels Western Blot untersucht. Als Kontrolle der UPR-Induktion diente der quantitative Nachweis von BiP/GRP78. Zur Induktion von ER-Stress wurden die Zellen ausgesät, nach 24 h die Stressoren Thapsigargin ($1 \mu\text{M}$) bzw. Tunicamycin ($4 \mu\text{g/ml}$) den Zellen zugegeben und für 48 h weiterkultiviert. Unbehandelte Zellen dienten in dieser Untersuchung als Kontrolle.

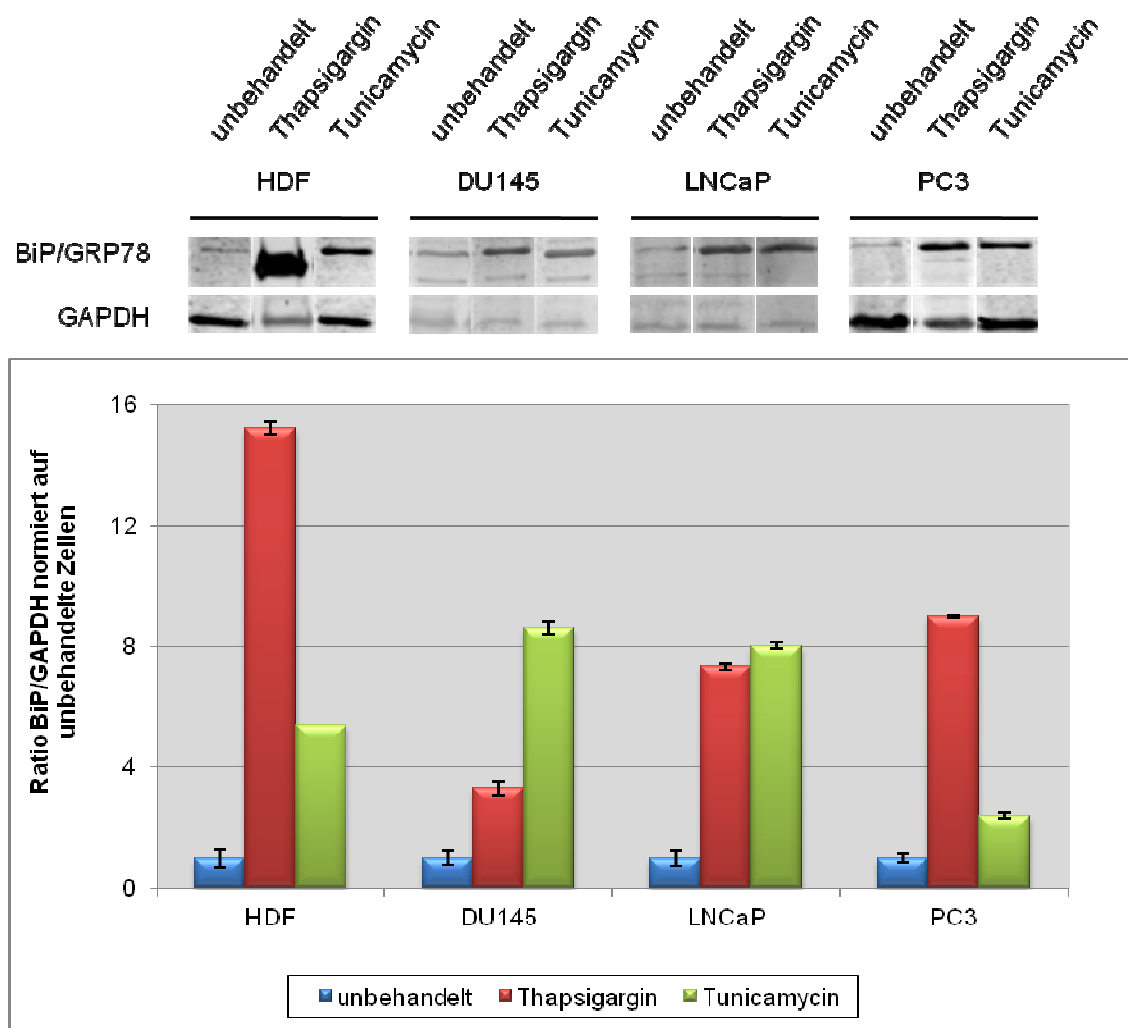


Abb. 15: Quantitativer Nachweis von BiP/GRP78 nach Tunicamycin- und Thapsigargin Behandlung in Prostatakarzinomzelllinien und Hautfibroblasten. Die Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC3 sowie HDF (als Kontrolle) wurden wie unter 2.2.2.7 beschrieben für 48 h jeweils mit Tunicamycin (4 µg/ml) bzw. Thapsigargin (1 µM) behandelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittels Western Blot (siehe 2.2.4.1) wurde die Proteinmenge von BiP/GRP78 und GAPDH (Ladekontrolle) quantifiziert, die Ratio von BiP/GRP78 gegen GAPDH berechnet und auf unbehandelte Zellen normiert. Pro Ansatz und Experiment wurden Triplikate durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6) für HDF, DU145 und PC3 sowie aus 3 Experimenten für LNCaP mit der jeweilig ermittelten Standardabweichung.

Aufgrund der ER-Stressinduktion durch Tunicamycin und Thapsigargin kommt es in allen untersuchten Zelllinien zu einer Erhöhung der BiP/GRP78-Proteinmenge (siehe Abb. 15). Dies verdeutlicht, dass in allen Zelllinien durch ER-Stress der UPR-Signalweg aktiviert wird und dabei vermehrt UPR-Proteine synthetisiert werden. Ein interessantes Phänomen beobachtet man bei DU145-Zellen, die einen erhöhten Sec62-Proteingehalt aufweisen. Hier zeigt sich ein geringerer BiP/GRP78-Proteinlevel nach Thapsigargin

induziertem Stress gegenüber den anderen Zelllinien. In PC3-Zellen hingegen wird eine geringere UPR-Antwort nach Tunicamycin Behandlung gefunden.

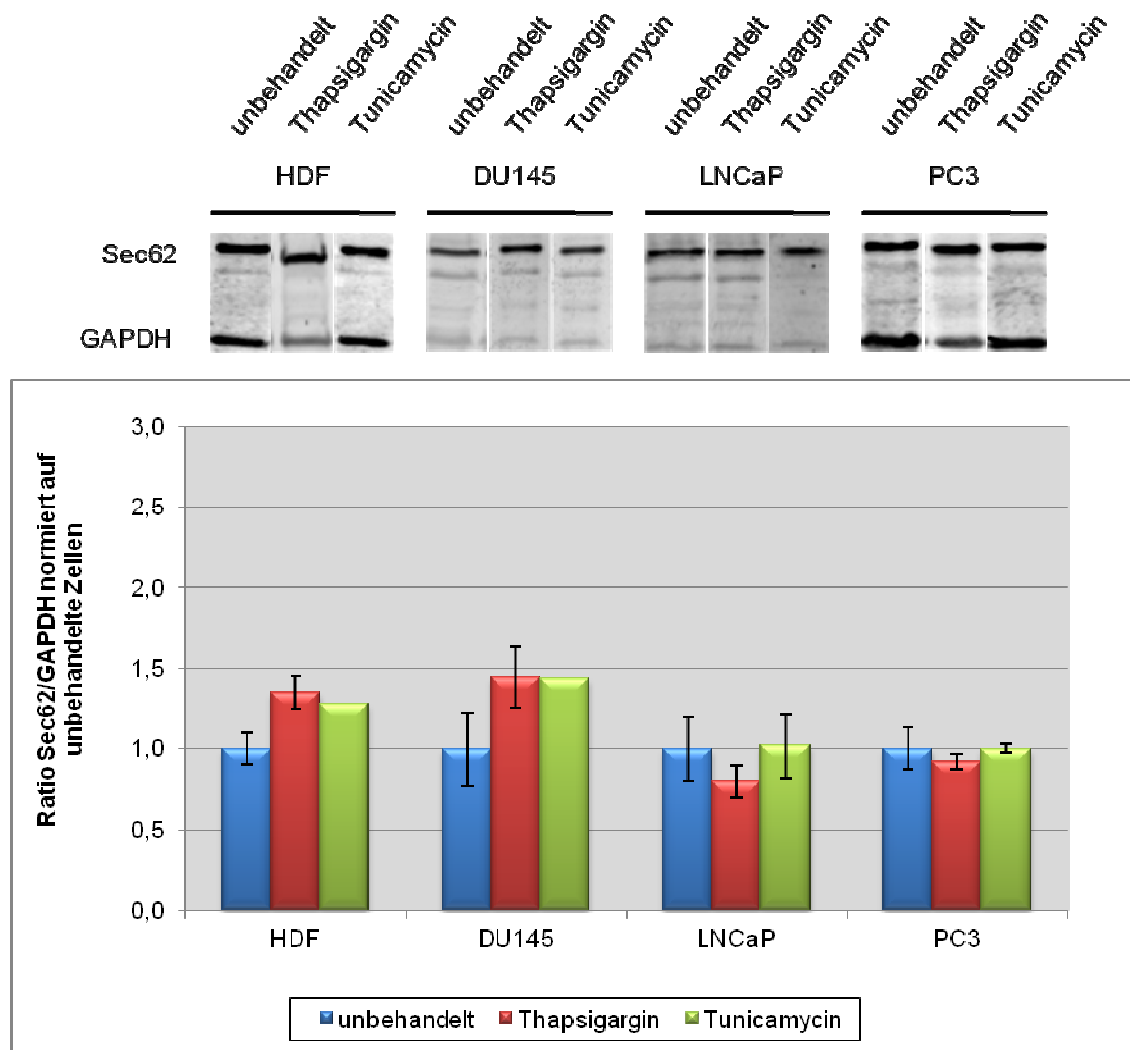


Abb. 16: Quantifizierung der Sec62-Proteinmenge nach ER-Stressinduktion in Prostatakarzinomzelllinien und Hautfibroblasten. Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC3 sowie HDF wurden wie unter 2.2.2.7 beschrieben für 48 h jeweils mit Tunicamycin TN (4 μ g/ml) bzw. Thapsigargin TG (1 μ M) behandelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittels Western Blot (siehe 2.2.4.1) wurde die Proteinmenge von Sec62 und GAPDH (Ladekontrolle) quantifiziert, die Ratio von Sec62 gegen GAPDH berechnet und auf unbehandelte Zellen normiert. Pro Ansatz und Experiment wurden Triplikate durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten ($n=6$) für HDF, DU145 und PC3 sowie aus 3 Experimenten für LNCaP mit der jeweilig ermittelten Standardabweichung.

Der Sec62-Proteingehalt unter ER-Stressbedingungen ist in Abbildung 16 dargestellt. Eine Behandlung mit Tunicamycin und Thapsigargin führt in der Hautfibroblastenzelllinie HDF und der Prostatakarzinomzelllinie DU145 zu einer leichten Erhöhung des Sec62-Proteingehaltes, nicht aber in LNCaP und PC3. Es kann jedoch nicht nachge-

wiesen werden, dass Sec62 in den untersuchten Tumorzelllinien durch die Behandlung mit beiden Stressoren stark hochreguliert wird, wie dies für BiP/GRP78 gezeigt werden konnte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ER-Stress nicht für den vermehrten Sec62-Proteingehalt in Prostatakarzinomgeweben verantwortlich ist.

3.6 Induktion von Apoptose durch ER-Stressoren

2006 konnte Jung et al. nachweisen, dass 100% der untersuchten Prostatakarzinomgewebe einen erhöhten *SEC62*-mRNA-Gehalt aufweisen (Jung et al., 2006). In späteren Studien von Greiner et al. 2011 wurde in 50% der Prostatakarzinompatienten ein vermehrter Sec62-Proteingehalt gefunden (Greiner et al., 2011a). Aus diesem Grund ist es wichtig zu wissen, welche Auswirkungen diese erhöhte *SEC62*-Expression bzw. Sec62-Proteinmenge auf eine mögliche Anti-Tumor-Therapie hat. Da Thapsigargin in der Literatur als potentiell Therapeutikum für das Prostatakarzinom diskutiert wird, wurde überprüft, wie Prostatakarzinomzellen mit unterschiedlichen *SEC62*-mRNA- bzw. Sec62-Proteingehalten auf ein solches Therapeutikum reagieren. Dabei galt DU145 als Beispiel für eine Prostatakarzinomzelllinie mit einer 4,8-Fachen *SEC62*-Überexpression (bzw. 2-Fachen Proteinmenge (Greiner et al., 2011b)), PC3 und LNCaP dienten als Modell für eine geringe (1-fach) *SEC62*-Expression (bzw. 1-Fache Proteinmenge (Greiner et al., 2011b)), wobei letztere in die Analyse mit einbezogen wurde, um die Effekte auf hormonabhängige Zelllinien zu untersuchen (siehe Abb. 17). Tunicamycin wurde eingesetzt als ein Kontrollstressor, der nicht die Ca^{2+} -Homöostase beeinflusst.

Für die Analyse wurden die Zellen in 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und nach 24 h mit den ER-Stressoren Tunicamycin und Thapsigargin in unterschiedlichen Konzentrationen für 48 h inkubiert. Die Auswertung des Apoptoseassays (siehe 2.2.2.2) erfolgte durch die Berechnung des „enrichment factor“. Der Faktor gibt das Verhältnis der Absorption zwischen behandelten Zellen und unbehandelten Zellen an. Somit kann eine Aussage über die spezifische Anreicherung von Mono- und Oligonukleosomen, die ins Zytoplasma apoptotischer Zellen freigesetzt werden, getroffen werden.

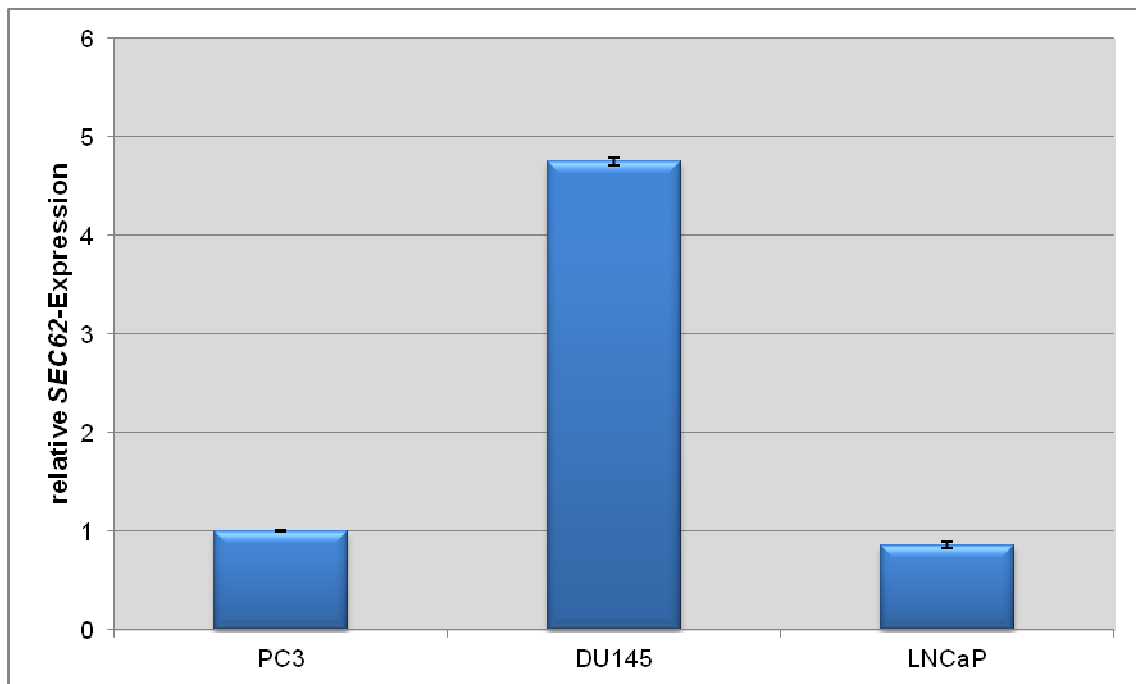


Abb. 17: Expression von *SEC62* auf mRNA-Ebene in Prostatakarzinomzelllinien. Die Quantifizierung der mRNA wurde in einer RT-PCR mithilfe des HT7900 von Applied Biosystems und TaqMan® Genexpressionassays durchgeführt (siehe 2.2.3.9). Dargestellt ist die relative Menge an *SEC62*. Die Normierung erfolgte auf PC3-Zellen. Die Standardabweichung wurde aus dem Mittelwert der relativen Menge an *SEC62* (n=3) berechnet.

Das Ergebnis des Apoptoseassays ist in Abbildung 18 dargestellt. Durch die Behandlung mit Tunicamycin wurde in PC3-Zellen (EN-Faktor 2,2 bis 2,9) und DU145-Zellen (EN-Faktor 3,1 bis 5) konzentrationsabhängig Apoptose induziert. Dabei gingen deutlich weniger PC3-Zellen in Apoptose als DU145-Zellen. Indessen zeigen LNCaP-Zellen bei einer Behandlung mit Tunicamycin keine Apoptose (EN-Faktor 1). Im Gegensatz dazu weisen die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3, die wenig *SEC62* exprimieren, nach Thapsigarginbehandlung eine starke Apoptoseinduktion (LNCaP (EN-Faktor 6,1 bis 6,4) und PC3-Zellen (EN-Faktor 5,6 bis 7,5)) auf, während man interessanterweise in DU145-Zellen, die eine vermehrte *SEC62*-Expression aufzeigen, eine konstant niedrige Apoptoseinduktion (EN-Faktor 2,4 bis 2,6) findet. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von *SEC62* in Zellen zu einem protektiven Effekt vor Thapsigargin induzierter Apoptose führt.

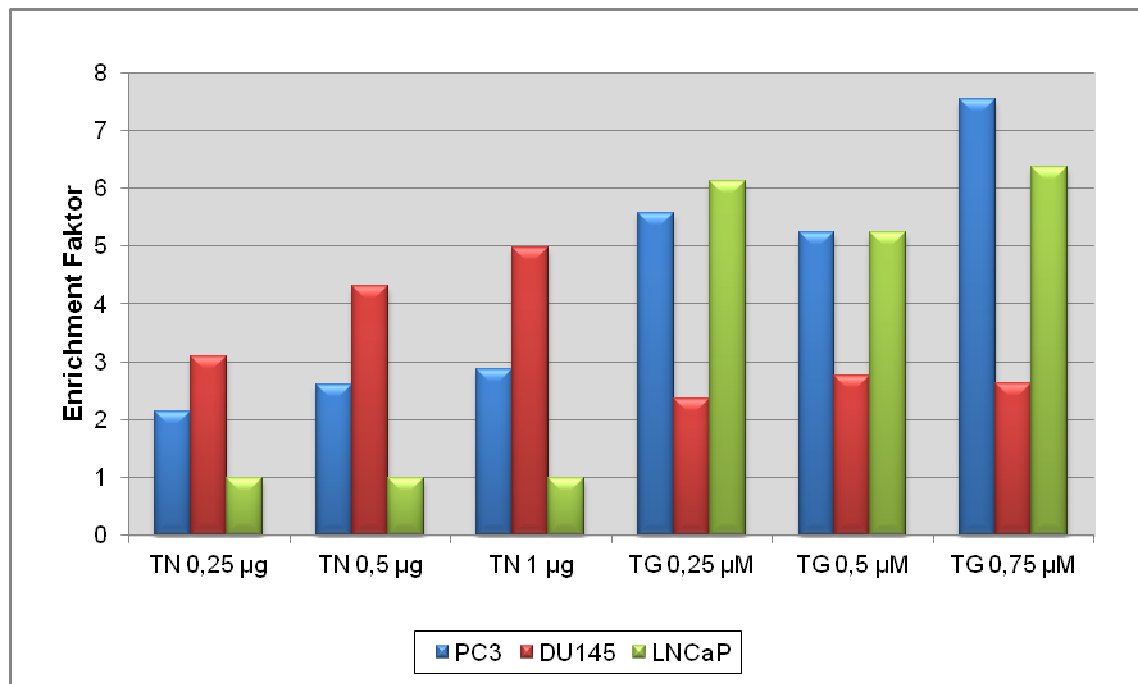


Abb. 18: ER-Stress induzierte Apoptose in Prostatakarzinomzelllinien. Der Apoptosenachweis erfolgte mittels Cell Death Detection ELISA (siehe 2.2.2.2). 1×10^4 Zellen wurden in 96 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h kultiviert. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von Tunicamycin TN (0,25 bis 1 µg/ml) und Thapsigargin TG (0,25 bis 0,75 µM). Die Auswertung erfolgte nach 48 h. Alle Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt. Dargestellt ist der „enrichment factor“ der untersuchten Zelllinien nach Behandlung.

3.7 siRNA vermittelte Depletion von *SEC62*

3.7.1 Einfluss von *SEC62* auf das Proteom von PC3-Zellen

Um aufzuklären welche Rolle Sec62 in der ER-Stressantwort spielt, wurden die Proteome von *SEC62* siRNA transfizierten PC3-Zellen mit Kontroll siRNA transfizierten PC3-Zellen (siehe 2.2.2.5) durch Anwendung der 2D-DIGE Technik (siehe 2.2.4.2) miteinander verglichen. Es wurde untersucht, welche zellulären Prozesse durch *SEC62*-„knock down“ in der Prostatakarzinomzelllinie beeinträchtigt sind. Zwei unabhängige Experimente gingen in die Auswertung mit ein. Die Normalisierung erfolgte über einen sogenannten internen Standard. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Experimente wurden zusätzlich die Proteome der unabhängigen Transfektionsexperimente, d.h. die Proteome der *SEC62* siRNA transfizierten Zellen bzw. die Proteome der Kontroll siRNA transfizierten Zellen, miteinander verglichen. Beim Vergleich der Proteome sollten nur geringe Unterschiede gefunden werden. Exemplarisch ist in Abbildung 19 das Kontrollgel

der beiden Kontroll siRNA transfizierten Proben aus unabhängigen Experimenten dargestellt.

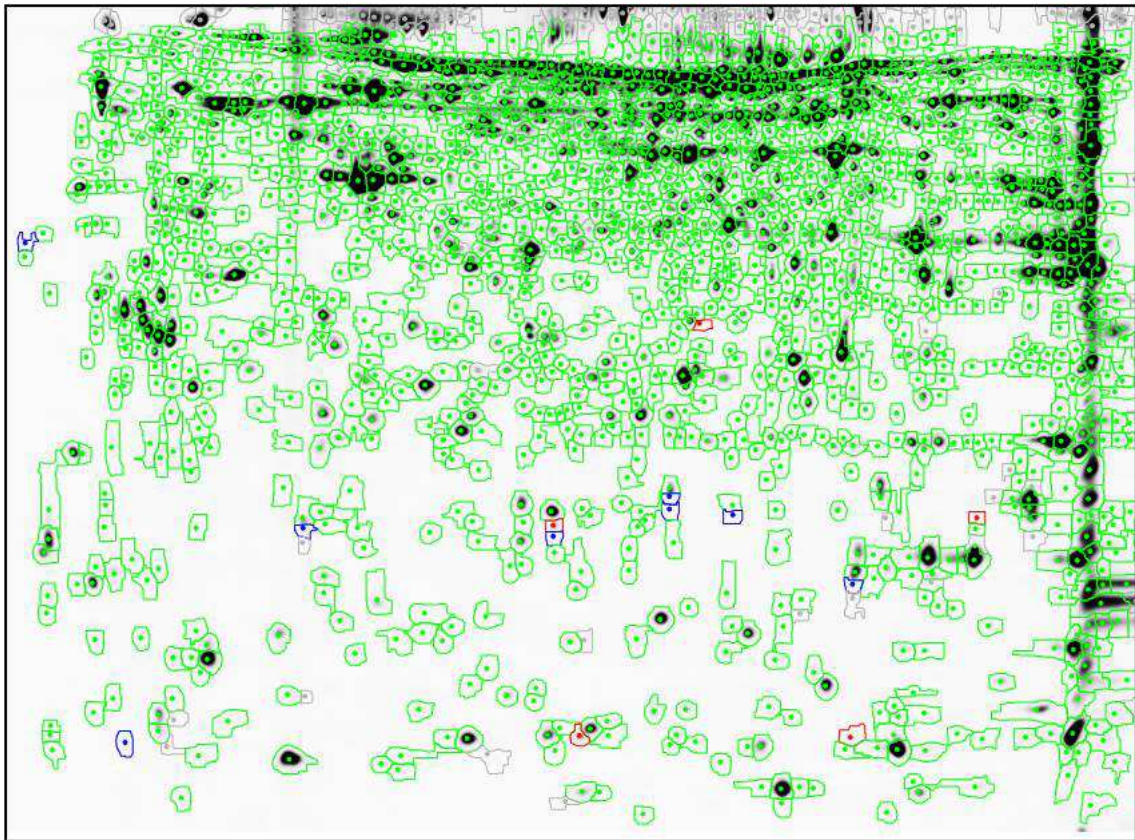


Abb. 19: Vergleich des Proteoms von zwei Kontroll siRNA transfizierten Proben aus unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist ein Kontrollgel. In zwei unabhängigen Experimenten wurden PC3-Zellen mit Kontroll siRNA transfiziert (siehe 2.2.2.5) und ihre Proteinlevel durch DIGE-Analyse (siehe 2.2.4.2) miteinander verglichen. Die Analyse der Gele mit der Decyder Software zeigt grüne Spots mit gleicher Proteinmenge, blau markierte mit einer höheren Proteinkonzentration nach *SEC62*-„knock down“ und rote Spots mit einer verringerten Menge. Spots mit grauer Markierung gingen nicht in die Auswertung mit ein.

Als reguliert wurden Spots betrachtet, deren Proteingehalt, in den zu vergleichenden Proben, sich um mindestens das 1,5-Fache unterschied. Im Kontrollgel wurden 1702 Spots (99,2%) mit gleicher Proteinmenge, 5 Spots (0,3%) mit reduzierter Proteinmenge und 8 Spots (0,5%) mit erhöhter Proteinmenge detektiert. Der Vergleich der Proteome von *SEC62* depletierten Zellen zeigte ebenfalls eine geringe Spotanzahl mit unterschiedlicher Proteinmenge. Aufgrund dessen, dass nur wenige Unterschiede in den Kontrolleexperimenten detektierbar sind, kann schließlich die Aussage getroffen werden, dass die Experimente untereinander reproduzierbar sind.

Zum Vergleich der Proteome der *SEC62*-„knock down“ Zellen mit den Kontrollzellen wurden unmarkierte Proben der beiden Experimente und ein geringer Teil markierter Proben gepoolt und analysiert. In Abbildung 20 ist die Auswertung des DIGE-Gels mit der Decyder Software dargestellt.

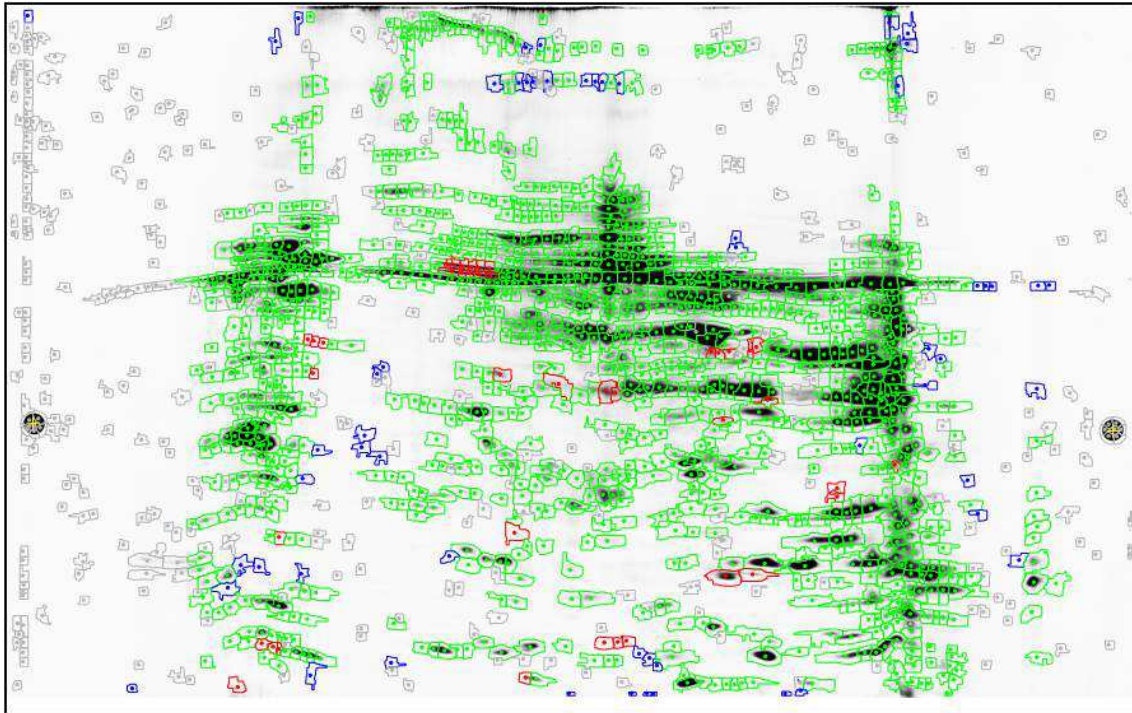


Abb. 20: Vergleich der Proteome *SEC62* depletierter PC3-Zellen mit Kontroll siRNA transfizierten PC3-Zellen. PC3-Zellen wurden mit *SEC62* UTR siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert (siehe 2.2.2.5) und ihre Proteome durch DIGE-Analyse (siehe 2.2.4.2) miteinander verglichen. Die Analyse der Gele mit der Decyder Software zeigt grüne Spots mit gleicher Proteinkonzentration, blau markierte mit einer höheren Proteinmenge nach *SEC62*-„knock down“ und rote Spots mit einer verringerten Konzentration. Spots mit grauer Markierung gingen nicht in die Auswertung mit ein.

Die Auswertung des Gels ergab 1180 Spots (92,3%) mit gleicher Expression. 41 Spots (3,2%) zeigten nach *SEC62*-Depletion einen reduzierten Proteingehalt und 57 Spots (4,5%) einen erhöhten Proteingehalt. Für die weitere massenspektrometrische Analyse wurden 19 Spots ausgewählt, wovon 11 eine erhöhte Expression und 8 eine verringerte Expression aufwiesen. Die Auswahl erfolgte durch genauere Analyse der 98 Spots, wobei die Form des Spots und der Proteingehalt als Kriterien herangezogen wurden. Das Ausstanzen der Proteinspots erfolgte mittels eines automatisierten Ettan Spotgelpickers. Die massenspektrometrische Analyse wurde am Institut für Analytical Sciences in Dortmund durch Dr. rer. nat. René Zahedi durchgeführt. Für jedes Protein wurden die Sequenzabdeckung und der EmPAI-Value (Ishihama et al., 2005) angegeben.

Um einen Überblick über die zellulären Funktionen der veränderten Proteine zu erhalten, wurden alle identifizierten Proteine gemäß ihrer GO-Annotationen (Gene Ontology, GO) unterteilt. Um zu bestimmen, welcher zelluläre „Pathway“ durch *SEC62*-„silencing“ am meisten beeinflusst wird, wurde die Anzahl der Annotationen pro GO-Term in der Liste der regulierten Proteine mit den in der GO-Datenbank annotierten Proteine verglichen. Danach wurden die GO-Terme nach der Überrepräsentation der in diesem Versuch deregulierten Proteine sortiert. In Tabelle 31 ist das Ergebnis der Auswertung zusammengefasst. Dargestellt sind die in dieser Untersuchung überrepräsentierten GO-Terme nach *SEC62*-Depletion.

Insgesamt wurden 13 überrepräsentierte GO-Terme gefunden. Sechs GO-Terme zeigen eine mögliche funktionelle Verbindung von Sec62 mit Stress assoziierten zellulären „Pathways“: “*translational elongation*” (GO: 0006414), “*negative and positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle*” (GO: 0051436 und GO: 0051437), “*negative regulation of cell proliferation and apoptosis*” (GO: 0008285 und GO: 0043066) und “*anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process*” (GO: 0031145). Zusammenfassend ergibt sich aus dieser Proteomuntersuchung ein Hinweis, dass der Sec62-Proteingehalt in Zellen Einfluss auf ER-Stress assoziierte zelluläre Signalwege hat.

Tab. 31: Überrepräsentierte GO-Terme nach *SEC62*-„knock down“. In die ermittelten GO-Terme wurden sowohl positiv- als auch negativ-regulierte Proteine miteinbezogen.

GO-Term	Beschreibung	Annotation	% von Total	in GO	% von Total	Überrepräsentation
0018149	Peptide cross-linking	3	0,034	26	0,001	24,36
0006414	translational elongation	10	0,114	106	0,006	19,92
0031145	anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	4	0,045	62	0,003	13,62
0051436	negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	4	0,045	62	0,003	13,62
0030216	keratinocyte differentiation	4	0,045	73	0,004	11,57
0051437	positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	3	0,034	65	0,003	9,75
0008544	epidermis development	3	0,034	192	0,010	3,30
0006954	inflammatory response	5	0,057	360	0,019	2,93
0043066	negative regulation of apoptosis	4	0,045	369	0,020	2,29
0008285	negative regulation of cell proliferation	3	0,034	341	0,018	1,86
0001501	skeletal system development	3	0,034	348	0,019	1,82
0006928	cell motion	4	0,045	572	0,031	1,48
0007155	cell adhesion	4	0,045	796	0,043	1,06

3.7.2 Einfluss von *SEC62* auf die Invasion von Tumorzellen

In Prostatakarzinomen ist eine erhöhte Sec62-Proteinsynthese mit der Tumorphysion assoziiert (Greiner et al., 2011a). Somit besteht die Möglichkeit, dass Sec62 eine Funktion bei der Metastasierung einnimmt. Um zu untersuchen, welche Rolle Sec62 bei der Invasion von Tumorzellen spielt, wurde das invasive Wachstum von *SEC62* depletierten androgenunabhängigen PC3-Zellen überprüft. Die Analyse erfolgte in einem Standardinvasions-Modell (siehe 2.2.2.6). Mittels Westernblot wurde die „silencing“-Effizienz (siehe 2.2.4.1) überprüft. Um auszuschließen, dass eine Verminderung des invasiven Wachstums durch Zellschäden aufgrund der Transfektion begründet ist, wurde zusätzlich die „viability“ (siehe 2.2.2.1), Nekrose- (siehe 2.2.2.3) und Proliferationsrate (siehe 2.2.2.4), der in diesem Versuch untersuchten Zellen, bestimmt.

In Abbildung 21 ist der Sec62-Proteingehalt von PC3-Zellen dargestellt, die mit Kontroll siRNA bzw. mit *SEC62* UTR siRNA transfiziert wurden. Die Expression von *SEC62* depletierten PC3-Zellen konnte auf 5% gegenüber Kontroll siRNA transfizierten Zellen reduziert werden. Kein Unterschied in der Sec62-Proteinmenge bestand zwischen unbehandelten Zellen und Kontroll transfizierten Zellen.

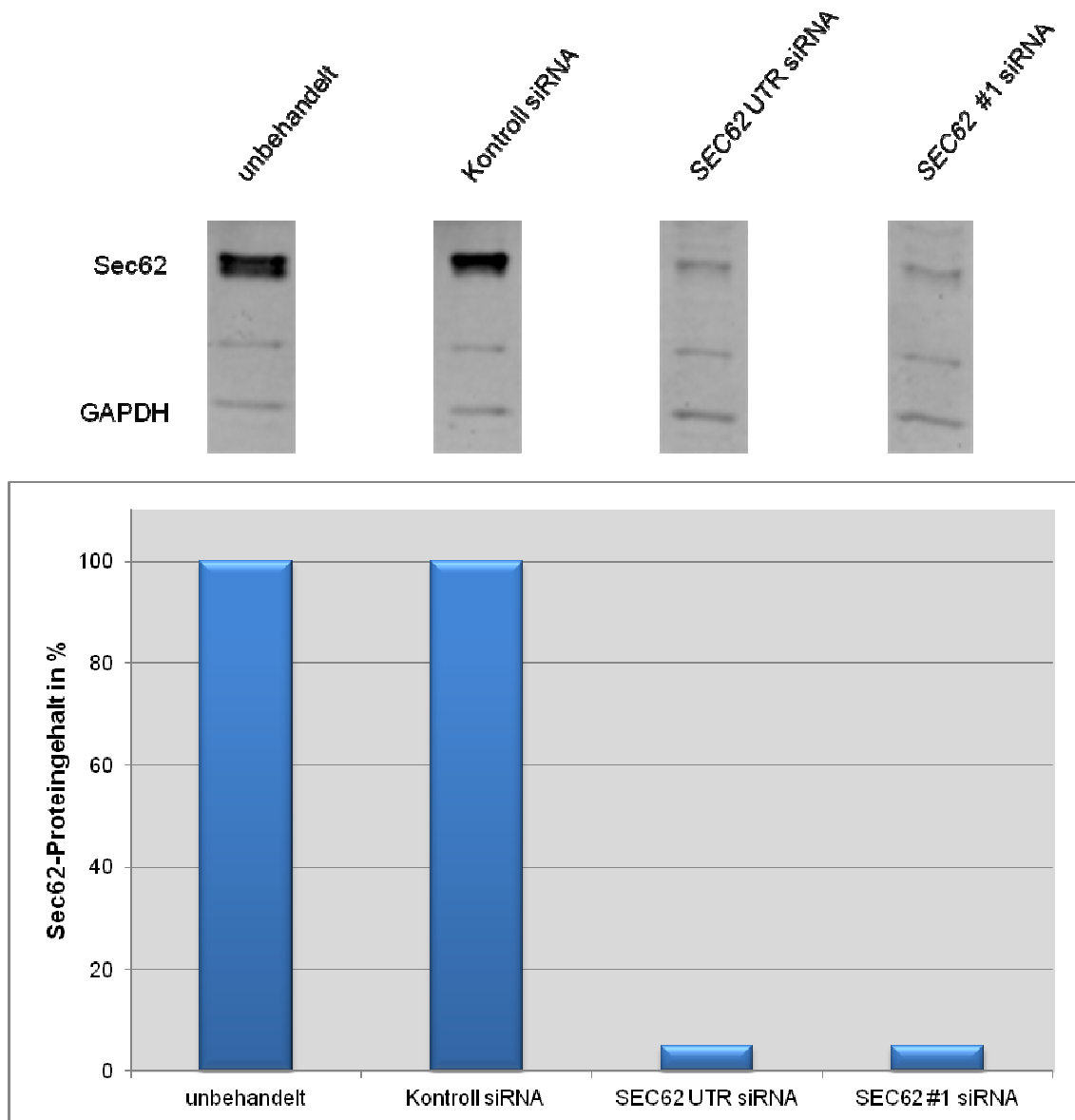


Abb. 21: Überprüfung der Sec62-Proteinmenge nach Transfektion von PC3-Zellen mit unterschiedlichen *SEC62* siRNA's. Dargestellt ist der Sec62-Proteingehalt von Kontroll siRNA, *SEC62* UTR siRNA und *SEC62* #1 siRNA transfizierten PC3Zellen. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittels Western Blot (oberer Teil der Abbildung) wurde die Proteinmenge von Sec62 und GAPDH (Ladekontrolle) quantifiziert (siehe 2.2.4.1), die Ratio von Sec62 gegen GAPDH berechnet und auf unbehandelte Zellen normiert.

Bei der Überprüfung der Zellparameter (siehe Abb. 22) zeigte sich ein geringer Vitalitätsverlust bei *SEC62*-„knock down“ Zellen (7%) und Kontroll siRNA transfizierten Zellen (3%). Ebenfalls konnte ein schwacher zytotoxischer Effekt der Transfektion auf die untersuchten Zellen nachgewiesen werden (*SEC62*-„knock down“ Zellen (9%) und Kontroll siRNA transfizierten Zellen (11%)). Nur bei *SEC62* depletierten Zellen konnte ein mäßiger Rückgang der Proliferationsfähigkeit von 18% bestimmt werden.

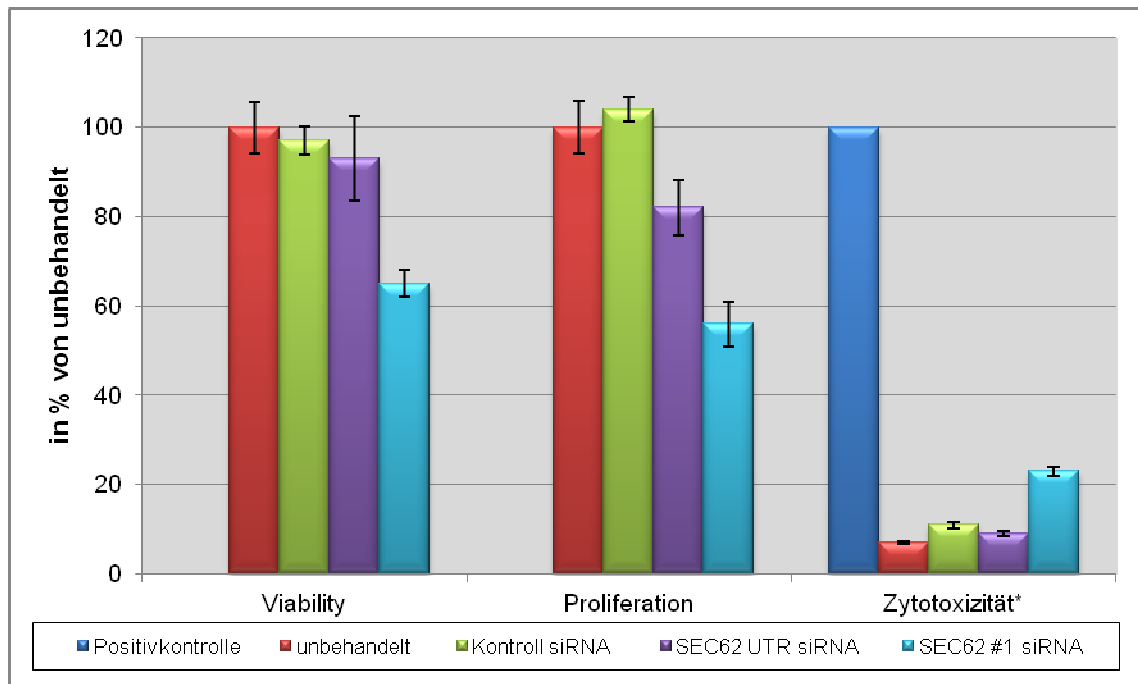


Abb. 22: Kontrolle der „viability“, der Proliferation und Nekrose von unbehandelten, Kontroll transfizierten und *SEC62* downregulierten PC3-Zellen. Dargestellt ist die „viability“ (2.2.2.1 WST-1 Assay.), Proliferation (2.2.2.4 BrdU-Assay) und Zytotoxizität (2.2.2.3 LDH⁺-Assay) von Kontroll siRNA, *SEC62* UTR siRNA und *SEC62* #1 siRNA transfizierten PC3-Zellen. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Alle Ansätze wurden als Triplikate durchgeführt. In die Untersuchung gingen jeweils 2 Experimente für Kontroll siRNA (n=6), *SEC62* UTR siRNA (n=6) und unbehandelte Zellen (n=6) mit ein und 1 Experiment für *SEC62* #1 siRNA (n=3). Angegeben sind die berechneten Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung. * die Nekrose ist angegeben in % von der Positivkontrolle (= 100% Nekrose durch Zellyse mit 10% TritonX 100, im Kit enthaltene Lösung).

Bei der Untersuchung des Invasionspotentials führt der *SEC62*-„knock down“ in PC3-Zellen zu einem Rückgang auf 17% (siehe Tab. 32), wobei Kontroll siRNA transfizierte Zellen im Gegensatz dazu eine Verminderung der Invasivität auf 82% aufweisen.

Tab. 32: Untersuchung der Invasivität von *SEC62*-„Knock Down“ Zellen. Überprüft wurde die Invasivität von Kontroll siRNA, *SEC62* UTR siRNA und *SEC62* #1 siRNA transfizierten PC3-Zellen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Ausgesät wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen. Pro Ansatz wurden Triplikate untersucht. Aus diesen wurde der Mittelwert der Zellzahl/Well der invasiv gewachsenen Zellen bestimmt und anschließend der Mittelwert aller Experimente ermittelt. Dargestellt ist die Invasion der unterschiedlich behandelten Zellen. Unbehandelte Zellen wurden gleich 100% gesetzt.

Ansatz	MW Zellzahl/ Well [10 ⁴]	MW Zellzahl/ Well [10 ⁴]	MW Zellzahl/ Well [10 ⁴]	MW Zellzahl/ Well [10 ⁴]	Invasion in % von unbehandelt
	1. Exp.	2. Exp.	3. Exp.	Exp. 1 - Exp. 3	
unbehandelt	8,60	4,75	6,20	6,52	100
Kontroll siRNA	4,80	5,00	6,30	5,37	82
<i>SEC62</i> UTR	1,00	0,66	1,60	1,09	17
<i>SEC62</i> #1	0,83	n.b.	n.b.	0,83	13

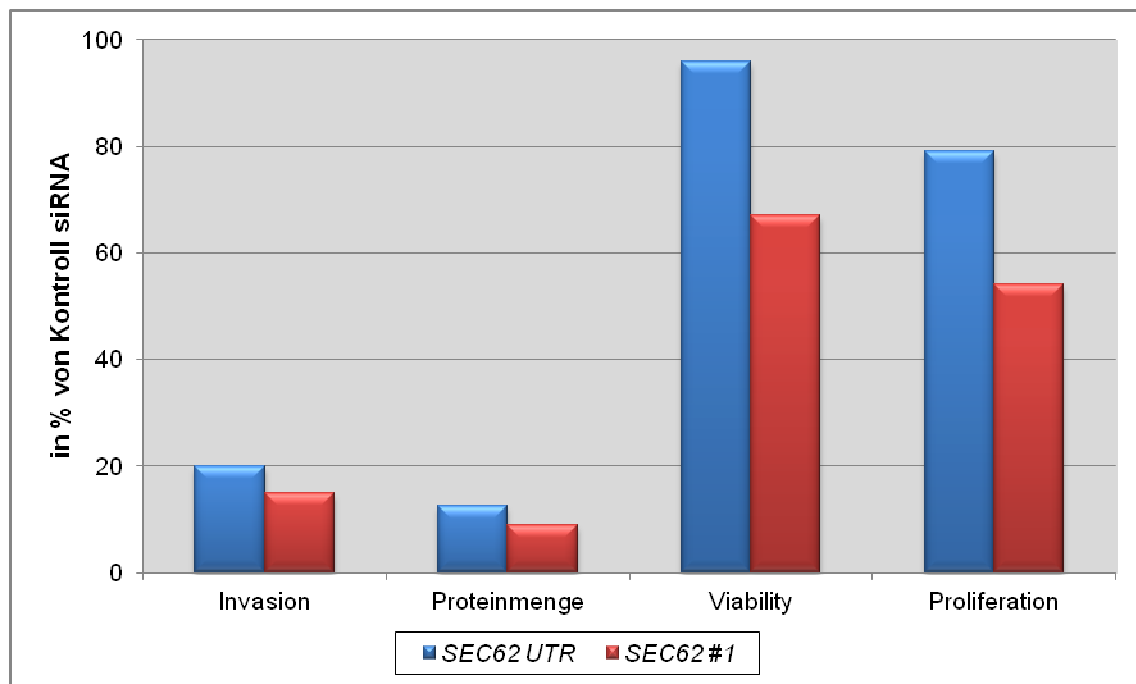


Abb. 23: Vergleich der Invasivität, der Proteinmenge, der „viability“ und Proliferation der untersuchten PC3-Zellen. Dargestellt ist die Invasivität, die Proteinmenge, die „viability“ und die Proliferation von Kontroll siRNA, *SEC62* UTR siRNA und *SEC62* #1 siRNA transfizierten PC3-Zellen. Kontroll siRNA transfizierte Zellen wurden auf 100% gesetzt.

Der Vergleich der untersuchten Parameter (siehe Abb. 23) verdeutlicht, dass die geringe Verminderung der Vitalität bzw. Proliferationsrate nicht ursächlich für den erstaunlichen Rückgang der Invasionsfähigkeit der *SEC62*-„knock down“ Zellen ist, sondern dieser nur auf den geringen Sec62-Proteingehalt zurückzuführen ist.

Um Nebeneffekte der verwendeten siRNA auszuschließen wurde die gleiche Untersuchung mit einer siRNA durchgeführt, die gegen den kodierenden Bereich von *SEC62* gerichtet ist. Abbildung 21 zeigt, dass die Transfektion von PC3-Zellen mit *SEC62* #1 siRNA den Sec62-Proteingehalt auf 5% reduzieren konnte. Die Vitalität der Zellen ist jedoch durch die Transfektion mit dieser siRNA auf 65% reduziert und die Proliferation sogar auf 56% (siehe Abb. 22). Es kann ebenfalls gezeigt werden, dass die Transfektion mit der *SEC62* #1 siRNA zytotoxischer auf PC3-Zellen wirken. Im Vergleich zur *SEC62* UTR siRNA (9%) konnten vermehrt nekrotische Zellen (23%) nachgewiesen werden (siehe Abb. 22). Durch die Reduktion des Sec62-Proteingehaltes auf 5% konnte jedoch das Invasionspotential der Zellen auf 13% reduziert werden (siehe Abb. 23).

Insgesamt kann man schlussfolgern, dass durch das Ausschalten von *SEC62* in der Prostatakarzinomzelllinie PC3, nur noch wenige Zellen das Potential besitzen invasiv zu wachsen, wobei dieser Effekt jedoch nicht auf eine Zellschädigung durch Transfektion zurückzuführen ist.

Als nächstes wurde untersucht, ob sich Sec62 in den invasiv gewachsenen, *SEC62* depletierten Zellen nachweisen lässt. Dazu wurden *SEC62* UTR siRNA und Kontroll siRNA transfizierte Zellen auf 24 Well-Matrigel™ Invasionskammern mit FluoroBlok-Membran ausgesät und 48 h im Brutschrank inkubiert. Der Nachweis von Sec62 erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung der invasiv gewachsenen Zellen. In Abbildung 24 A und B sind invasiv gewachsene Kontroll siRNA transfizierte Zellen dargestellt und in Abbildung 24 C und D invasiv gewachsene *SEC62* UTR siRNA transfizierte Zellen.

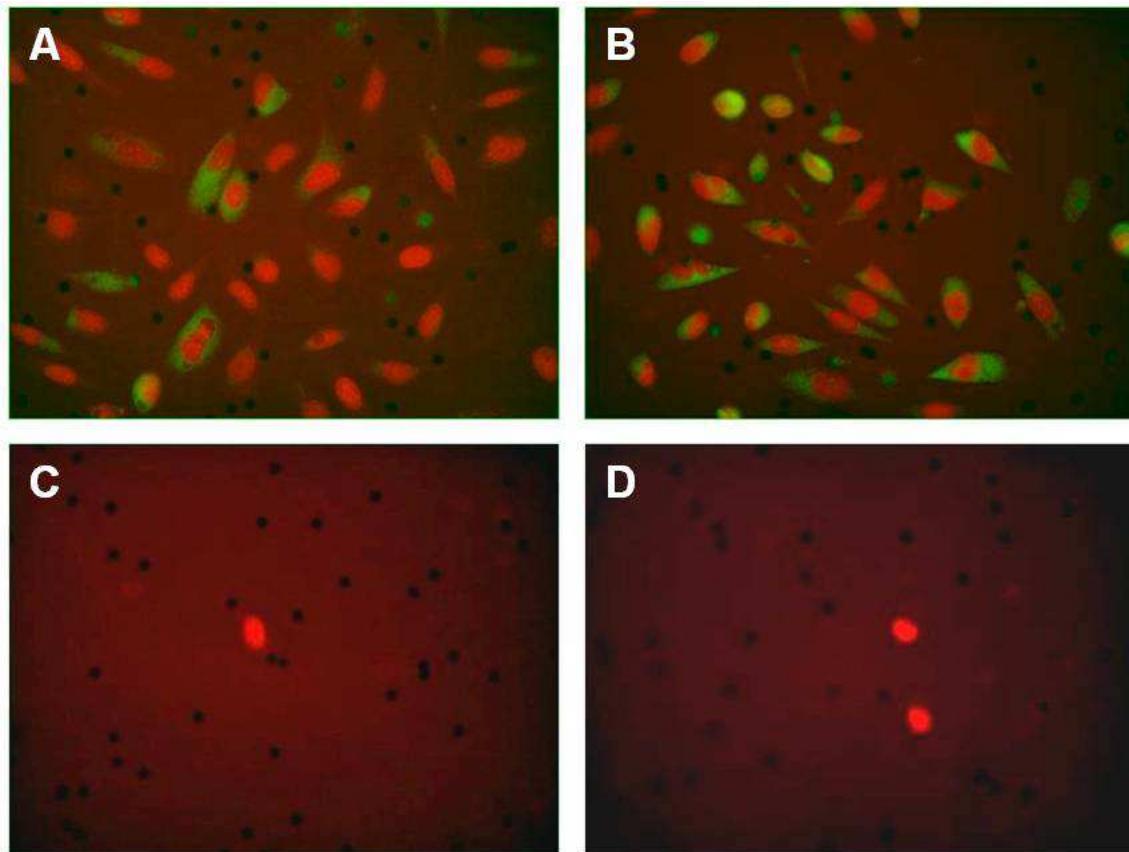


Abb. 24: Nachweis von Sec62 in invasiv gewachsenen PC3-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung. PC3-Zellen wurden mit *SEC62* UTR siRNA und Kontroll siRNA transfiziert (siehe 2.2.2.5) und auf 24 Well-Invasionskammern mit FluoroBlok-Membran ausgesät. Nach 48 h wurden die invasiv gewachsenen Zellen mit dem Sec62-Primärantikörper inkubiert. Zur Detektion diente der Sekundärantikörper Alexa 488-goat-anti-rabbit (grün). Die Kernfärbung erfolgte durch Propidiumjodid (rot). **A** und **B** invasiv gewachsene PC3-Zellen mit Kontroll siRNA transfiziert **C** und **D** invasiv gewachsene PC3-Zellen mit *SEC62* UTR siRNA transfiziert.

In den Kontrollzellen zeigt sich eine deutliche Lokalisierung der Sec62-Signale (grün) im ER der Zelle (rot dargestellt sind die mit Propidiumjodid gefärbten Zellkerne), wodurch die ER-Struktur gut erkennbar ist. Während dessen ist in den invasiv gewachsenen Zellen, die mit *SEC62* UTR siRNA transfiziert wurden, kein Sec62-Signal im ER nachweisbar.

Da nicht nur das Prostatakarzinom die Fähigkeit besitzt invasiv zu wachsen, wurde im letzten Schritt überprüft, ob der *SEC62*-„knock down“ auch in Zelllinien anderer Tumorentitäten zu einer Reduktion des Invasionspotentials führt. Überprüft wurde hierzu die Blasenkarzinomzelllinie T24, die ein hohes Invasionspotential aufweist, zwei Lungenkarzinomzelllinien A549 und H1299, wobei A549 eine Überexpression von *SEC62* aufweist und H1299 die gleiche Expression wie PC3 zeigt. Ebenfalls untersucht wurde die

die Fibrosarkomzelllinie HT1080 (vermehrte *SEC62*-Expression und hohes Invasionspotential) sowie die Glioblastomzelllinie TX3868 (erhöhte *SEC62*-Expression).

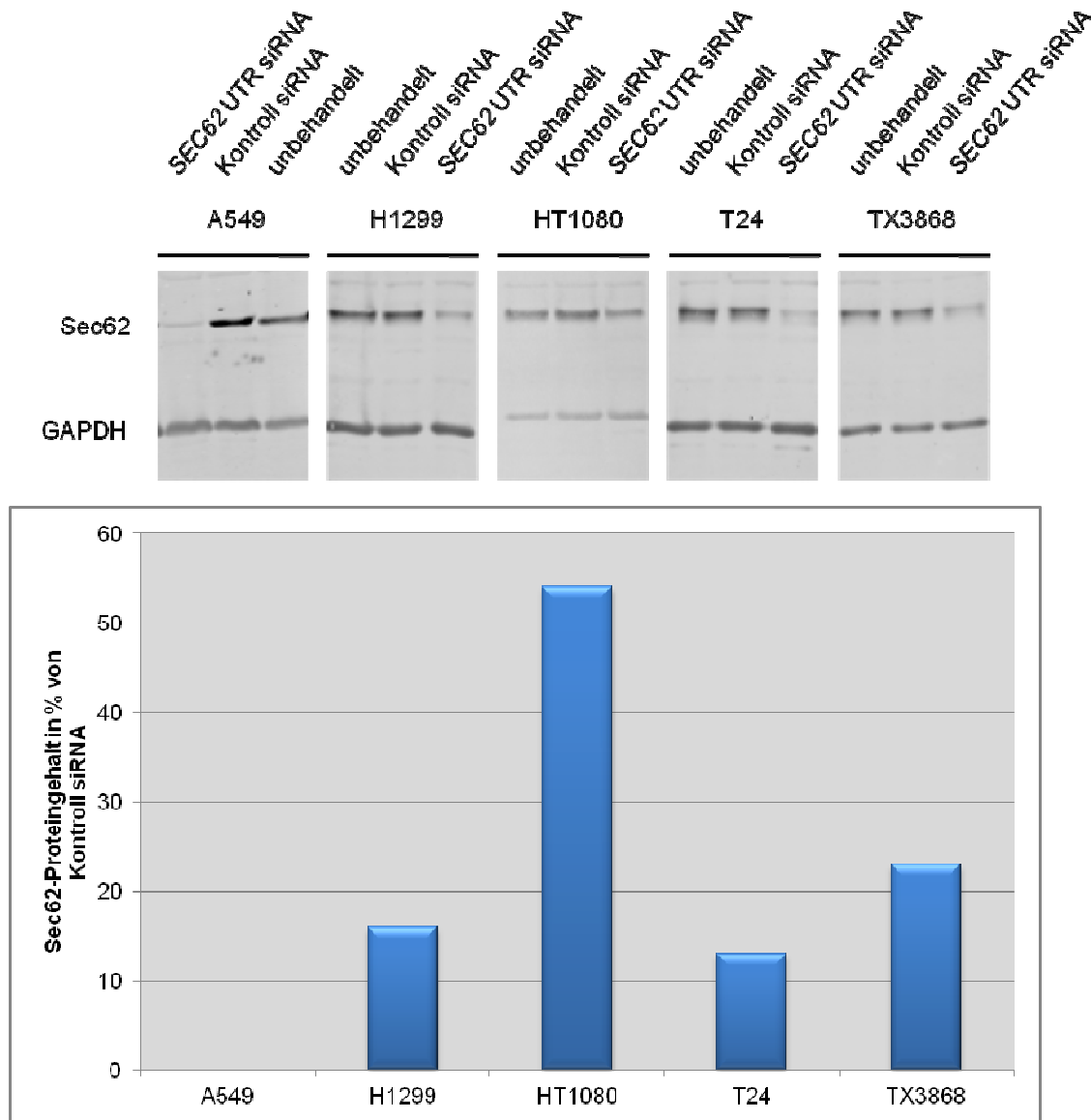


Abb. 25: Kontrolle der Sec62-Proteinmenge nach Transfektion von Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten. Dargestellt ist der Sec62-Proteingehalt von Kontroll siRNA, *SEC62* UTR siRNA und *SEC62* #1 siRNA transfizierten Tumorzellen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Mittels Western Blot (oberer Teil der Abbildung) wurde die Proteinmenge von Sec62 und GAPDH (Ladkontrolle) quantifiziert (siehe 2.2.4.1), die Ratio von Sec62 gegen GAPDH berechnet und auf unbehandelte Zellen normiert.

Die Überprüfung der *SEC62* siRNA transfizierten Zellen (bezogen auf Kontroll siRNA transfizierte Zellen) ergab in allen untersuchten Tumorzelllinien einen enormen Rückgang des Sec62-Proteingehaltes (H1299 16%, für A549 0%, für HT1080 54%, für TX3868 23% und für T24 13% (siehe Abb. 25)), wobei der größte Rückgang auf 0% in

A549 Zellen gefunden wurde und die geringste Verminderung der Proteinmenge auf 54% in HT1080 Zellen gezeigt werden konnte.

Bei der Kontrolle der „viability“ der *SEC62* UTR siRNA transfizierten Zellen wurde bei H1299 der größte Vitalitätsverlust von 65% beobachtet (siehe Abbildung 26). Hier zeigte sich schon bei den Kontroll transfizierten Zellen ein Vitalitätsrückgang von 35%. Bei den Zelllinien A549 und TX3868 ging die Vitalität auf 73 - 74% (siehe Abbildung 26). Jedoch bestand kein Unterschied zwischen unbehandelten Zellen und Kontroll siRNA transfizierten Zellen. Eine Verminderung der Vitalität auf 67% wurde bei *SEC62* depletierten T24 Zellen beobachtet, wobei auch hier die Kontroll siRNA transfizierten Zellen nur noch 77% aufwiesen (siehe Abbildung 26).

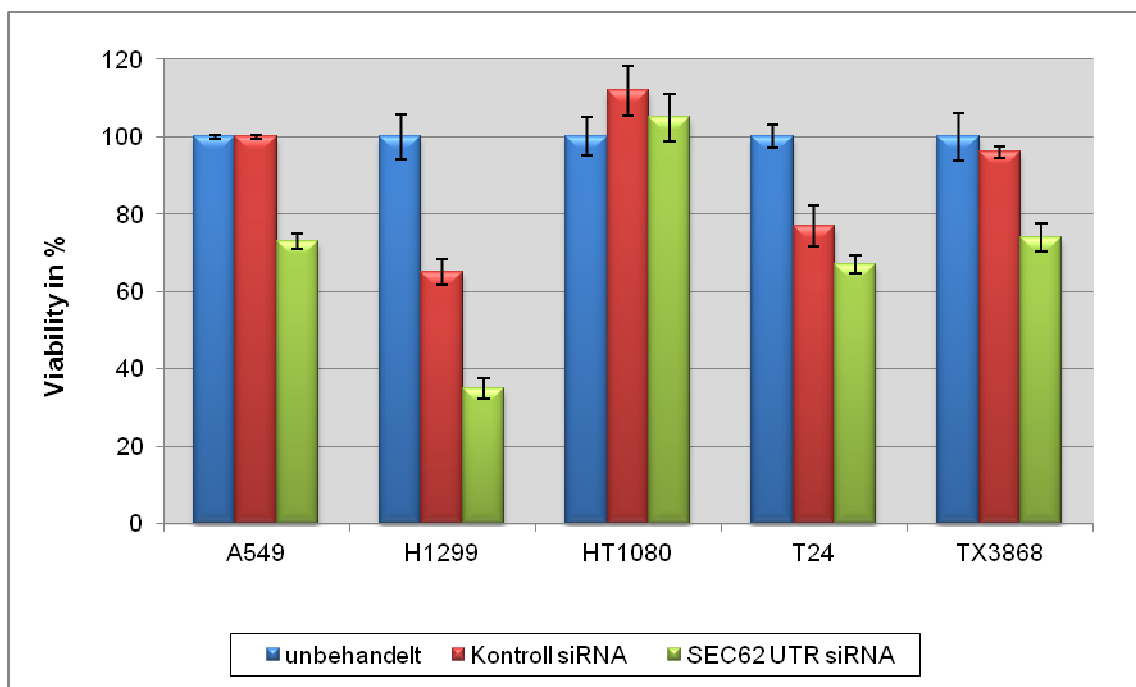


Abb. 26: Auswirkung der *SEC62*-Downregulierung auf die „viability“ von Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten. Dargestellt ist die „viability“ (siehe 2.2.2.1 WST-1 Assay) von Kontroll und *SEC62* UTR siRNA transfizierten Tumorzellen. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Pro Ansatz und Experiment wurden Triplikate durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6) und die ermittelte Standardabweichung.

Die Transfektion aller untersuchten Tumorzelllinien mit Kontroll und *SEC62* UTR siRNA hatte jedoch keine Auswirkung auf die Proliferation der Zellen (siehe Abbildung 27).

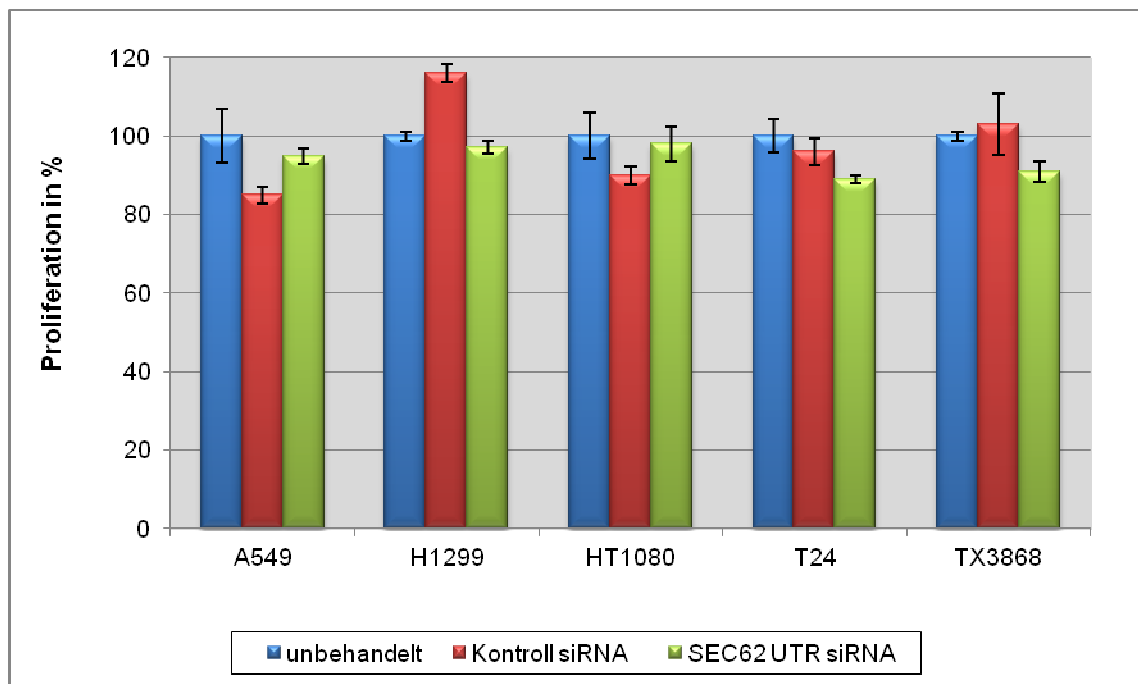


Abb. 27: Auswirkung der *SEC62*-Downregulierung auf die Proliferation von Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten. Dargestellt ist die Proliferation (2.2.2.4 BrdU-Assay.) von Kontroll und *SEC62* UTR siRNA transfizierten Tumorzellen. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Pro Ansatz und Experiment wurden Triplikate durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6) und die ermittelte Standardabweichung.

Bei der Überprüfung des zytotoxischen Effektes der Transfektion auf die Tumorzellen stellte sich heraus, dass T24 die größten Effekte aufwies (siehe Abbildung 28). In 20% der Kontroll siRNA transfizierten Zellen und 24% der *SEC62* UTR siRNA transfizierten Zellen ließ sich Nekrose nachweisen. In unbehandelten HT1080-Zellen wurde bereits 7% Nekrose beobachtet, bei Kontroll transfizierten 10% und bei *SEC62*-„knock down“ Zellen 18% (siehe Abbildung 28). Die Transfektion von H1299, A549 und TX3868 mit beiden siRNAs zeigte nur sehr geringe zytotoxische Effekte auf die untersuchten Zellen.

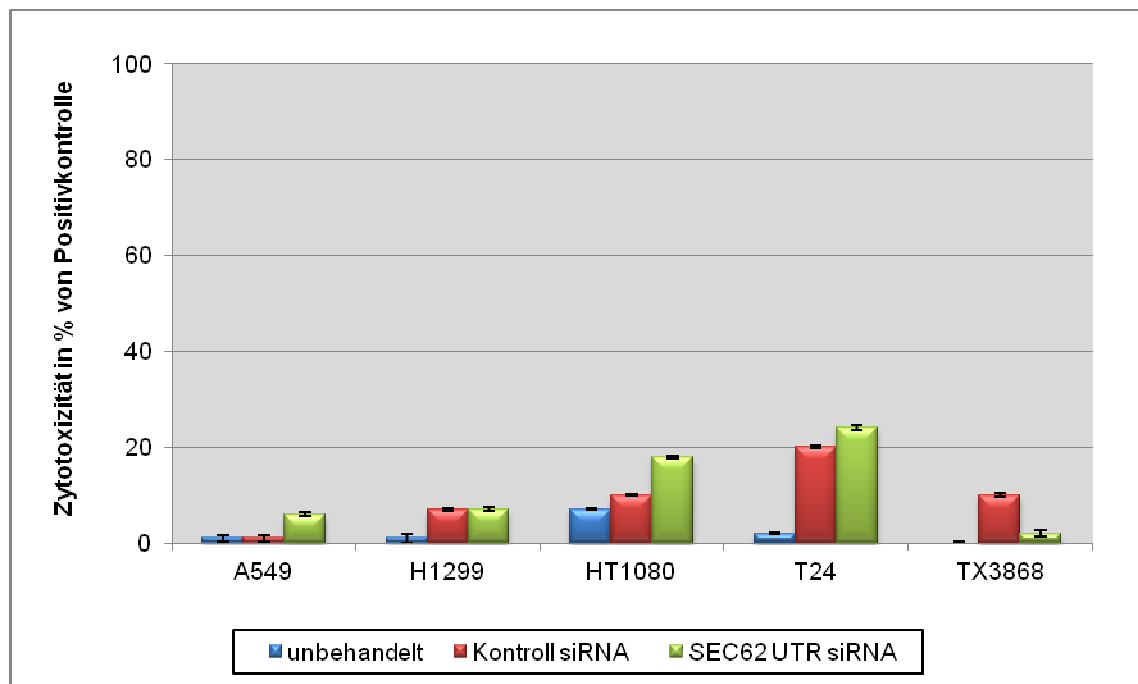


Abb. 28: Zytotoxischer Effekt der Transfektion von Kontroll siRNA und *SEC62* UTR siRNA auf Tumorzelllinien verschiedener Tumorentitäten. Dargestellt ist der zytotoxische Effekt der Transfektion von Kontroll siRNA und *SEC62* UTR siRNA auf Tumorzelllinien (2.2.2.3 LDH⁺-Assay). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Pro Ansatz und Experiment wurden Triplikate durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte aus 2 Experimenten (n=6) und die ermittelte Standardabweichung. Die Zytotoxizität ist angegeben in % von der Positivkontrolle (= 100% Nekrose durch Zelllyse mit 10% TritonX 100, im Kit enthaltene Lösung).

Die Ergebnisse des Invasionsassays in Tabelle 33 zeigen bei allen untersuchten Tumorzelllinien eine deutliche Reduktion des invasiven Wachstums nach Depletion von *SEC62* gegenüber Kontroll siRNA transfizierten Zellen und unbehandelten Zellen. Die Invasionsfähigkeit von *SEC62* depletierten H1299 Zellen und TX3868 Zellen bezogen auf unbehandelte Zellen sinkt auf 6%. Dagegen zeigen Kontroll siRNA transfizierte A549-Zellen ein gesteigertes Invasionspotential auf 133%, wohingegen in *SEC62*-„knock down“-Zellen ein Rückgang der Invasivität auf 13% gefunden wird. In den untersuchten T24, die mit *SEC62* UTR siRNA transfiziert wurden, sinkt die Invasivität auf 5%. Die Befunde der Fibrosarkomzelllinie HT1080 zeigen bei *SEC62*-„knock down“-Zellen eine Verminderung der Invasion auf 33%.

Tab. 33: Untersuchung der Invasivität von *SEC62*-„knock down“ Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten. Überprüft wurde die Invasivität von Kontroll siRNA, *SEC62* UTR siRNA und *SEC62* #1 siRNA transfizierten Tumorzellen. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Ausgesät wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen. Pro Ansatz wurden Triplikate untersucht. Aus diesen wurde der Mittelwert der Zellzahl/Well der invasiv gewachsenen Zellen bestimmt und anschließend der Mittelwert aller Experimente ermittelt. Dargestellt ist die Invasion der unterschiedlich behandelten Zellen, dabei wurden unbehandelte Zellen gleich 100% gesetzt.

Zelllinie	MW Zellzahl/Well [10 ⁵]	MW Zellzahl/Well [10 ⁵]	MW Zellzahl/Well [10 ⁵]	Invasion in % von unbehandelt
	1. Exp.	2. Exp.	1. Exp. + 2. Exp	
H1299				
unbehandelt	0,53	2,80	1,67	100
Kontroll siRNA	0,475	1,90	1,19	71
<i>SEC62</i> UTR siRNA	0,047	0,14	0,094	6
A549				
unbehandelt	1,90	1,40	1,65	100
Kontroll siRNA	2,20	2,20	2,20	133
<i>SEC62</i> UTR siRNA	0,30	0,13	0,215	13
HT1080				
unbehandelt	3,12	6,50	4,81	100
Kontroll siRNA	2,25	4,80	3,53	73
<i>SEC62</i> UTR siRNA	0,96	2,26	1,61	33
TX3868				
unbehandelt	2,60	2,90	2,75	100
Kontroll siRNA	0,36	0,94	0,65	24
<i>SEC62</i> UTR siRNA	0,10	0,22	0,16	6
T24				
unbehandelt	1,40	6,40	3,90	100
Kontroll siRNA	2,20	1,80	2,00	51
<i>SEC62</i> UTR siRNA	0,13	0,27	0,20	5

Es ist bei der Zelllinie HT1080 deutlich zu erkennen, dass bei einer höheren Restproteinmenge, d.h. bei einer schlechteren „silencing“-Effizienz, das Invasionspotential der Zellen ebenfalls größer ist (siehe Abb. 29).

Vergleicht man nun die „viability“ und Proliferation mit der Invasionsfähigkeit der untersuchten Zellen, so zeigt sich, dass der geringe Vitalitäts- und Proliferationsrückgang auch in dieser Untersuchung nicht für die Reduktion der Invasion verantwortlich ist (siehe Abb. 29).

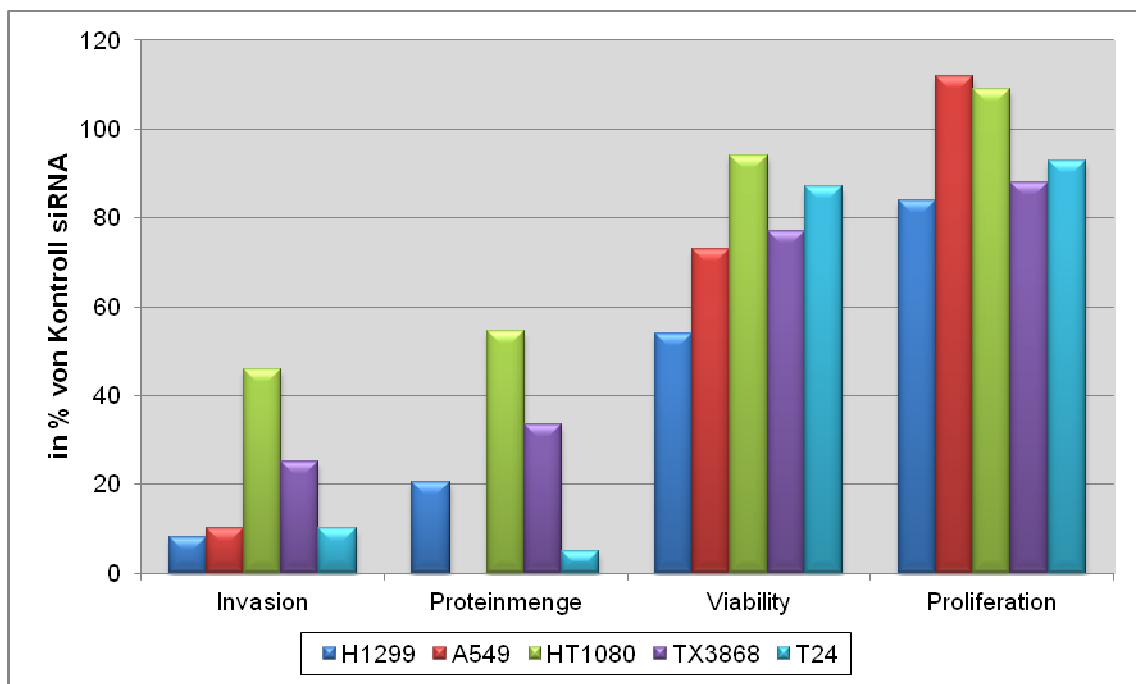


Abb. 29: Vergleich der Invasivität, der Proteinmenge, der „viability“ und Proliferation der untersuchten Tumorzelllinien. Dargestellt ist die Invasivität, die Proteinmenge, die „viability“ und die Proliferation von Kontroll siRNA, *SEC62* UTR siRNA und *SEC62* #1 siRNA transfizierten Tumorzellen. Kontroll siRNA transfizierte Zellen wurden auf 100% gesetzt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung haben verdeutlicht, dass *SEC62* essentiell für das invasive Wachstum von Tumorzellen ist. Gleichzeitig zeigt sich aber auch, dass ein Fehlen von *SEC62* das Wachstum und die Vitalität dieser Zellen nicht beeinträchtigt.

4. Diskussion

Gegenstand meiner Untersuchungen war die Charakterisierung des erstmals von unserer Arbeitsgruppe in Prostatakarzinomen als amplifiziert beschriebenen *SEC62*-Gens (Jung et al., 2006) als neuer Tumor- und Prognosemarker. Ein weiteres Ziel war die funktionelle Analyse von *SEC62* in Tumoren, um ein besseres Verständnis der Funktionsweise dieses Proteins im Zusammenhang mit der Entstehung, dem Wachstum und der Progression von Tumoren zu erhalten und damit die pathophysiologische Funktionen von *Sec62* in Tumoren aufzuklären. Dabei stand das Prostatakarzinom im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die Befunde, die aus meinen Analysen resultierten, wurden dann *in vitro* an Zelllinien wie Kolon-, Mamma-, Blasen-, Bronchialkarzinom sowie dem Fibrosarkom, die als Modellsystem für die unterschiedlichen Tumorentitäten dienen sollten, geprüft.

4.1 Eignung von *SEC62* als diagnostischer Biomarker

Biomarker sind definiert als Moleküle, deren Auftreten oder erhöhte Konzentration in Körperflüssigkeiten bzw. in oder auf Zellen Rückschlüsse auf das Vorliegen, den Verlauf oder die Prognose einer bestehenden Tumorerkrankung ermöglichen. Geeignet ist die Bestimmung von Biomarker-Konzentrationen zur Rezidivfrüherkennung, zur Verlaufskontrolle, zur Therapieüberwachung, zur Einschätzung der Prognose sowie im Rahmen der Primärdiagnose zur Früherkennung und Therapieentscheidung. Beim Prostatakarzinom gilt das PSA als etablierter Biomarker und dient der Früherkennung sowie der Verlaufskontrolle unter Therapie. Allerdings besteht bei der Verwendung des PSA als Marker ein entscheidender Nachteil, da es zwar organspezifisch, jedoch nicht karzinomspezifisch ist. Hierdurch kann es bei gutartigen Erkrankungen der Prostata wie z.B. der BPH und der Prostatitis zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Derzeit gibt es jedoch keinen besseren Marker für das Prostatakarzinom. Die PSA-basierte Früherkennung wird heute jedoch kontrovers diskutiert. Aus Obduktionsergebnissen ist bekannt, dass 80% aller 70-jährigen Männer ein latentes Prostatakarzinom haben, ohne jedoch an diesem Tumor zu erkranken oder zu versterben (Börgermann und Rübber, 2006). Durch die Bestimmung des PSA-Wertes ist zu befürchten, dass verstärkt Prostatakarzinome entdeckt würden, die sich zu Lebzeiten des Patienten sehr langsam entwickeln und keine klinischen Symptome aufzeigen würden. Ein wichtiges Ziel der präklinischen Forschung beim Prostatakarzinom ist daher die Identifizierung von Biomarkern zur frühzeitigen Detektion von Patienten, die

im Laufe der Erkrankung kastrationsresistente Prostatakarzinome entwickeln, die zumindest gegenwärtig nicht therapierbar sind. Darüberhinaus sollen Patienten mit indolentem Prostatakarzinom identifiziert werden, um diese vor Übertherapie („overtreatment“) zu schützen. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob das in Prostatakarzinomen verstärkt synthetisierte ER-Membranprotein Sec62 einen solchen Marker darstellen könnte.

4.1.1 *SEC62*-Amplifikation und Expression in Tumoren

Unter klinischen Gesichtspunkten haben Amplifikationen Bedeutung bei der Prognose und Auswahl der „targeted therapy“ einer Tumorerkrankung sowie bei der Entwicklung von Therapieresistenzen (Albertson, 2006). Beim Mammakarzinom zeigen spezifische Amplikons wie *MYC* und *ERBB2*, prognostische Signifikanz (Al-Kuraya et al., 2004). Zugleich sind amplifizierte Gene Zielstrukturen spezifischer Therapien aufgrund ihrer erhöhten Expression im Tumor. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von Antikörpern gegen *ERBB2* (Herceptin) bei Mammakarzinom-Patienten mit amplifiziertem *ERBB2* (Mass et al., 2005).

Beim Prostatakarzinom finden sich vor allem in fortgeschrittenen, metastasierenden und kastrationsresistenten Tumoren Amplifikationen (Kaltz-Wittmer et al., 2000; Linja et al., 2001; Mark et al., 2000; Visakorpi et al., 1995b). Visakorpi et al. beschrieb 1995 erstmals eine Amplifikation des *AR*-Gens (Xq11) in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen (Visakorpi et al., 1995a). Dies wurde inzwischen durch zahlreiche andere Studien bestätigt (Kaltz-Wittmer et al., 2000; Koivisto et al., 1997). Mit der Genamplifikation in rezidivierenden Prostatakarzinomen geht auch eine Überexpression des *AR*-Gens einher (Linja et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob DNA-Gewinne von *SEC62* ein prostatakarzinomspezifisches und/oder ein tumorspezifisches Phänomen darstellen. Aus diesem Grund wurden eine Reihe von Tumorentitäten anderer Organsysteme auf Amplifikationen und Überexpression dieses Gens hin untersucht. Die Untersuchungen umfassten neben der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP (androgenabhängig) und PC3 (androgenunabhängig), die Harnblasenkarzinomzelllinien RT4 und T24, die Kolonkarzinomzelllinien HT29 und COLO320, die Mammakarzinomzelllinie MCF7 sowie eine Fibrosarkomzelllinie HT1080.

In allen untersuchten Tumorzelllinien waren signifikante Aberrationen von *SEC62* und Chromosom 3 nachweisbar. Es wurden sowohl selektive Verluste als auch Gewinne von *SEC62* beobachtet, wobei alle Tumorzelllinien Genkopienzahlgewinne aufwiesen. In den Zelllinien LNCaP und MCF7 ging die Vermehrung des *SEC62*-Gens mit einer Polysomie von Chromosom 3 einher. Interessanterweise wiesen die übrigen untersuchten Zelllinien eine größere Anzahl an Zellen mit selektiven Gewinnen von *SEC62* als eine Vermehrung von Chromosom 3 auf. Der *SEC62*-Kopienzahlgewinn, ohne gleichzeitige Vermehrung von Chromosom 3, lässt auf eine selektive Amplifikation von *SEC62* schließen, was möglicherweise auf einen Selektionsvorteil zurückgeführt werden kann. Die komplexen Karyotypen könnten deshalb ein Ausdruck eines Selektionsprozesses darstellen, welcher immer mehr Kopien des *SEC62*-Gens anhäuft. Die Ergebnisse der FISH-Analyse zeigen außerdem eine intrinsische Heterogenität der Tumorzelllinien, welche durch eine auffallend unterschiedliche Anzahl an *SEC62*- und Chromosom 3-Signalen pro Zelle innerhalb einer Zellpopulation charakterisiert ist. Im Gewebe spiegelt diese Tumorerheterogenität die genomische Instabilität der Tumorzellen wider, die aufgrund von genetischen Veränderungen während der Tumorentwicklung aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entsteht (Bayani et al., 2007). Qian et al. (1995) propagierten in ihrer Arbeit, dass die malignen Foci, die in Prostatakarzinomen entdeckt wurden, verschiedene Stadien und Malignitätsgrade aufweisen, welche jeweils von unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen ausgehen (Qian et al., 1995). In der Vergangenheit wurde bereits beim Mamma- und dem papillären Schilddrüsenkarzinom beobachtet, dass sich die Zellen innerhalb eines Tumors auf molekularer Ebene unterscheiden (Aubele et al., 1999; Unger et al., 2008; Unger et al., 2004). In diesem Zusammenhang wird in den letzten Jahren vermehrt die Tumorstammzelltheorie diskutiert (Reya et al., 2001), wobei zwei Modelle existieren: Im stochastischen Modell wird postuliert, dass jede Zelle innerhalb des Tumors die Fähigkeit besitzt, das Tumorstammwachstum zu fördern und damit als Tumor-initiiierende Zelle (TIC) zu wirken. Das hierarchische Modell geht davon aus, dass eine geringe Anzahl maligner transformierter, tumorinitiiierender Zellen mit Stammzeleigenschaften wie Immortalität und geringe Proliferationsrate bei unbegrenzter Teilungsfähigkeit existieren. Diese Stammzellen des Tumors bringen eine große Anzahl differenzierter Zellen bzw. Progenitorzellen hervor, die den Primärtumor bilden. Die verschiedenen Zelltypen sind hierarchisch aufgebaut, wodurch der Tumor als ein gewissermaßen eigenständiges Organ verstanden werden kann. An der Spitze stehen die Tumorstammzellen. Es wird vermutet,

dass diese Zellen gegen viele der üblichen Therapien resistent sind und so zu Rezidiven und Metastasen führen.

Diese oben beschriebenen Genamplifikationen können zur Überexpression des betroffenen Gens führen. So zeigt sich in 20% der rezidivierenden und metastasierenden Prostatatumoren ein erhöhter c-Myc-Proteingehalt, verursacht durch eine hochgradige *c-MYC*-Amplifikation, woraus eine verstärkte Proliferation resultiert (Bubendorf et al., 1999). Jung et al. (2006) konnten in Prostatakarzinomen zeigen, dass sich eine *SEC62*-Amplifikation ebenfalls in einer Überexpression auswirkt (Jung et al., 2006).

Basierend auf den Amplifikationsdaten der untersuchten Tumorzelllinien wurde überprüft, ob sich der Gewinn von *SEC62* auf DNA-Ebene in diesen Zelllinien auch auf die Genexpression auswirkt. Lediglich die Fibrosarkomzelllinie HT1080 und Kolonkarzinomzelllinie HT29 zeigten neben einer Amplifikation gleichzeitig einen erhöhten *SEC62*-mRNA-Gehalt. Dieser Effekt wirkt sich jedoch nicht bei den Tumorzelllinien LNCaP, COLO320, MCF7 und T24 aus, die *SEC62* auf einem gleichen Level wie PC3 exprimieren. Hier wird deutlich, dass sich die DNA-Amplifikation in diesen Zelllinien nicht auf Transkriptionsebene manifestiert. Jung et al. (2006) hingegen fanden durch ihre Untersuchungen Tumore mit einer *SEC62*-mRNA Überexpression, die jedoch keine DNA-Gewinne aufwiesen. Daher ist zu vermuten, dass die Amplifikation nur einen von mehreren Mechanismen darstellt, die zu einer Überexpression dieses Gens führen (Jung et al., 2006).

Dieses Phänomen, dass sich Amplifikationen in einigen Zelllinien auf Transkriptionsebene stärker und in anderen schwächer auswirken, spricht dafür, dass weitere Regulationsmechanismen wie z.B. „rearrangements“, Transkriptionsfaktoren, miRNAs oder posttranslationale Modifikationen, bei der Expression eine Rolle spielen könnten. Da auch epigenetische Veränderungen in der Karzinogenese anzutreffen sind, könnten auch diese hier entscheidend sein. In den vergangenen Jahren wurden eine Vielzahl von in Tumorzellen alterierter Genloci identifiziert, welche durch DNA-Methylierung und Histonmodifikation aktiviert und/oder supprimiert sind (Mathews et al., 2010; Müller et al., 2010a).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich aufgrund der Heterogenität der Tumore die Amplifikation bzw. Expression von *SEC62* alleine nicht als diagnostischer Marker eignet. Jedoch geben die unter 4.1.3. diskutierten Daten zur Korrelation zwischen

SEC62-Expression und Tumorprogression einen Hinweis darauf, dass dieser Parameter möglicherweise als prognostischer Marker dienen könnte.

4.1.2 Mutationen im *SEC62*-Gen als möglicher Mechanismus für die veränderte Funktion im Prostatakarzinom

Das bedeutendste Gen bei der Tumorentstehung ist das Tumorsuppressorgen p53. Mutationen in diesem Gen sind die häufigsten genetischen Alterationen in humanen Tumoren. Bei über der Hälfte aller menschlichen Tumore fehlt entweder das p53-Protein, oder man findet Mutationen im p53-Gen. Zhao et al. (2000) zeigten, dass Mutationen im Androgenrezeptorgen die Rezeptorfunktion so verändert, dass die Aktivierung der AR-Signalkaskade nicht nur über Androgene, sondern auch über andere Steroidhormone wie z.B. Kortisol, Kortison, Progesteron und 17 β -Östradiol, erfolgen kann (Zhao et al., 2000). Da *SEC62* in der Tumorgenese des Prostatakarzinoms eine Rolle zu spielen scheint, wurde überprüft, ob Mutationen im *SEC62*-Gen für eine veränderte Funktion von Sec62 im Prostatakarzinom verantwortlich sind. Mutationen in Genen, die mit dem Proteintranslokation des ER assoziiert sind (wozu auch *SEC62* gehört), stehen in Zusammenhang mit unterschiedlichen humanen Erkrankungen. So führen z.B. Mutationen im *SEC63*-Gen zu einer autosomal dominanten polyzystischen Lebererkrankung (Davila et al., 2004; Drenth et al., 2005). In mikrosatelliteninstabilen Magentumoren und kolorektalen Tumoren wurden ebenfalls Mutationen im *SEC63*-Gen gefunden (Mori et al., 2002). Auch der HNPCC („hereditary non polyposis colorectal cancer“) assoziierte Dünndarmkrebs ist durch Mutationen in diesem Gen gekennzeichnet (Schulmann et al., 2005). Als Ursache des Marinesco-Sjögren-Syndrom (MSS) wurden Mutationen im *SILI*-Gen nachgewiesen (Anttonen et al., 2005; Senderek et al., 2005; Zoghbi, 2005). Durch oben genannte Mutationen kommt es zu Störungen in einem der wichtigsten Schritte der Biosynthese von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen.

Da Sec62, wie die vorher aufgeführten Proteine, vermutlich am Proteintransport beteiligt ist (Müller et al., 2010b), wurde überprüft, ob in Prostatakarzinomzelllinien Mutationen in diesem Gen vorliegen. Dazu wurde die kodierende DNA-Sequenz des *SEC62*-Gens in den Prostatakarzinomzelllinien PC3, LNCaP und DU145 sowie DNA aus Lymphozyten von zwei gesunden Probanden sequenziert. Bei der Auswertung der erhaltenen Sequenzen fanden sich keine Mutationen in den Exonsequenzen der Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC3 im Vergleich zu gesunden Probanden bzw. zu

der in der Datenbank hinterlegten Sequenz. Somit wurde ausgeschlossen, dass Mutationen in den Exonsequenzen des *SEC62*-Gens für eine veränderte Funktion von Sec62 in den Prostatakarzinomzelllinien verantwortlich sind. Allerdings könnten Mutationen in regulatorischen Elementen wie der Promotorregion, Exon-Intronübergänge oder Gen-Dosis-effekte eine Rolle spielen. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Dadurch dass die wenigen Zelllinien möglicherweise nicht repräsentativ für alle Prostatakarzinome sind, ist des Weiteren eine Untersuchung vieler Patientengewebe notwendig, um eventuell vorhandene Mutationen zu identifizieren.

Auswirkungen möglicher Mutationen im *SEC62*-Gen

Müller et al. (2010) konnten zeigen, dass Sec62 über basische Sequenzen in seiner N-terminale zytosolischen Domäne am Tunnelausgang von Ribosomen binden kann und die Initiation der Translation hemmt (Müller et al., 2010b). Eine „loss of function“ Mutation im basischen Sequenz-Motiv von *SEC62* könnte dazu führen, dass Sec62 nicht mehr an Ribosomen binden kann und somit die Translation nicht mehr reguliert wird. Folglich könnten somit verstärkt Proteine translatiert werden, welche die Migration bzw. die Invasion fördern. Da Sec62 bei der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase eine Rolle zu spielen scheint (Greiner et al., 2011b) könnte eine Mutation in der Sequenz, die für die Bindung von Sec63 verantwortlich ist, dazu führen, dass die Bindung zu Sec63 verstärkt und dadurch BiP/GRP78 effizienter zum Sec61-Komplex geleitet wird. Dadurch würde BiP/GRP78 den Sec61-Kanal von der luminalen Seite verschließen, was zu einem effizienteren Verschluss des Kanals von der luminalen Seite führen würde. Denkbar wäre auch eine Rolle von Sec62 bei der UPR-Induktion insbesondere durch Substanzen wie Thapsigargin, die über eine Störung der Kalziumhomöostase zum ER-Stress führen. Hier wäre es vorstellbar, dass – wenn für diese regulatorische Funktion die Interaktion mit Sec63 wichtig wäre – eine Mutation im vorher genannten Sequenzmotiv zu einer Störung der Interaktion und damit der UPR-Induktion führen würde. Dies könnte in der Folge einen Wegfall der zur Induktion der Apoptose führenden Signalwege und damit einer erhöhten Stresstoleranz bei Tumorzellen führen.

4.1.3 Erhöhte Sec62-Proteinmenge in Tumoren

Bereits 2006 konnten Jung et al. in 100% der untersuchten Prostatakarzinome eine Überexpression von *SEC62* detektieren (Jung et al., 2006). Die Arbeit von Greiner et al. 2011 zeigte eine starke Korrelation zwischen erhöhter Sec62-Proteinmenge und zunehmender Dedifferenzierung von Prostatakarzinomzellen (Greiner et al., 2011a). Der erhöhte Sec62-Proteingehalt findet sich insbesondere in fortgeschrittenen Tumoren (Gleason Score ≥ 7 , 56%) und pT3b Tumoren, welche die muskuläre Samenblasenwand infiltrieren. Somit könnte die Überexpression mit einer Verschlechterung der Prognose für die Patienten und mit einer gesteigerten Tumoraggressivität assoziiert sein.

In dieser Arbeit wurde erstmals der Sec62-Proteingehalt mithilfe von Multi-Tumor-Gewebearrays an unterschiedlichen Tumorentitäten analysiert. In diesem Rahmen wurde auch untersucht, ob der Sec62-Proteingehalt als Tumormarker in der Diagnostik Verwendung finden könnte. Als Hochdurchsatzverfahren ist der Multi-Tumor-Gewebearrays ein ideales Werkzeug zur gleichzeitigen Erfassung der Synthese eines Proteins in unterschiedlichen Gewebearten oder der Analyse des Synthesemusters unterschiedlicher Malignitätsgrade einer Tumorentität. Die Grundlage dieser Technik lieferten Battifora et al. (1986). Erstmals wurden gewonnene Gewebeproben von verschiedenen Präparaten gemeinsam in einen neuen Paraffinblock eingebracht, wodurch man die Möglichkeit erhielt große Patientenkollektive auf Veränderungen von Normal- und Tumorgewebe auf DNA-, RNA- oder Proteinebene zu untersuchen (Battifora, 1986). Durch Weiterentwicklungen dieser Technik können heute bis zu 1000 Gewebeproben simultan auf einem Objektträger immunhistochemisch untersucht werden (Kononen et al., 1998). Es lassen sich an Tumor-Microarrays (TMA) nicht nur analytische Verfahren wie Immunhistochemie, sondern auch molekulargenetische Verfahren wie z.B. FISH, *in situ*-PCR, *in situ*-RT-PCR und RNA-Hybridisierung durchführen. Ein Vorteil dieser Technik besteht darin, dass für alle Gewebeproben identische Versuchsbedingungen herrschen, so dass die Ergebnisse durch methodische Unregelmäßigkeiten weitestgehend unbeeinflusst bleiben. Durch Anfertigung serieller TMA-Schnitte besteht die Möglichkeit, eine große Zahl von identischen Gewebearealen z.B. auf Co-Expressionen zu untersuchen, was einen weiteren Vorteil dieser Technik darstellt. Probleme zeigen sich jedoch bei histologisch sehr heterogenem Tumormaterial, wie im Falle des Prostatakarzinoms. Hier stellt sich die Frage, ob die aus den Tumorböcken für die Herstellung der Multi-Tumor-Gewebearrays herausgestanzten Gewebezyylinder die genetische bzw. biologische Charakteristik des

Gesamtumors repräsentieren können. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen ist dieses Verfahren trotzdem ein vielversprechendes Werkzeug zur Analyse des Expressionsmusters in Geweben. Schon 1999 untersuchten Bubendorf et al. unter Verwendung von Gewebe-Microarrays Prostatakarzinome mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Alterationen des *c-MYC*-Onkogens und fanden eine Zunahme der Genkopienzahl des Onkogens, mit dem Nachweis von Genamplifikationen bei metastasierten Prostatakarzinomen (Bubendorf et al., 1999).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen wurde ein Multi-Tumor-Gewebearray aus dem Institut für Pathologie der Universität Basel zur Verfügung gestellt. Die insgesamt 2107 auswertbaren Gewebeslots verteilten sich auf sechs Arrays. Zusammengesetzt war der Array aus Primärtumoren von 55 verschiedenen Tumorentitäten und deren Subtypen sowie 132 Proben aus Normalgeweben. Differenziert wurde zwischen Sec62 positiven und negativen Geweben. Bei der Auswertung der Slots trat in einigen Fällen eine Interobserver-Variabilität auf, wobei diese durch erneute Beurteilung aufgehoben wurde.

Die Auswertung des Arrays bestätigte die Ergebnisse unserer Kooperationspartner der AG Grobholz (Institut für Pathologie, Uniklinik des Saarlandes), die in 50% aller untersuchten Prostatakarzinomgewebe Sec62 nachweisen konnten (Greiner et al., 2011a). Infolgedessen kann die Verwendung des Sec62-Proteingehaltes als diagnostischer Marker beim Prostatakarzinom ausgeschlossen werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass Sec62 als prognostischer Marker zur Unterscheidung zwischen einem niedrig malignen Tumor und einem aggressiven, metastasierenden Tumor, dienen könnte. Um diese Verwendungsmöglichkeit von Sec62 zu testen, müssten in zukünftigen Studien größere Patientenkollektive auf ihren Sec62-Proteingehalt untersucht werden.

Die vielversprechendsten und aussichtsreichsten Ergebnisse der Arrayuntersuchung lieferte die Auswertung der Lungen- und Schilddrüsengewebe. Hier war es möglich, eindeutig zwischen Tumor- und Nicht-Tumorgewebe zu unterscheiden. In sämtlichen Normalgeweben der Lunge ließ sich kein Sec62 detektieren, dagegen zeigten 93% - 97% aller untersuchten Bronchialkarzinomsubgruppen einen erhöhten Sec62-Proteingehalt. Spannend daran ist, dass Pelosi et al. (2007) in Lungenkarzinomen eine 3q26 Amplifikation nachweisen konnten (Pelosi et al., 2007), wobei das Kandidatengen bis heute nicht entdeckt wurde. Aufgrund dieser Tatsachen könnte *SEC62* dieses Kandidatengen darstellen und somit eine *SEC62*-Amplifikation für den erhöhten

Proteingehalt in den untersuchten Bronchialkarzinomgewebeproben verantwortlich sein. Die Untersuchung der Schilddrüse lieferte ebenfalls auffallende Ergebnisse. 100% der papillären Karzinome und 87% der follikulären Karzinome der Schilddrüse zeigten eine Sec62-Färbung, wohingegen in nur 19% der nicht-malignen Adenome und 14% des Normalgewebes der Schilddrüse eine Sec62-Färbung nachgewiesen werden konnte. Sec62 stellt sich in Anbetracht dessen als vielversprechender diagnostischer Marker bei diesen Tumorentitäten dar, wobei die Ergebnisse durch weitere Studien validiert werden müssen.

Darüber hinaus ließen sich durch die immunhistochemische Sec62-Färbung Hodentumore von Nichttumorgewebe abgrenzen. Ebenfalls war es mittels Antikörperfärbung möglich, Pankreastumore von Pankreasnormalgewebe zu differenzieren. Im Gegensatz zum Lungen- und Schilddrüsenkarzinom konnte Sec62 in nur 9% der Pankreastumore, jedoch in 88% der Normalgewebe nachgewiesen werden. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich im Hodengewebe. Hier wurde in 88% des Normalgewebes Sec62-Signale gefunden und in allen untersuchten Seminomen und Nicht-Seminomen erfolgte kein Nachweis von Sec62. Aus dieser Untersuchung lässt sich ebenso schließen, dass die Sec62-Antikörperfärbung auch hier zur Differenzierung zwischen Nicht-Tumorgewebe und Tumorgewebe bei Hodenkarzinomen und Pankreastumoren eingesetzt werden könnte. Dazu ist jedoch die Analyse einer größeren Anzahl von Karzinom- und Normalgeweben eine notwendige Voraussetzung, um die Wertigkeit von Sec62 als diagnostischen Marker für diese Tumorentitäten zu beurteilen.

4.2 Pathophysiologische Funktionen von Sec62 in Tumoren

4.2.1 Proteinsynthese von Sec62 nach ER-Stress

Ein Teil dieser Arbeit befasst sich damit, die tumorassoziierte Funktion von Sec62 aufzuklären und damit die Frage zu beantworten, wodurch es in Prostatakarzinomgeweben, die keine *SEC62*-Amplifikation aufzeigen, zu einem erhöhten Sec62-Proteingehalt kommt und welche Folgen die erhöhte Proteinmenge für die Zelle hat. Sec62 ist mit dem Sec61-Translokon in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, welcher für den Transport von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen verantwortlich ist (Rapoport, 1986), assoziiert. Da die Menge der ER-Proteine GRP170 und BiP/GRP78, die ebenfalls am Proteintransport ins ER beteiligt sind, durch ER-Stress bzw. Induktion der UPR („unfolded protein response“) stark erhöht wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Sec62 unter UPR-Kontrolle steht und der erhöhte Sec62-Proteingehalt im Prostatakarzinomgewebe durch ER-Stress verursacht wird.

Die Synthese und korrekte Faltung sekretorischer und membran- sowie organell-spezifischer Proteine sind wichtige zelluläre Prozesse, die mit dem ER assoziiert sind. Im Lumen des ER müssen bestimmte Bedingungen herrschen, damit ein effizienter Ablauf dieser Vorgänge gewährleistet ist. Um die Bildung von Disulfidbrücken zu begünstigen, findet man hier, neben einer oxidierenden Umgebung, hohe Ca^{2+} - und ATP-Konzentrationen. Aus diesem Grund reagiert das ER besonders sensitiv gegenüber Abweichungen, die die Ca^{2+} -Konzentration, den Redox-Status oder die zelluläre Energieversorgung betreffen. Als Auswirkung dieser Veränderungen akkumulieren ungefaltete Proteine im ER-Lumen. Infolge dessen kommt es zur Induktion von ER-Stress, welcher einen Signaltransduktionsweg, der als UPR bezeichnet wird, aktiviert.

Wie schon unter Kapitel 1.3.3 ausführlich beschrieben ist das ER-Chaperon BiP/GRP78 unter Normalbedingungen an verschiedene Rezeptorproteine der ER-Membran gebunden (Hendershot, 2004; Kimata et al., 2004; Morris et al., 1997). Kommt es zur Anhäufung ungefalteter Proteine im Lumen des ER, dissoziiert BiP/GRP78 von diesen Rezeptoren ab und bindet stattdessen ungefaltete Proteine. Durch die Dissoziation von BiP/GRP78, werden die ungebundenen Rezeptoren aktiviert und leiten die UPR ein. Die UPR-Signalkaskade löst verschiedene Prozesse aus: Verminderung der Translationsrate, Induktion der Translation von ER-Chaperonen (Faltungshelfer) und Stressproteinen sowie die Beseitigung der falsch gefalteten Proteine durch retrograden Transport oder Abbau

durch das Proteasom (Lai et al., 2007). Bei persistierendem ER-Stress wird der Zellzyklus arretiert (Brewer et al., 1999). Kann die UPR die Zelle nicht zu einem normalen physiologischen Zustand zurückführen, so wird die Apoptose eingeleitet (Marciniak et al., 2004).

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Sec62-Proteinsynthese nach Inkubation mit den ER-Stressinduktoren, Tunicamycin und Thapsigargin, an den Prostatakarzinomzelllinien PC3, LNCaP und DU145, wobei Hautfibroblasten als Nicht-Tumor-Kontrolle dienten. Der Nachweis von BiP/GRP78 diente in diesem Versuch als Indikator für die UPR. In allen mit ER-Stressoren behandelten Zellen war eine erhöhte BiP/GRP78-Proteinmenge detektierbar. Dies zeigt, dass in allen untersuchten Zelllinien ER-Stress induziert wurde und als Reaktion darauf die Aktivierung der UPR-Signalkaskade erfolgte. Der Sec62-Gehalt der behandelten Prostatakarzinomzelllinien stieg jedoch nicht aufgrund von ER-Stress. Folglich steht Sec62 nicht unter UPR-Kontrolle. Daraus resultierend kann ausgeschlossen werden, dass ER-Stress für die Überexpression von *SEC62* bzw. den erhöhten Proteingehalt im Prostatakarzinomgewebe verantwortlich ist und andere Pathomechanismen ursächlich sein müssen. Gleichzeitig kann aber auch ausgeschlossen, dass eine allgemeine ER-Expansion für den erhöhten Sec62-Proteingehalt verantwortlich ist, da Gene, die für andere ER-Membranproteine kodieren wie Sec61 α , Sec61 β oder Sec63 keine Überexpression in den analysierten Tumorzelllinien zeigten (Greiner et al., 2011a).

4.2.2 Erhöhter Sec62-Proteingehalt in Zellen schützt vor Thapsigargin induzierter Apoptose

Das Vorkommen natürlicher und Zytostatika-induzierter Resistenzmechanismen hat bei der Behandlung maligner Tumore einen entscheidenden Einfluss auf den Therapieerfolg. Demzufolge ist ein Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der Chemoresistenz notwendig, um Patienten zukünftig effektivere Therapien anbieten zu können. Es wurde gezeigt, dass auch Amplifikationen von Genen zur Resistenzentwicklung beitragen können. So entsteht zum Beispiel durch Gewinn des *DHFR*-Gens eine Resistenz gegen Methothrexat (Snijders et al., 2008) bzw. durch Amplifikation von *TYMS* eine Resistenz gegen 5-Fluorouracil (Wang et al., 2004).

Obwohl die meisten Chemotherapeutika ganz unterschiedliche chemische Eigenschaften aufweisen, induziert eine Vielzahl von ihnen den Zelltod durch die Aktivierung apoptotischer Signalwege (Nguyen und Hussain, 2007). Eine Möglichkeit die

zur Induktion von Apoptose führen kann, besteht darin ER-Stress auszulösen. Kann dieser nicht kompensiert werden, sind Signaltransduktionswege, die durch PERK, ATF6 und IRE1 aktiviert werden, in der Lage Signale zu vermitteln, die die Apoptose einleiten (Szegezdi et al., 2006).

Da Prostatakarzinompatienten einen vermehrten Sec62-Proteingehalt und mRNA-Gehalt aufweisen (Greiner et al., 2011a; Jung et al., 2006), ist es wichtig zu wissen, welche Auswirkungen diese erhöhte Expression bzw. Synthese auf eine mögliche Therapie hat. Es muss untersucht werden, wie diese Zellen auf Therapeutika reagieren, bzw. welche Zellen davor geschützt sind oder Resistenzen aufweisen. Da Thapsigargin und seine Derivate in der Literatur als potentielle Therapeutika für das Prostatakarzinom diskutiert werden (Christensen et al., 2009; Denmeade und Isaacs, 2005; Denmeade et al., 2003; Isaacs, 2005; Vander Griend et al., 2009), wurde der Einfluss unterschiedlicher *SEC62*-Expressionen der Prostatakarzinomzelllinien DU145, LNCaP und PC3 auf eine Behandlung mit Tunicamycin und Thapsigargin untersucht. Dabei wurde DU145, aufgrund der gegenüber PC3- und LNCaP-Zellen 4,8-Fachen Expression von *SEC62* (2-fach erhöhten Sec62-Proteingehaltes (Greiner et al., 2011b)), als Modell für Gewebe mit erhöhter *SEC62*-Expression untersucht. PC3 und LNCaP dienten als Modell für Gewebe mit geringerer *SEC62*-Expression (bzw. Proteingehalt). In LNCaP-Zellen wurden zudem die Effekte auf hormonabhängige Zelllinien untersucht. Tunicamycin wurde als Kontrollstressor eingesetzt, da es nicht die Ca^{2+} -Homöostase beeinflusst, sondern die N-Glykosylierung von Proteinen im ER-Lumen inhibiert (Leavitt et al., 1977), wodurch es zur Akkumulation von Proteinen kommt, die letztendlich zur Induktion von ER-Stress führt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die erhöhte Expression von *SEC62* in DU145-Zellen die Zellen vor Thapsigargin-induzierter Apoptose schützt, wohingegen die Prostatakarzinomzelllinien PC3 und LNCaP, die ein geringeres Proteinlevel von Sec62 aufweisen, eine starke Apoptoseinduktion zeigen. Hinsichtlich dessen könnte der Therapieerfolg bzw. die wachstumshemmende Wirkung beim Einsatz von Thapsigargin und seinen Derivaten vom Sec62-Proteingehalt in Prostatatumoren abhängen. Patienten mit erhöhtem Sec62-Gehalt (bzw. *SEC62*-Expression) im Tumor würden daher von einer solchen Therapie keinen Nutzen ziehen. In diesem Zusammenhang könnte der Sec62-Proteingehalt oder Expressionsstatus als prädiktiver Marker dienen.

Sec62 scheint somit in der von der UPR vermittelten Apoptose, die durch Thapsigargin induziert wurde, eine Rolle zu spielen und könnte somit bei der Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase im ER während der Stressantwort mitwirken. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Tatsache, dass *SEC62* depletierte Zellen lediglich gegenüber Thapsigargin, nicht aber gegenüber Tunicamycin sensitiv reagieren, was möglicherweise aufgrund einer veränderten Ca^{2+} -Homöostase der Zellen durch *SEC62*-„knock down“ hervorgerufen wird (Greiner et al., 2011b).

Modell zur pathophysiologischen Funktion von Sec62 in Tumoren

Das ER spielt nicht nur bei der Proteinbiosynthese eine Rolle, sondern dient auch als intrazellulärer Kalziumspeicher und hat somit auch eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion, z.B. bei der Apoptose. Im Ruhezustand der Zelle besteht über der Membran des ER ein Kalzium-Gradient. Dieser Gradient entsteht aufgrund eines basalen Kalzium-Leckstroms ins Zytosol, dem die ER-ständige SERCA-ATPase entgegenwirkt, indem sie aktiv Kalzium aus dem Zytosol ins ER-Lumen transportiert. An diesem passiven Kalzium-Ausstrom wurde eine Beteiligung eines Kationenkanals (Giunti et al., 2007) und eines Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Kanals (Beauvois et al., 2004; Wissing et al., 2002) postuliert. Lang et al. konnten 2011 die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen, dass es sich beim Sec61-Komplex um einen weiteren Kalziumausstromkanal handelt, bestätigen (Lang et al., 2011; Ong et al., 2007; Van Coppenolle et al., 2004). Unter diesem Gesichtspunkt wäre es denkbar, dass Sec62 in Tumoren (mit erhöhtem Sec62-Proteingehalt) indirekt, über seine Interaktion mit Sec63, BiP/GRP78 zum Sec61-Komplex rekrutiert. Dort könnte BiP/GRP78 den Sec61-Komplex von der ER-luminalen Seite verschließen (Haigh und Johnson, 2002; Hamman et al., 1998) und Sec62 würde somit als Suppressor der Ca^{2+} -Freisetzung wirken. Dies führt dazu, dass der „intrinsic pathway“ der Apoptose nicht ausgelöst wird. Normalerweise wird dieser Pathway durch proapoptotische Signale ausgelöst, was zu einem Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER führt. Aufgrund dessen kommt es zum Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in den Mitochondrien. Dieser bewirkt einen Cytochrom C-Ausstrom, wodurch eine Caspase-Kaskade aktiviert wird und die Zelle apoptotisch wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Sec62 als Sensor für den Kalzium-Ausstrom dient. Sec62 könnte in diesem Modell die Calmodulin-Bindung an den Sec61-Komplex unterstützen, wodurch der Kanal von der zytosolischen Seite verschlos-

sen wird, was ebenfalls verhindert, dass der “intrinsic pathway“ der Apoptose ausgelöst wird (Harsman et al., 2011).

4.2.3 Einfluss der siRNA vermittelten Depletion von *SEC62* auf das Proteom

Unter dem Begriff Proteom versteht man die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem Organismus oder Gewebe synthetisiert werden. Die von O’Farrell und Klose im Jahre 1975 unabhängig voneinander entwickelte hochauflösende 2D-PAGE (2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist immer noch eine der leistungsfähigsten Techniken in der Proteomforschung (Klose, 1975; O’Farrell, 1975). Mit dieser Methode können etwa 2000 verschiedene Proteine aufgetrennt werden (Gorg et al., 2004). Hierbei sind hydrophobe Proteine wie Membranproteine, jedoch schwer zu analysieren. Das hohe Auflösungsvermögen bei der 2D-PAGE wird durch die Kombination der Trennung der Proteine nach dem isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung, IEF) in der ersten Dimension und des Molekulargewichtes (Elektrophorese (Laemmli, 1970)) in der zweiten Dimension erreicht. Die Identifizierung von Proteinen kann mit zwei Ionisierungsverfahren in der Massenspektrometrie (MS) erfolgen, der Matrix-assistierten Laser Desorptions Ionisation (MALDI) (Karas et al., 1985) und der Elektrospray Ionisation (ESI) (Fenn et al., 1989). Der so genannte Peptidmassen Fingerabdruck (PMF) ist eine auf Massenspektrometrie basierende Methode zur Identifizierung von Proteinen. Die Massen der tryptisch gespaltenen Peptide werden dabei mittels MALDI-MS bestimmt. Durch Vergleich der erhaltenen Massen mit den Massen theoretischer Spaltungen aller in Frage kommenden Proteine einer Datenbank können die untersuchten Proteine identifiziert werden.

Eine der modernsten Methoden in der Proteomanalyse ist die so genannte 2D-Differenz-Gelelektrophorese (2D-DIGE). Hiermit können die Proteome zweier Proben direkt miteinander verglichen werden. Die Proteinlösungen verschiedener Proben werden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei werden alle Proteine an ihren Lysinresten kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff gebunden (Shaw et al., 2003). Diese Technik eignet sich sehr gut für die Analyse komplexer biologischer Netzwerke. Identische Ausgangsbedingungen für den Versuchsaufbau sind wichtige Voraussetzungen für die differentielle Proteomanalyse. Dabei stellen genetisch identische Zelllinien optimale

Untersuchungsobjekte für eine Proteomanalyse dar. Sie sollten sich möglichst in wenigen Parametern unterscheiden.

Um aufzuklären welche Rolle Sec62 bei der ER-Stressantwort beim Prostatakarzinom spielt, wurden die Proteome von *SEC62* „knock down“ Zellen mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen verglichen. Die Untersuchung erfolgte exemplarisch an der Prostatakarzinomzelllinie PC3. Durch den quantitativen Vergleich der Proteome von *SEC62* „knock down“ Zellen und Kontrollzellen lassen sich, aufgrund eines differentiellen Erscheinungsbilds, Rückschlüsse über mögliche direkte oder indirekte Interaktionen dieses Proteins innerhalb des Proteoms ziehen. Beim Vergleich der Proteome wurden differentiell regulierte Proteine gefunden, die in zellulären Prozessen wie „*translational elongation*“ (GO: 0006414), „*negative and positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle*“ (GO: 0051436 und GO: 0051437), „*negative regulation of cell proliferation and apoptosis*“ (GO: 0008285 und GO: 0043066) und „*anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process*“ (GO: 0031145) mitwirken.

Schon Müller et al. brachten Sec62 mit der Translation von Proteinen in Zusammenhang. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Sec62 über zwei basische Oligopeptidmotive am Tunnelausgang (bzw. in dessen Nähe) des Ribosoms binden kann, was zum Translationsstop führt (Müller et al., 2010b). Die hier gewonnenen Ergebnisse stellen bestenfalls einen Hinweis dar, dass der Sec62-Proteingehalt Einfluss auf ER-Stress assoziierte zelluläre Signalwege hat. Wahrscheinlich bieten nur weiterführende biochemische Experimente die Möglichkeit, die Funktion von Sec62 in der Stressantwort zu klären.

Durch diese Proteomuntersuchung wurden jedoch zwei Proteine identifiziert, die ebenfalls wie Sec62 eine Überexpression in Tumoren aufzeigen und durch *SEC62*-Depletion herunterreguliert werden. Das erste Protein ist das PSM1 („proteasome activator complex subunit“) und ist mit dem „*anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process*“ Pathway assoziiert. Zhang et al. (2007) konnten in ihren Analysen nachweisen, dass dieses Protein im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus erhöht vorliegt (Zhang et al., 2007). Mit dem Pathway „*negative regulation of apoptosis*“ ist das zweite regulierte Protein NME23 (oder Nm23/NME1) assoziiert. NM23 wird in Schilddrüsenkarzinomen und Neuroblastomen auf mRNA-Ebene erhöht exprimiert (Leone et al., 1993; Zou et al., 1993). Auch für Sec62 wurde durch Untersuchungen in

dieser Arbeit an Schilddrüsenkarzinomen eine erhöhte Proteinmenge nachgewiesen. In der DIGE-Analyse wurden weitere Proteine identifiziert, die mit Tumoren assoziiert sind. Diese sind jedoch anderen Pathways zugeordnet. Zu diesen Proteinen zählen die Annexine und S100-Proteine, im speziellen S100A8, S100A9 und AnxA1. Dabei beschrieb Oh et al. 2004 AnxA1 als „antibody-target“ zur Therapie von Lungenkrebs (Oh et al., 2004) und die Kalzium bindenden Proteine S100A8 und S100A9 wurden als neue diagnostische Marker beim Prostatakarzinom charakterisiert (Hermani et al., 2005).

4.2.4 Sec62 ist essentiell für das invasive Wachstum von Tumorzellen

Da 90% der Krebspatienten an Metastasen sterben und nicht am Primärtumor, ist die Entwicklung von Hemmstoffen der Tumorerkrankung und Metastasierung ein vorrangiges Ziel der Krebsforschung. Dabei stellen die Gene bzw. Proteine, welche den Tumorzellen die Fähigkeit verleihen invasiv zu wachsen, bedeutende Ansatzpunkte innovativer Therapien dar.

In Anbetracht der Tatsache, dass der erhöhte Proteingehalt von Sec62 im Prostatakarzinom mit der Tumorprogression assoziiert ist (Greiner et al., 2011a), besteht die Möglichkeit, dass Sec62 eine Funktion bei der Metastasierung einnimmt. Um die pathophysiologische Funktion von Sec62 bei der Invasion zu untersuchen, wurde die mRNA in der androgenunabhängig wachsenden PC3-Zelllinie mittels siRNA abgebaut und das invasive Wachstum in einem Standardinvasions-Modell analysiert. Als Arbeitsgrundlage diente das weitverbreitete Tumorinvasionssystem von BD (Becton Dickinson).

Das gezielte Ausschalten von *SEC62* führt zu einem starken Rückgang des invasiven Wachstums bei PC3-Zellen. Um Nebeneffekte der Transfektion auszuschließen wurde der Einfluss zweier verschiedener siRNAs gegen *SEC62* auf das Invasionspotential der Prostatakarzinomzelllinie untersucht. Beide zeigten den gleichen Effekt auf das Invasionsverhalten der Zellen. Die gleichzeitige Überprüfung des zellbiologischen Verhaltens wie „viability“, Proliferationsfähigkeit und Nekrose, der *SEC62* transfizierten Zellen ergab keine bemerkenswerte Schädigung der Prostatakarzinomzellen. Dies zeigt, dass Sec62 essentiell für die Invasionsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie ist, jedoch nicht für deren Wachstum.

Durch Echtzeitüberwachung mittels des xCELLigence-Systems (Roche) wurde nachgewiesen, dass durch *SEC62* „knock down“ spezifisch das Migrationspotential von

Tumorzelllinien reduziert wird, während die Depletion anderer ER-Proteine wie Sec63 und ERj1 keinen Effekt auf das Migrationspotential hatte (Greiner et al., 2011a).

Im Weiteren wurde eine Auswahl verschiedenster Tumorentitäten, repräsentiert durch Tumorzelllinien, untersucht, um zu analysieren, ob die Reduktion des Invasionspotentials durch *SEC62*-Depletion ausschließlich bei Prostatakarzinomzellen auftritt. Analysiert wurden zwei Lungenkarzinomzelllinien, da *SEC62* in Lungenkarzinomen überexprimiert wird, dort bei der Tumorgenese eine Rolle zu spielen scheint und hier möglicherweise als diagnostischer Marker eingesetzt werden könnte. Die Fibrosarkomzelllinie HT1080 wurde in die Analyse mit einbezogen, weil diese Zelllinie *SEC62* überexprimiert und stark invasiv wächst. TX3868, eine Glioblastomzelllinie, ging in die Untersuchung wegen ihrer Eigenschaft ein, schnell zu wachsen und das umliegende Gewebe zu infiltrieren. Des Weiteren wurde T24, eine Blasenkarzinomzelllinie, überprüft, da sie ein hohes Invasionspotential zeigt und gleichzeitig eine *SEC62*-Amplifikation aufweist, die sich jedoch nicht in einer Überexpression auswirkt. In allen untersuchten Zelllinien konnte ein deutlicher Rückgang des Invasionspotentials durch „knock down“ von *SEC62* verzeichnet werden, ohne dass die „viability“ bzw. Proliferation oder Nekrose der Zellen stark beeinflusst wurde. Durch die geringere „silencing“-Effizienz in den Zelllinien TX3868 und HT1080, was sich in einer hohen Sec62-Restproteinmenge manifestierte, zeigte sich auch ein geringerer Rückgang der Invasionsfähigkeit (54% - 75% im Vergleich zu Kontroll siRNA transfizierten Zellen). Um einen deutlicheren Rückgang des Invasionspotentials in diesen Zelllinien zu erlangen, müsste die „silencing“-Effizienz gesteigert werden.

Zusammenfassend konnte erstmals gezeigt werden, dass Sec62 eine wichtige Rolle beim Prozess des invasiven Wachstums humaner Karzinome spielt, was dazu führt, dass durch *SEC62* „knock down“ das Invasionsverhalten stark inhibiert wird. Es stellt sich aber die Frage, welche Aufgabe Sec62 in der Tumorinvasion zukommt. Wie in der Einleitung schon erwähnt, ist die genaue Funktion von Sec62 in eukaryotischen Zellen bis heute unklar. Ihm wird aber eine Rolle in der Biogenese von Membran- sowie sekretorischen Proteinen zugeschrieben. In diesem Zusammenhang könnte das Ausschalten von *SEC62* die Biogenese von Proteinen, die für das invasive Verhalten der Tumorzellen verantwortlich sind, negativ beeinflussen. Davon könnten Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. Integrine (Transmembranproteine) betroffen sein. Diese Proteine sind in der Literatur als tumorassoziiert beschrieben und zeigen im Tumor ein verändertes Expressionsmuster auf

(Mercurio et al., 2001). So ist zum Beispiel ist die Expression von $\alpha 2\beta 1$ - oder $\alpha 6\beta 1$ -Integrinen im Melanom erhöht (Danen et al., 1993; Ramsay et al., 2007). Integrine übermitteln molekulare Informationen der zellulären Umgebung, welche die Proliferation, Genexpression, das Überleben und die Migration beeinflussen (Springer, 1990).

Einen weiteren Einfluss könnte das Ausschalten von *SEC62* auf Matrixmetalloproteinasen (MMPs) nehmen, deren Expression mit der Malignität der Tumorzellen korreliert (Karadag et al., 2008; Yamada et al., 2010; Zhang et al., 2008). Unter anderem sind diese MMPs für die tumorzellspezifisch verstärkten proteolytischen Prozesse zur lokalen Auflösung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix bei der Invasion der Tumorzellen verantwortlich (Jones und De Clerck, 1982; Liotta, 1986). Durch die Depletion von *SEC62* könnte verhindert werden, dass die an der Invasion von Tumoren beteiligten Proteine, über das Translokon in das ER gelangen, dort gefaltet, modifiziert und sezerniert bzw. an ihren Wirkungsort transportiert werden. Somit wird nicht nur die Degradation der EZM inhibiert, da keine MMPs sezerniert werden, sondern es könnte auch die Motilität der Tumorzellen, durch das Fehlen von Integrinen, gehemmt werden. Um eine genaue Aussage darüber zu treffen, ob das Ausschalten von *SEC62* zu diesem entwickelten Modell führt, müsste die Konzentration bzw. Sezernierung dieser Proteine nach *SEC62*-Reduktion mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen oder unbehandelten Zellen verglichen werden.

Die in dieser Arbeit benutzte Methode der RNA-Interferenz hat sich innerhalb der letzten Jahre zu einer der bedeutungsvollsten Techniken in der biomedizinischen Forschung entwickelt. Sie stellt eine einfache und effiziente Möglichkeit zur Inhibition der Expression eines spezifischen Gens dar. Man sieht in ihr die Basis für eine neue Medikamentenplattform, die breite Anwendungsmöglichkeiten für die Behandlung vieler verschiedener Krankheiten wie viraler Infektionen (Morrissey et al., 2005) und Krebserkrankungen (Davis et al., 2010), bieten könnte (de Fougères et al., 2007). Inzwischen befinden sich schon einige Medikamente auf siRNA-Basis in der klinischen Prüfung. 2004 wurde die erste RNAi basierte Studie mit einer siRNA gegen VEGF („vascular endothelial growth factor“) durchgeführt, wodurch bei Patienten mit altersbedingter Degeneration der Macula (ADM) die Neovaskularisation aufgehalten werden soll (Vaishnav et al., 2010). 2007 wurde eine klinische Studie der Phase I zur Behandlung der HBV-Infektion mit einem Vektor mit 4 shRNAs gegen verschiedene Segmente des viralen Genoms begonnen.

Ein weiteres Einsatzgebiet der RNAi ist die Krebsforschung. Ziel sind Gene, die für die Metastasierung verantwortlich sind bzw. Onkogene, die zur ungehemmten Proliferation von Tumorzellen führen. Diese Technik wird auch eingesetzt, um resistente Tumorzellen wieder für Chemotherapeutika zu sensitivieren. In einer Phase I-Studie zur Behandlung von soliden Tumoren wird eine unmodifizierte siRNA gegen die M2-Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase eingesetzt, die über spezielle Nanopartikel transportiert wird (Vaishnav et al., 2010). Die größte Herausforderung für den Erfolg der RNAi-Technologie stellt das Einschleusen („delivery“) der hochwirksamen siRNA-Moleküle in das Zytoplasma der Zielzellen dar. Derzeit sind viele Forschergruppen um eine Lösung dieses Problems bemüht (Bonetta, 2009; Christie et al., 2010). Bedingt durch ihre mehrfach negative Ladung passieren Oligonukleotide nur sehr schlecht die hydrophobe Zellmembran. Aufgrund dessen wurden biokompatible Verfahren entwickelt zum Transport von siRNAs. Eine Strategie besteht darin lipophile Substanzen direkt an die siRNA zu koppeln. Beim zelltypspezifischen Transport besteht die Möglichkeit die siRNA an Antikörper zu koppeln, die Oberflächenmoleküle auf speziellen Zellen erkennen. Eine deutlich effizientere Form ist jedoch der Transport mittels viraler Transportsysteme. Ein weiteres Ziel vieler Arbeiten stellt die Stabilisierung von siRNA dar. Gelöst wird dieses Problem durch chemische Modifikation der siRNAs, wodurch die Resistenz gegenüber nukleolytischem Abbau erhöht wird. Mittels Modifikationen kann die Halbwertszeit der siRNA verlängert bzw. neue Funktionalitäten eingeführt werden. Der Einbau lipophiler Reste wie 12-Hydroxylaurylsäure und Cholesterin kann die zelluläre Aufnahme der siRNA verbessern (Lorenz et al., 2004). Modifikationen mit Phosphorothioath werden ebenfalls zur Stabilisierung eingesetzt. Dabei wird ein Nicht-Brücken-Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom substituiert. Phosphorothioathe sind sehr stabil gegen Nukleasen. Ein großer Nachteil dieser chemisch synthetisierten siRNAs besteht jedoch darin, dass ihre Wirkung nur wenige Tage anhält, da die siRNAs abgebaut und durch Zellteilung ausverdünnt werden. „off-target“ Effekte, durch die Ähnlichkeit des Sense-Stranges der siRNA zu anderen Genen, sind ebenfalls ein Problem, weil der Abbau der mRNA von Nicht-Zielgenen die Folge ist.

Dennoch zeigt sich *SEC62* als vielversprechender Kandidat für eine innovative Therapie mittels RNAi-Technik, um die Invasion von Tumoren zu verhindern. Schon 2006 wurden erste Patienten mit Glioblastoma multiforme in einer klinischen RNAi-Studie behandelt (Zukiel et al., 2006). Die Prognose für die Betroffenen ist äußerst schlecht, da

diese Hirntumore mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht therapierbar sind. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass durch die RNAi-Behandlung bei mehreren Patienten das Wiederauftreten operativ entfernter Glioblastome verhindert werden konnte.

Die Übertragung der *SEC62* „knock down“ Zellen in ein orthotopes Mausmodell könnte eine weiterführende Studie darstellen. Ein Tumormodell an der Nacktmaus wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich etabliert (Saar et al., 2010). Es bleibt zu untersuchen, ob die implantierten *SEC62* depletierten Tumorzellen noch dazu fähig sind Metastasen im Tier zu bilden. Voraussetzung dafür wäre jedoch die Etablierung einer stabilen *SEC62* „knock down“ Tumorzelllinie, da die transiente Transfektion mit *SEC62* siRNA ihren Maximalwert nach 72 h erreicht hat. Für dieses Modell ist jedoch eine Zelllinie notwendig, welche langfristig kein *SEC62* exprimieren kann, da sich der Beobachtungszeitraum über mehrere Wochen erstreckt. Um das RNA-„silencing“ zu verlängern, können statt der chemisch synthetisierten siRNA auch intrazellulär exprimierte, kurze Haarnadel-RNAs („short hairpin RNAs“, shRNAs) verwendet werden. Diese werden mittels Expressionssystemen kontinuierlich in der Zelle generiert (Shi, 2003). Das Prinzip dieses Systems besteht in der Konvertierung der siRNA in eine DNA-Sequenz, die den Antisense-Strang, eine Schleife und den Sense-Strang kodiert. Diese Matrize wird von einem Vektor aus, unter Kontrolle von RNA-III-Promotoren, intrazellulär transkribiert. Mit diesen shRNA-Expressionsvektoren können stabil transfizierte Zellen generiert werden, die die Expression des *SEC62*-Gens dauerhaft inhibieren. Nach Inokulation der stabil transfizierten Zellen in die Maus besteht jedoch das Problem, dass kein Selektionsdruck durch das vorher zur Selektion benutzte Antibiotikum auf die Zellen wirkt und somit die Möglichkeit besteht, dass der Vektor mit der shRNA verloren geht. Aus diesem Grund sollte ausgetestet werden, wie lange der Vektor ohne Selektionsdruck in den transfizierten Zellen verbleibt. Um dieses Problem zu umgehen könnten Vektoren auf der Basis von retro-, adeno- oder lentivirale Systemen eingesetzt werden, die die Zellen stabil transduzieren. Hier zeigt sich jedoch der Nachteil, dass die Integration ins Genom zufällig ist und unter Umständen wichtige Gene zerstört werden oder die „silencing“-Effizienz je nach Integrationsloкус schwankt.

Fazit:

Diese ergebnisreiche Arbeit kam 1. nur aufgrund des zufälligen Befundes unserer Arbeitsgruppe zustande, die *SEC62* als das Gen mit der höchsten Amplifikationsrate auf Chromosom 3q25-q26 beim Prostatakarzinom identifizierte und 2. der glücklichen Tatsache zustande, dass Sec62 seit mehreren Jahren, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard Zimmermann am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, im Mittelpunkt ihrer Forschungsarbeit steht. Erst durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppen wurde diese Dissertation ermöglicht.

Bei der Charakterisierung von Sec62 als Biomarker zeigen sich sehr vielversprechende diagnostische Verwendungsmöglichkeiten von Sec62 in den Tumorentitäten Lunge, Schilddrüse, Hoden sowie Pankreas. Beim Prostatakarzinom hingegen lässt sich erkennen, dass Sec62 das Potential als prognostischer bzw. prädiktiver Marker besitzt.

Die Studien zur Aufklärung der pathophysiologischen Funktion von Sec62 in Tumoren verdeutlichen, dass Sec62 essentiell für die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten ist. Durch gezieltes Ausschalten von *SEC62* kann das Invasionspotential, in den untersuchten Tumorzelllinien, beachtlich verringert werden.

Weitere durchgeführte Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass Sec62 in ER-Stress assoziierten Signalwegen eine Rolle spielt. Allerdings ist ER-Stress nicht für die erhöhte Sec62-Synthese in Tumorzellen verantwortlich. Ebenso kann eine allgemeine ER-Expansion ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus zeigt sich außerdem eine klinisch relevante Funktion dieses Proteins, da ein erhöhter Sec62-Proteingehalt Zellen vor Thapsigargin induzierter Apoptose schützt.

Literaturverzeichnis

1. Adams J.C. (2001). Cell-matrix contact structures. *Cell Mol Life Sci* 58, 371-392.
2. Al-Kuraya K., Schraml P., Torhorst J., Tapia C., Zaharieva B., Novotny H., Spichtin H., Maurer R., Mirlacher M., Köchli O., Zuber M., Dieterich H., Mross F., Wilber K., Simon R., Sauter G. (2004). Prognostic Relevance of Gene Amplifications and Coamplifications in Breast Cancer. *Cancer Research* 64, 8534-8540.
3. Alameda F., Espinet B., Corzo C., Muñoz R., Bellosillo B., Lloveras B., Pijuan L., Gimeno J., Salido M., Solé F., Carreras R., Serrano S. (2009). 3q26 (hTERC) gain studied by fluorescence in situ hybridization as a persistence-progression indicator in low-grade squamous intraepithelial lesion cases. *Human pathology* 40, 1474-1478.
4. Albertson D.G. (2006). Gene amplification in cancer. *Trends in Genetics* 22, 447-455.
5. Anttonen A.K., Mahjneh I., Hamalainen R.H., Lagier-Tourenne C., Kopra O., Waris L., Anttonen M., Joensuu T., Kalimo H., Paetau A., Tranebjaerg L., Chaigne D., Koenig M., Eeg-Olofsson O., Udd B., Somer M., Somer H., Lehesjoki A.E. (2005). The gene disrupted in Marinesco-Sjogren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone. *Nat Genet* 37, 1309-1311.
6. Aplin A., Juliano R. (1999). Integrin and cytoskeletal regulation of growth factor signaling to the MAP kinase pathway. *J Cell Sci* 112, 695-706.
7. Aubele M., Mattis A., Zitzelsberger H., Walch A., Kremer M., Hutzler P., Höfler H., Werner M. (1999). Intratumoral Heterogeneity in Breast Carcinoma Revealed by Laser-Microdissection and Comparative Genomic Hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics* 110, 94-102.
8. Ayala I., Baldassarre M., Giacchetti G., Caldieri G., Tete S., Luini A., Buccione R. (2008). Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. *J Cell Sci* 121, 369-378.
9. Baker E.A., Bergin F.G., Leaper D.J. (2000). Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. *Br J Surg* 87, 1215-1221.
10. Battifora H. (1986). The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55, 244-248.
11. Bayani J., Selvarajah S., Maire G., Vukovic B., Al-Romaih K., Zielenska M., Squire J.A. (2007). Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Seminars in Cancer Biology* 17, 5-18.
12. Beauvois M.C., Arredouani A., Jonas J.C., Rolland J.F., Schuit F., Henquin J.C., Gilon P. (2004). Atypical Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from a sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3-dependent Ca²⁺ pool in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* 559, 141-156.
13. Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L.M., Harding H.P., Ron D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. 2, 326-332.

14. Birchmeier W., Behrens J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1198, 11-26.
15. Black B.E., Paschal B.M. (2004). Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15, 411-417.
16. Blau M., Mullapudi S., Becker T., Dudek J., Zimmermann R., Penczek P.A., Beckmann R. (2005). ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1015-1016.
17. Blobel G., Dobberstein B. (1975). Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* 67, 852-862.
18. Bolos V., Peinado H., Perez-Moreno M.A., Fraga M.F., Esteller M., Cano A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116, 499-511.
19. Bonetta L. (2009). RNA-Based Therapeutics: Ready for Delivery? *Cell* 136, 581-584.
20. Börgermann C., Rübgen H. (2006). Früherkennung des Prostatakarzinoms. *Dtsch Arztebl* 103, A-2399.
21. Bott S.R., Arya M., Shergill I.S., Williamson M. (2005). Molecular changes in prostatic cancer. *Surg Oncol* 14, 91-104.
22. Brewer J.W., Hendershot L.M., Sherr C.J., Diehl J.A. (1999). Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8505-8510.
23. Brison O. (1993). Gene amplification and tumor progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1155, 25-41.
24. Brodsky J.L., McCracken A.A. (1997). ER-associated and proteasomemediated protein degradation: how two topologically restricted events came together. *Trends in Cell Biology* 7, 151-156.
25. Bubendorf L., Kononen J., Koivisto P., Schraml P., Moch H., Gasser T.C., Willi N., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.-P. (1999). Survey of Gene Amplifications during Prostate Cancer Progression by High-Throughput Fluorescence in Situ Hybridization on Tissue Microarrays. *Cancer Research* 59, 803-806.
26. Bussemakers M.J.G., van Bokhoven A., Verhaegh G.W., Smit F.P., Karthaus H.F.M., Schalken J.A., Debruyne F.M.J., Ru N., Isaacs W.B. (1999). DD3::A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Research* 59, 5975-5979.
27. Calfon M., Zeng H., Urano F., Till J.H., Hubbard S.R., Harding H.P., Clark S.G., Ron D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96.
28. Cano A., Perez-Moreno M.A., Rodrigo I., Locascio A., Blanco M.J., del Barrio M.G., Portillo F., Nieto M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.

29. Catalona W.J. (1997). Screening for prostate cancer. Early screening is important despite lack of data from trials. *BMJ* 315, 187.
30. Cher M.L., Bova G.S., Moore D.H., Small E.J., Carroll P.R., Pin S.S., Epstein J.I., Isaacs W.B., Jensen R.H. (1996). Genetic Alterations in Untreated Metastases and Androgen-independent Prostate Cancer Detected by Comparative Genomic Hybridization and Allelotyping. *Cancer Research* 56, 3091-3102.
31. Christensen S.B., Skytte D.M., Denmeade S.R., Dionne C., Moller J.V., Nissen P., Isaacs J.T. (2009). A Trojan horse in drug development: targeting of thapsigargin towards prostate cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 9, 276-294.
32. Christie R.J., Nishiyama N., Kataoka K. (2010). Minireview: Delivering the Code: Polyplex Carriers for Deoxyribonucleic Acid and Ribonucleic Acid Interference Therapies. *Endocrinology* 151, 466-473.
33. Clark E.S., Weaver A.M. (2008). A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol* 87, 581-590.
34. Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschueren K., van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., van Roy F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-1278.
35. Crawford E.D., DeAntoni E.P., Etzioni R., Schaefer V.C., Olson R.M., Ross C.A., Council T.P.C.E. (1996). Serum prostate-specific antigen and digital rectal examination for early detection of prostate cancer in a national community-based program. *Urology* 47, 863-869.
36. Crawford H.C., Matrisian L.M. (1994). Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 14, 234-245.
37. Daimon M., Susa S., Suzuki K., Kato T., Yamatani K., Sasaki H. (1997). Identification of a Human cDNA Homologue to the *Drosophila* Translocation Protein 1 (Dtrp1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 230, 100-104.
38. Danen E.H., van Muijen G.N., ten Berge P.J., Ruiter D.J. (1993). Integrins and melanoma progression. *Recent Results Cancer Res* 128, 119-132.
39. Davila S., Furu L., Gharavi A.G., Tian X., Onoe T., Qian Q., Li A., Cai Y., Kamath P.S., King B.F., Azurmendi P.J., Tahvanainen P., Kaariainen H., Hockerstedt K., Devuyst O., Pirson Y., Martin R.S., Lifton R.P., Tahvanainen E., Torres V.E., Somlo S. (2004). Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet* 36, 575-577.
40. Davis M.E., Zuckerman J.E., Choi C.H., Seligson D., Tolcher A., Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D., Ribas A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067-1070.
41. de Fougerolles A., Vornlocher H.-P., Maraganore J., Lieberman J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature* 6, 443-453.
42. Debatisse M., Coquelle A., Toledo F., Buttin G. (1998). Gene amplification mechanisms: the role of fragile sites. *Recent Results Cancer Res* 154, 216-226.
43. Debes J.D., Tindall D.J. (2004). Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 351, 1488-1490.

44. Demichelis F., Fall K., Perner S., Andren O., Schmidt F., Setlur S.R., Hoshida Y., Mosquera J.-M., Pawitan Y., Lee C., Adami H.-O., Mucci L.A., Kantoff P.W., Andersson S.-O., Chinnaiyan A.M., Johansson J.-E., Rubin M.A. (2007). TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 26, 4596-4599.
45. Denmeade S.R., Isaacs J.T. (2005). The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 4, 14-22.
46. Denmeade S.R., Jakobsen C.M., Janssen S., Khan S.R., Garrett E.S., Lilja H., Christensen S.B., Isaacs J.T. (2003). Prostate-Specific Antigen-Activated Thapsigargin Prodrug as Targeted Therapy for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 95, 990-1000.
47. Drenth J.P.H., Martina J.A., Kerkhof R.v.d., Bonifacino J.S., Jansen J.B.M.J. (2005). Polycystic liver disease is a disorder of cotranslational protein processing. *Trends in Molecular Medicine* 11, 37-42.
48. Dudek J., Greiner M., Müller A., Hendershot L.M., Kopsch K., Nastainczyk W., Zimmermann R. (2005). ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1008-1014.
49. Dudek J., Volkmer J., Bies C., Guth S., Muller A., Lerner M., Feick P., Schafer K.-H., Morgenstern E., Hennessy F., Blatch G.L., Janoscheck K., Heim N., Scholtes P., Friebe M., Nastainczyk W., Zimmermann R. (2002). A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes. *EMBO J* 21, 2958-2967.
50. DuRose J.B., Tam A.B., Niwa M. (2006). Intrinsic Capacities of Molecular Sensors of the Unfolded Protein Response to Sense Alternate Forms of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol Biol Cell* 17, 3095-3107.
51. Elo J.P., Kvist L., Leinonen K., Isomaa V., Henttu P., Lukkarinen O., Vihko P. (1995). Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3494-3500.
52. Er O. (2009). Cancer stem cells in solid tumors. *Onkologie* 32, 605-609.
53. Estacion M., Nguyen H.B., Gargus J.J. (1996). Calcium is permeable through a maitotoxin-activated nonselective cation channel in mouse L cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 270, C1145-1152.
54. Estilo C.L., O-charoenrat P., Ngai I., Patel S.G., Reddy P.G., Dao S., Shaha A.R., Kraus D.H., Boyle J.O., Wong R.J., Pfister D.G., Huryn J.M., Zlotolow I.M., Shah J.P., Singh B. (2003). The Role of Novel Oncogenes Squamous Cell Carcinoma-related Oncogene and Phosphatidylinositol 3-Kinase p110 α in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue. *Clinical Cancer Research* 9, 2300-2306.
55. Feldman B.J., Feldman D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.
56. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
57. Ferdinandusse S., Denis S., IJlst L., Dacremont G., Waterham H.R., Wanders R.J.A. (2000). Subcellular localization and physiological role of {alpha}-methylacyl-CoA racemase. *J Lipid Res* 41, 1890-1896.

58. Flanders W.D. (1984). Review: prostate cancer epidemiology. *Prostate* 5, 621-629.
59. Fu W., Bubendorf L., Willi N., Moch H., Mihatsch M.J., Sauter G., Gasser T.C. (2000). Genetic changes in clinically organ-confined prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Urology* 56, 880-885.
60. Fukumoto M., Shevrin D.H., Roninson I.B. (1988). Analysis of gene amplification in human tumor cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 6846-6850
61. Gann P.H., Hennekens C.H., Sacks F.M., Grodstein F., Giovannucci E.L., Stampfer M.J. (1994). Prospective Study of Plasma Fatty Acids and Risk of Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 86, 281-286.
62. Gen Y., Yasui K., Zen Y., Zen K., Dohi O., Endo M., Tsuji K., Wakabayashi N., Itoh Y., Naito Y., Taniwaki M., Nakanuma Y., Okanoue T., Yoshikawa T. (2010). SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics* 202, 82-93.
63. Giancotti F.G., Ruoslahti E. (1999). Integrin Signaling. *Science* 285, 1028-1033.
64. Giunti R., Gamberucci A., Fulceri R., Banhegyi G., Benedetti A. (2007). Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 462, 115-121.
65. Gorg A., Weiss W., Dunn M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.
66. Görlich D., Rapoport T.A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, 615-630.
67. Greiner M., Kreutzer B., Jung V., Grobholz R., Hasenfus A., Stöhr R.F., Tornillo L., Dudek J., Stöckle M., Unteregger G., Kamradt J., Wullich B., Zimmermann R. (2011a). Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *Int J Cancer* 128, 2284-2295.
68. Greiner M., Kreutzer B., Lang S., Jung V., Cavalié A., Unteregger G., Zimmermann R., Wullich B. (2011b). Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. *Prostate* 71, 1074-1083.
69. Haigh N.G., Johnson A.E. (2002). A new role for BiP. *The Journal of Cell Biology* 156, 261-270.
70. Hamman B.D., Hendershot L.M., Johnson A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758.
71. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
72. Harding H.P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P.D., Calton M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D.F., Bell J.C., Hettmann T., Leiden J.M., Ron D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11, 619-633.
73. Harsman A., Kopp A., Wagner R., Zimmermann R., Jung M. (2011). Calmodulin regulation of the calcium-leak channel Sec61 is unique to vertebrates. *Channels (Austin)* 5, 293-298.

74. Hartmann E., Sommer T., Prehn S., Görlich D., Jentsch S., Rapoport T.A. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* *367*, 654-657.
75. Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T., Mori K. (1999). Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol Biol Cell* *10*, 3787-3799.
76. Hendershot L.M. (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* *71*, 289-297.
77. Hermani A., Hess J., De Servi B., Medunjanin S., Grobholz R., Trojan L., Angel P., Mayer D. (2005). Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* *11*, 5146-5152.
78. Hessels D., Klein Gunnewiek J.M., van Oort I., Karthaus H.F., van Leenders G.J., van Balken B., Kiemeny L.A., Witjes J.A., Schalken J.A. (2003). DD3 (PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* *44*, 8-15.
79. Hopman A.H., van Hooren E., van de Kaa C.A., Vooijs P.G., Ramaekers F.C. (1991). Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Mod Pathol* *4*, 503-513.
80. Imoto I., Pimkhaokham A., Fukuda Y., Yang Z.-Q., Shimada Y., Nomura N., Hirai H., Imamura M., Inazawa J. (2001). SNO Is a Probable Target for Gene Amplification at 3q26 in Squamous-Cell Carcinomas of the Esophagus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *286*, 559-565.
81. Isaacs J.T. (2005). New strategies for the medical treatment of prostate cancer. *BJU Int* *96 Suppl 2*, 35-40.
82. Ishihama Y., Oda Y., Tabata T., Sato T., Nagasu T., Rappsilber J., Mann M. (2005). Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. *Molecular & Cellular Proteomics* *4*, 1265-1272.
83. Jenkins R.B., Qian J., Lieber M.M., Bostwick D.G. (1997). Detection of c-myc Oncogene Amplification and Chromosomal Anomalies in Metastatic Prostatic Carcinoma by Fluorescence in Situ Hybridization. *Cancer Research* *57*, 524-531.
84. Johns L.E., Houlston R.S. (2003). A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU International* *91*, 789-794.
85. Jones P.A., Baylin S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* *3*, 415-428.
86. Jones P.A., De Clerck Y.A. (1982). Extracellular matrix destruction by invasive tumor cells. *Cancer Metastasis Rev* *1*, 289-317.
87. Joyce J.A., Pollard J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* *9*, 239-252.
88. Jung V., Kindich R., Kamradt J., Jung M., Müller M., Schulz W.A., Engers R., Unteregger G., Stöckle M., Zimmermann R., Wullich B. (2006). Genomic and Expression Analysis of the 3q25-q26 Amplification Unit Reveals TLOC1/SEC62 as

- a Probable Target Gene in Prostate Cancer. In *Molecular Cancer Research*, pp. 169-176.
89. Kaltz-Wittmer C., Klenk U., Glaessgen A., Aust D.E., Diebold J., Lohrs U., Baretton G.B. (2000). FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Lab Invest* 80, 1455-1464.
 90. Karadag N., Kirimlioglu H., Isik B., Yilmaz S., Kirimlioglu V. (2008). Expression of Matrix Metalloproteinases in Gallbladder Carcinoma and Their Significance in Carcinogenesis. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 16, 148-152.
 91. Karas M., Bachmann D., Hillenkamp F. (1985). Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry* 57, 2935-2939.
 92. Kimata Y., Oikawa D., Shimizu Y., Ishiwata-Kimata Y., Kohno K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *The Journal of Cell Biology* 167 445-456
 93. Klarmann G., Hurt E., Mathews L., Zhang X., Duhagon M., Mistree T., Thomas S., Farrar W. (2009). Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature. *Clinical and Experimental Metastasis* 26, 433-446.
 94. Klee M., Pallauf K., Alcalá S., Fleischer A., Pimentel-Muinos F.X. (2009). Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J* 28, 1757-1768.
 95. Kleer E., Larson-Keller J.J., Zincke H., Oesterling J.E. (1993). Ability of preoperative serum prostatespecific antigen value to predict pathologic stage and DNA ploidy Influence of clinical stage and tumor grade. *Urology* 41, 207-216.
 96. Klose J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243.
 97. Koivisto P., Kononen J., Palmberg C., Tammela T., Hyytinen E., Isola J., Trapman J., Cleutjens K., Noordzij A., Visakorpi T., Kallioniemi O.-P. (1997). Androgen Receptor Gene Amplification: A Possible Molecular Mechanism for Androgen Deprivation Therapy Failure in Prostate Cancer. *Cancer Research* 57, 314-319.
 98. Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Barlund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844-847.
 99. Kristiansen G. (2009). Immunhistochemische Algorithmen in der Prostatadiagnostik. *Der Pathologe* 30, 146-153.
 100. Kristiansen G., Fritzsche F.R., Wassermann K., Jager C., Tolle A., Lein M., Stephan C., Jung K., Pilarsky C., Dietel M., Moch H. (2008). GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. *Br J Cancer* 99, 939-948.
 101. Kuefer R., Hofer M.D., Gschwend J.E., Rubin M.A. (2004). Tissue-Microarrays. *Der Urologe A* 43, 659-668.

102. Kumar-Sinha C., Tomlins S.A., Chinnaiyan A.M. (2008). Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 497-511.
103. Labrie F., Dupont A., Belanger A., Cusan L., Lacourciere Y., Monfette G., Laberge J.G., Emond J.P., Fazekas A.T., Raynaud J.P., Husson J.M. (1982). New hormonal therapy in prostatic carcinoma: combined treatment with an LHRH agonist and an antiandrogen. *Clin Invest Med* 5, 267-275.
104. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
105. Lai E., Teodoro T., Volchuk A. (2007). Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response. *Physiology* 22, 193-201.
106. Lang S., Erdmann F., Jung M., Wagner R., Cavalié A., Zimmermann R. (2011). Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels (Austin)* 5, 228-235.
107. Lastraioli E., Guasti L., Crociani O., Polvani S., Hofmann G., Witchel H., Bencini L., Calistri M., Messerini L., Scatizzi M., Moretti R., Wanke E., Olivotto M., Mugnai G., Arcangeli A. (2004). *herg1* Gene and HERG1 Protein Are Overexpressed in Colorectal Cancers and Regulate Cell Invasion of Tumor Cells. *Cancer Research* 64, 606-611.
108. Laufs S., Schumacher J., Allgayer H. (2006). Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* 5, 1760-1771.
109. Lawson D.A., Witte O.N. (2007). Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *The Journal of Clinical Investigation* 117, 2044-2050.
110. Leavitt R., Schlesinger S., Kornfeld S. (1977). Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of Sindbis and vesicular stomatitis viruses. *J Virol* 21, 375-385.
111. Leone A., Seeger R.C., Hong C.M., Hu Y.Y., Arboleda M.J., Brodeur G.M., Stram D., Slamon D.J., Steeg P.S. (1993). Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* 8, 855-865.
112. Linja M.J., Savinainen K.J., Saramäki O.R., Tammela T.L.J., Vessella R.L., Visakorpi T. (2001). Amplification and Overexpression of Androgen Receptor Gene in Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Research* 61, 3550-3555.
113. Liotta L.A. (1986). Tumor Invasion and Metastases--Role of the Extracellular Matrix: Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 46, 1-7.
114. Liotta L.A., Kohn E.C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375-379.
115. Liotta L.A., Tryggvason K., Garbisa S., Hart I., Foltz C.M., Shafie S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284, 67-68.
116. Liu G., Zhang X., Lin H., Wang H., Li Q., Ni J., Zhu C. (2006). Effects of E-cadherin on mouse embryo implantation and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 832-838.

117. Lorenz C., Hadwiger P., John M., Vornlocher H.-P., Unverzagt C. (2004). Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 4975-4977.
118. Luo J., Duggan D.J., Chen Y., Sauvageot J., Ewing C.M., Bittner M.L., Trent J.M., Isaacs W.B. (2001). Human Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia. *Cancer Research* 61, 4683-4688.
119. Luo J., Zha S., Gage W.R., Dunn T.A., Hicks J.L., Bennett C.J., Ewing C.M., Platz E.A., Ferdinandusse S., Wanders R.J., Trent J.M., Isaacs W.B., De Marzo A.M. (2002). α -Methylacyl-CoA Racemase. *Cancer Research* 62, 2220-2226.
120. Macoska J.A., Trybus T.M., Wojno K.J. (2000). 8p22> loss concurrent with 8c gain is associated with poor outcome in prostate cancer. *Urology* 55, 776-782.
121. Malliri A., Collard J.G. (2003). Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 15, 583-589.
122. Marciniak S.J., Yun C.Y., Oyadomari S., Novoa I., Zhang Y., Jungreis R., Nagata K., Harding H.P., Ron D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & Development* 18, 3066-3077.
123. Mark H.F.L., Samy M., Santoro K., Mark S., Feldman D. (2000). Fluorescent in Situ Hybridization Study of c-myc Oncogene Copy Number in Prostate Cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 68, 65-69.
124. Marks L.S., Fradet Y., Deras I.L., Blase A., Mathis J., Aubin S.M.J., Cancio A.T., Desaulniers M., Ellis W.J., Rittenhouse H., Groskopf J. (2007). PCA3 Molecular Urine Assay for Prostate Cancer in Men Undergoing Repeat Biopsy. *Urology* 69, 532-535.
125. Mass R.D., Press M.F., Anderson S., Cobleigh M.A., Vogel C.L., Dybdal N., Leiberman G., Slamon D.J. (2005). Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer* 6, 240-246.
126. Mathews L., Hurt E., Zhang X., Farrar W. (2010). Epigenetic regulation of CpG promoter methylation in invasive prostate cancer cells. *Molecular Cancer* 9, 267.
127. Matsuyama H., Pan Y., Oba K., Yoshihiro S., Matsuda K., Hägarth L., Kudren D., Naito K., Bergerheim U.S.R., Ekman P. (2003). The Role of Chromosome 8p22 Deletion for Predicting Disease Progression and Pathological Staging in Prostate Cancer. *Aktuel Urol* 34, 247-249.
128. McDonnell T.J., Troncoso P., Brisbay S.M., Logothetis C., Chung L.W., Hsieh J.T., Tu S.M., Campbell M.L. (1992). Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 52, 6940-6944.
129. Mercurio A.M., Bachelder R.E., Chung J., O'Connor K.L., Rabinovitz I., Shaw L.M., Tani T. (2001). Integrin Laminin Receptors and Breast Carcinoma Progression. In *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* (Springer Netherlands), pp. 299-309.

130. Meyer H.-A., Grau H., Kraft R., Kostka S., Prehn S., Kalies K.-U., Hartmann E. (2000). Mammalian Sec61 Is Associated with Sec62 and Sec63. *Journal of Biological Chemistry* 275, 14550-14557.
131. Miyoshi Y., Uemura H., Fujinami K., Mikata K., Harada M., Kitamura H., Koizumi Y., Kubota Y. (2000). Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-myc and androgen receptor gene amplification and chromosomal anomalies in prostate cancer in Japanese patients. *The Prostate* 43, 225-232.
132. Mori Y., Sato F., Selaru F.M., Olaru A., Perry K., Kimos M.C., Tamura G., Matsubara N., Wang S., Xu Y., Yin J., Zou T.-T., Leggett B., Young J., Nukiwa T., Stine O.C., Abraham J.M., Shibata D., Meltzer S.J. (2002). Instability typing Reveals Unique Mutational Spectra in Microsatellite-Unstable Gastric Cancers. *Cancer Res* 62, 3641-3645.
133. Morris J.A., Dorner A.J., Edwards C.A., Hendershot L.M., Kaufman R.J. (1997). Immunoglobulin Binding Protein (BiP) Function Is Required to Protect Cells from Endoplasmic Reticulum Stress but Is Not Required for the Secretion of Selective Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 272 4327-4334.
134. Morrissey D.V., Lockridge J.A., Shaw L., Blanchard K., Jensen K., Breen W., Hartsough K., Machemer L., Radka S., Jadhav V., Vaish N., Zinnen S., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C.S., Jeffs L.B., Judge A., MacLachlan I., Polisky B. (2005). Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23, 1002-1007.
135. Müller I., Wischnewski F., Pantel K., Schwarzenbach H. (2010a). Promoter- and cell-specific epigenetic regulation of CD44, Cyclin D2, GLIPR1 and PTEN by Methyl-CpG binding proteins and histone modifications. *BMC Cancer* 10, 297.
136. Müller L., de Escuriaza M.D., Lajoie P., Theis M., Jung M., Müller A., Burgard C., Greiner M., Snapp E.L., Dudek J., Zimmermann R. (2010b). Evolutionary Gain of Function for the ER Membrane Protein Sec62 from Yeast to Humans. *Mol Biol Cell* 21, 691-703.
137. Narayanan V., Mieczkowski P.A., Kim H.M., Petes T.D., Lobachev K.S. (2006). The pattern of gene amplification is determined by the chromosomal location of hairpin-capped breaks. *Cell* 125, 1283-1296.
138. Nguyen D., Hussain M. (2007). The role of the mitochondria in mediating cytotoxicity of anti-cancer therapies. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Springer New York), pp. 13-21.
139. Nupponen N., Visakorpi T. (1999). Molecular biology of progression of prostate cancer. *Eur Urol* 35, 351-354.
140. Nupponen N.N., Hyytinen E.R., Kallioniemi A.H., Visakorpi T. (1998). Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics* 101, 53-57.
141. O'Farrell P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250, 4007-4021
142. Oh P., Li Y., Yu J., Durr E., Krasinska K.M., Carver L.A., Testa J.E., Schnitzer J.E. (2004). Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 429, 629-635.

143. Ong H., Liu X., Sharma A., Hegde R., Ambudkar I. (2007). Intracellular Ca²⁺ release via the ER translocon activates store-operated calcium entry. In *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* (Springer Berlin / Heidelberg), pp. 797-808.
144. Palade G. (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* 189, 347-358.
145. Pelosi G., Del Curto B., Trubia M., Nicholson A.G., Manzotti M., Veronesi G., Spaggiari L., Maisonneuve P., Pasini F., Terzi A., Iannucci A., Viale G. (2007). 3q26 Amplification and Polysomy of Chromosome 3 in Squamous Cell Lesions of the Lung: A Fluorescence In situ Hybridization Study. *Clinical Cancer Research* 13, 1995-2004.
146. Perez-Moreno M.A., Locascio A., Rodrigo I., Dhondt G., Portillo F., Nieto M.A., Cano A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 276, 27424-27431.
147. Perner S., Schmidt F.H., Hofer M.D., Kuefer R., Rubin M. (2007). Die TMPRSS2-ETS-Genfusion beim Prostatakarzinom. In *Der Urologe A* (Springer Berlin / Heidelberg), pp. 754-760.
148. Pfaffl M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
149. Pickart C.M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 544-548.
150. Pienta K.J., Bradley D. (2006). Mechanisms Underlying the Development of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* 12, 1665-1671.
151. Pilon M., Schekman R., Römisch K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16, 4540-4548.
152. Pinton P., Ferrari D., Magalhaes P., Schulze-Osthoff K., Di Virgilio F., Pozzan T., Rizzuto R. (2000). Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 148, 857-862.
153. Postigo A.A., Dean D.C. (1997). ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *EMBO J* 16, 3935-3943.
154. Powell I.J. (2007). Epidemiology and Pathophysiology of Prostate Cancer in African-American Men. *The Journal of urology* 177, 444-449.
155. Qian J., Jenkins R.B., Bostwick D.G. (1995). Chromosomal anomalies in atypical adenomatous hyperplasia and carcinoma of the prostate using fluorescence in situ hybridization. *Urology* 46, 837-842.
156. Ramsay A.G., Marshall J.F., Hart I.R. (2007). Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 26, 567-578.
157. Rapoport T.A. (1986). Protein translocation across and integration into membranes. *CRC Crit Rev Biochem* 20, 73-137.
158. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
159. Rubin M.A., Zhou M., Dhanasekaran S.M., Varambally S., Barrette T.R., Sanda M.G., Pienta K.J., Ghosh D., Chinnaiyan A.M. (2002). {alpha}-Methylacyl

- Coenzyme A Racemase as a Tissue Biomarker for Prostate Cancer. *JAMA* 287, 1662-1670.
160. Saar M., Körbel C., Jung V., Suttman H., Grobholz R., Stöckle M., Unteregger G., Menger M.D., Kamradt J. (2010). Experimental orthotopic prostate tumor in nude mice: Techniques for local cell inoculation and three-dimensional ultrasound monitoring. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations In Press, Corrected Proof*.
161. Saier M.H., Jr. (2000). A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 354-411.
162. Sato K., Qian J., Slezak J.M., Lieber M.M., Bostwick D.G., Bergstralh E.J., Jenkins R.B. (1999). Clinical Significance of Alterations of Chromosome 8 in High-Grade, Advanced, Nonmetastatic Prostate Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 1574-1580.
163. Sattler H.-P., Lensch R., Rohde V., Zimmer E., Meese E., Bonkhoff H., Retz M., Zwergel T., Bex A., Stoeckle M., Wullich B. (2000). Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *The Prostate* 45, 207-215.
164. Sattler H.-P., Rohde V., Bonkhoff H., Zwergel T., Wullich B. (1999). Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *The Prostate* 39, 79-86.
165. Schulmann K., Brasch F.E., Kunstmann E., Engel C., Pagenstecher C., Vogelsang H., Krüger S., Vogel T., Knaebel H.-P., Rüschoff J., Hahn S.A., Knebel-Doerberitz M.V., Moeslein G., Meltzer S.J., Schackert H.K., Tympner C., Mangold E., Schmiegel W. (2005). HNPCC-associated small bowel cancer: Clinical and molecular characteristics. *Gastroenterology* 128, 590-599.
166. Schwab M. (1999). Oncogene amplification in solid tumors. *Seminars in Cancer Biology* 9, 319-325.
167. Scorrano L., Oakes S.A., Opferman J.T., Cheng E.H., Sorcinelli M.D., Pozzan T., Korsmeyer S.J. (2003). BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. *Science* 300, 135-139.
168. Senderek J., Krieger M., Stendel C., Bergmann C., Moser M., Breitbach-Faller N., Rudnik-Schoneborn S., Blaschek A., Wolf N.I., Harting I., North K., Smith J., Muntoni F., Brockington M., Quijano-Roy S., Renault F., Herrmann R., Hendershot L.M., Schroder J.M., Lochmuller H., Topaloglu H., Voit T., Weis J., Ebinger F., Zerres K. (2005). Mutations in *SIL1* cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet* 37, 1312-1314.
169. Shaw J., Rowlinson R., Nickson J., Stone T., Sweet A., Williams K., Tonge R. (2003). Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 3, 1181-1195.
170. Shen J., Prywes R. (2004). Dependence of Site-2 Protease Cleavage of ATF6 on Prior Site-1 Protease Digestion Is Determined by the Size of the Luminal Domain of ATF6. *Journal of Biological Chemistry* 279, 43046-43051
171. Shi Y. (2003). Mammalian RNAi for the masses. *Trends in Genetics* 19, 9-12.

-
172. Singh B., Gogineni S., Goberdhan A., Sacks P., Shaha A., Shah J., Rao P. (2001). Spectral Karyotyping Analysis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *The Laryngoscope* *111*, 1545-1550.
 173. Singh S.K., Clarke I.D., Hide T., Dirks P.B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* *23*, 7267-7273.
 174. Skowronek M.H., Rotter M., Haas I.G. (1999). Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol Chem* *380*, 1133-1138.
 175. Snijders A.M., Hermsen M.A., Baughman J., Buffart T.E., Huey B., Gajduskova P., Roydasgupta R., Tokuyasu T., Meijer G.A., Fridlyand J., Albertson D.G. (2008). Acquired genomic aberrations associated with methotrexate resistance vary with background genomic instability. *Genes, Chromosomes and Cancer* *47*, 71-83.
 176. Spaderna S., Schmalhofer O., Wahlbuhl M., Dimmler A., Bauer K., Sultan A., Hlubek F., Jung A., Strand D., Eger A., Kirchner T., Behrens J., Brabletz T. (2008). The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* *68*, 537-544.
 177. Springer T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* *346*, 425-434.
 178. Sreekumar A., Laxman B., Rhodes D.R., Bhagavathula S., Harwood J., Giacherio D., Ghosh D., Sanda M.G., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. (2004). Humoral Immune Response to α -Methylacyl-CoA Racemase and Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* *96*, 834-843.
 179. Stamey T.A., Freiha F.S., McNeal J.E., Redwine E.A., Whittemore A.S., Schmid H.P. (1993). Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer. *Cancer* *71*, 933-938.
 180. Stetler-Stevenson W.G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* *103*, 1237-1241.
 181. Stoltzfus P., Heselmeyer-Haddad K., Castro J., White N., Silfverswärd C., Sjövall K., Einhorn N., Tryggvason K., Auer G., Ried T., Nordström B. (2005). Gain of chromosome 3q is an early and consistent genetic aberration in carcinomas of the vulva. *International Journal of Gynecological Cancer* *15*, 120-126.
 182. Sullivan J., Minna J., Shay J. (2010). Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* *29*, 61-72.
 183. Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M., Samali A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* *7*, 880-885.
 184. Taplin M.E., Bubley G.J., Shuster T.D., Frantz M.E., Spooner A.E., Ogata G.K., Keer H.N., Balk S.P. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* *332*, 1393-1398.
 185. Thastrup O., Cullen P.J., Drøbak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 2466-2470
 186. Thiery J.P., Sleeman J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 131-142.

-
187. Tlsty T.D. (1990). Normal diploid human and rodent cells lack a detectable frequency of gene amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 3132-3136.
 188. Tomlins S.A., Rhodes D.R., Perner S., Dhanasekaran S.M., Mehra R., Sun X.-W., Varambally S., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., Lee C., Montie J.E., Shah R.B., Pienta K.J., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. (2005). Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science* 310, 644-648.
 189. Topping N., Borre M., Sorensen K.D., Andersen C.L., Wiuf C., Orntoft T.F. (2007). Genome-wide analysis of allelic imbalance in prostate cancer using the Affymetrix 50K SNP mapping array. *Br J Cancer* 96, 499-506.
 190. Tsuchiya N., Slezak J.M., Lieber M.M., Bergstralh E.J., Jenkins R.B. (2002). Clinical significance of alterations of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridization analysis in pathologic organ-confined prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 34, 363-371.
 191. Tu S.M., McConnell K., Marin M.C., Campbell M.L., Fernandez A., von Eschenbach A.C., McDonnell T.J. (1995). Combination adriamycin and suramin induces apoptosis in bcl-2 expressing prostate carcinoma cells. *Cancer Lett* 93, 147-155.
 192. Tyedmers J., Lerner M., Bies C., Dudek J., Skowronek M.H., Haas I.G., Heim N., Nastainczyk W., Volkmer J.r., Zimmermann R. (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes
 193. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7214-7219.
 194. Unger K., Malisch E., Thomas G., Braselmann H., Walch A., Jackl G., Lewis P., Lengfelder E., Bogdanova T., Wienberg J., Zitzelsberger H. (2008). Array CGH demonstrates characteristic aberration signatures in human papillary thyroid carcinomas governed by RET/PTC. *Oncogene* 27, 4592-4602.
 195. Unger K., Zitzelsberger H., Salvatore G., Santoro M., Bogdanova T., Braselmann H., Kastner P., Zurnadzhy L., Tronko N., Hutzler P., Thomas G. (2004). Heterogeneity in the Distribution of RET/PTC Rearrangements within Individual Post-Chernobyl Papillary Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4272-4279.
 196. Vaishnav A.K., Gollob J., Gamba-Vitalo C., Hutabarat R., Sah D., Meyers R., de Fougères T., Maraganore J. (2010). A status report on RNAi therapeutics. *Silence* 1, 14.
 197. Van Coppenolle F., Vanden Abeele F., Slomianny C., Flourakis M., Hesketh J., Dewailly E., Prevarskaya N. (2004). Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* 117, 4135-4142.
 198. Vander Griend D.J., Antony L., Dalrymple S.L., Xu Y., Christensen S.B., Denmeade S.R., Isaacs J.T. (2009). Amino acid containing thapsigargin analogues deplete androgen receptor protein via synthesis inhibition and induce the death of prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 8, 1340-1349.

199. Vander Griend D.J., Karthaus W.L., Dalrymple S., Meeker A., DeMarzo A.M., Isaacs J.T. (2008). The Role of CD133 in Normal Human Prostate Stem Cells and Malignant Cancer-Initiating Cells. *Cancer Research* 68, 9703-9711.
200. Vasiljeva O., Papazoglou A., Kruger A., Brodoefel H., Korovin M., Deussing J., Augustin N., Nielsen B.S., Almholt K., Bogyo M., Peters C., Reinheckel T. (2006). Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* 66, 5242-5250.
201. Vercesi A.E., Moreno S.N., Bernardes C.F., Meinicke A.R., Fernandes E.C., Docampo R. (1993). Thapsigargin causes Ca²⁺ release and collapse of the membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria in situ and of isolated rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 268, 8564-8568
202. Visakorpi T., Hyytinen E., Koivisto P., Tanner M., Keinänen R., Palmberg C., Palotie A., Tammela T., Isola J., Kallioniemi O.P. (1995a). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 9, 401-406.
203. Visakorpi T., Kallioniemi A.H., Syvänen A.-C., Hyytinen E.R., Karhu R., Tammela T., Isola J.J., Kallioniemi O.-P. (1995b). Genetic Changes in Primary and Recurrent Prostate Cancer by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Research* 55, 342-347.
204. Voges D., Zwickl P., Baumeister W. (1999). THE 26S PROTEASOME: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis. *Annual Review of Biochemistry* 68, 1015-1068.
205. Wang H., Zhang Y., Cao L., Han H., Wang J., Yang B., Nattel S., Wang Z. (2002). HERG K⁺ Channel, a Regulator of Tumor Cell Apoptosis and Proliferation. *Cancer Research* 62, 4843-4848.
206. Wang T.-L., Diaz L.A., Romans K., Bardelli A., Saha S., Galizia G., Choti M., Donehower R., Parmigiani G., Shih I.-M., Iacobuzio-Donahue C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C., Velculescu V.E. (2004). Digital karyotyping identifies thymidylate synthase amplification as a mechanism of resistance to 5-fluorouracil in metastatic colorectal cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3089-3094.
207. Werb Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-442.
208. Williams B.J., Jones E., Kozlowski J.M., Vessella R., Brothman A.R. (1997). Comparative genomic hybridization and molecular cytogenetic characterization of two prostate cancer xenografts. *Genes, Chromosomes and Cancer* 18, 299-304.
209. Wissing F., Nerou E.P., Taylor C.W. (2002). A novel Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mechanism mediated by neither inositol trisphosphate nor ryanodine receptors. *Biochem J* 361, 605-611.
210. Woenckhaus J., Steger K., Sturm K., Münstedt K., Franke F., Fenic I. (2007). Prognostic value of PIK3CA and phosphorylated AKT expression in ovarian cancer. *Virchows Archiv* 450, 387-395.
211. Wu J., Kaufman R.J. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* 13, 374-384.

-
212. Xu J., Stolk J.A., Zhang X., Silva S.J., Houghton R.L., Matsumura M., Vedvick T.S., Leslie K.B., Badaro R., Reed S.G. (2000). Identification of Differentially Expressed Genes in Human Prostate Cancer Using Subtraction and Microarray. *Cancer Research* 60, 1677-1682.
 213. Yamada T., Oshima T., Yoshihara K., Tamura S., Kanazawa A., Inagaki D., Yamamoto N., Sato T., Fujii S., Numata K., Kunisaki C., Shiozawa M., Morinaga S., Akaike M., Rino Y., Tanaka K., Masuda M., Imada T. (2010). Overexpression of MMP-13 Gene in Colorectal Cancer with Liver Metastasis. *Anticancer Research* 30, 2693-2699.
 214. Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.
 215. Yang J., Weinberg R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.
 216. Yegnasubramanian S., Kowalski J., Gonzalgo M.L., Zahurak M., Piantadosi S., Walsh P.C., Bova G.S., De Marzo A.M., Isaacs W.B., Nelson W.G. (2004). Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer. *Cancer Research* 64, 1975-1986.
 217. Yilmaz M., Christofori G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 15-33.
 218. Yoshida H. (2007). ER stress and diseases. *FEBS Journal* 274, 630-658.
 219. Zhang B., Cao X., Liu Y., Cao W., Zhang F., Zhang S., Li H., Ning L., Fu L., Niu Y., Niu R., Sun B., Hao X. (2008). Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognosis of invasive breast cancer. *BMC Cancer* 8, 83.
 220. Zhang J., Wang K., Zhang J., Liu S.S., Dai L., Zhang J.-Y. (2007). Using Proteomic Approach to Identify Tumor-Associated Proteins as Biomarkers in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Proteome Research* 10, 2863-2872.
 221. Zhao X.Y., Malloy P.J., Krishnan A.V., Swami S., Navone N.M., Peehl D.M., Feldman D. (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat Med* 6, 703-706.
 222. Zimmermann R., Müller L., Wullich B. (2006). Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Trends in Molecular Medicine* 12, 567-573.
 223. Zoghbi H.Y. (2005). SILEncing misbehaving proteins. *Nat Genet* 37, 1302-1303.
 224. Zou M., Shi Y., al-Sedairy S., Farid N.R. (1993). High levels of Nm23 gene expression in advanced stage of thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 68, 385-388.
 225. Zukiel R., Nowak S., Wyszko E., Rolle K., Gawronska I., Barciszewska M.Z., Barciszewski J. (2006). Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C. *Cancer Biol Ther* 5, 1002-1007.

Verzeichnis der Veröffentlichungen

Publikationen:

Markus Greiner, **Birgit Kreutzer**, Volker Jung, Rainer Grobholz, Andrea Hasenbusch, Robert Franz Stöhr, Luigi Tornillo, Johanna Dudek, Michael Stöckle, Gerhard Unteregger, Jörn Kamradt, Bernd Wullich und Richard Zimmermann. Silencing of the *SEC62* gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. International journal of cancer Cancer 128: 2284-2295 (2011).

Markus Greiner, **Birgit Kreutzer**, Sven Lang, Volker Jung, Adolfo Cavalié, Gerhard Unteregger, Richard Zimmermann und Bernd Wullich. Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. Prostate 71:1074-83 (2011).

Sven Lang, Julia Benedix, Sorin Fedeles, Stefan Schorr, Claudia Schirra, Nico Schäuble, Carolin Jalal, **Birgit Kreutzer**, Markus Greiner, Sarah Haßdenteufel, Jörg Tatzelt, Ludwig Edelmann, Elmar Krause, Jens Rettig, Stefan Somlo, Johanna Dudek und Richard Zimmermann. Differential effects of Sec61a-, Sec62- and Sec63-depletion on transport of polypeptides into the mammalian endoplasmic reticulum. Journal of Cell Science (2011).

Poster:

Kreutzer, B., Greiner M., Kopsch K., Unteregger G., Jung V., Wullich B., Zimmermann R.. Sec62 may protect prostate cancer cells from ER-stress induced apoptosis. 61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. Dresden (2009)

Jung V., **Kreutzer B.**, Greiner M., Kamradt J., Unteregger G., Stöckle M., Zimmermann R., Wullich B.. Einfluss von *SEC62*-Silencing auf das Invasionsverhalten von Prostatakarzinomzellen. 1. Symposium „Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie“ München (2009).

Greiner M., **Kreutzer B.**, Kopsch K., Müller A., Unteregger G., Jung V., Wullich B., Zimmermann R.. Sec62 protects prostate cancer cells against thapsigargin treatment. 1. Symposium „Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie“ München (2009).

Greiner M., **Kreutzer B.**, Müller A., Kopsch K., Unteregger G., Jung V., Wullich B., Zimmermann R.. The dual function of Sec62 in cancer cells. 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (2010)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen recht herzlich bedanken, die mich direkt oder indirekt bei der Entwicklung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gerhard Unteregger für die Möglichkeit zur Promotion, die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

Ich bedanke mich außerordentlich bei Prof. Dr. Richard Zimmermann für die überaus fruchtbare Zusammenarbeit, dass ich einen Teil meiner Arbeit in seinen Laboren durchführen konnte und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Wullich möchte ich mich bedanken für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des sehr interessanten Themas.

Herrn Dr. Volker Jung danke ich besonders herzlich für seine ausgezeichnete Betreuung, stetige Hilfsbereitschaft und sein Engagement, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein weiterer, ganz besonderer Dank geht an Dr. Markus Greiner, der mir wertvolle praktische und theoretische Ideen mit auf den Weg gab, immer ein offenes Ohr hatte und sich mit viel Mühe der auftretenden Probleme widmete. Die Zusammenarbeit mit ihm war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen der Arbeit.

Für die Einführung in sämtliche molekularbiologischen Arbeiten danke ich Frau Eva Schmitt ganz herzlich. Mit großem Engagement hat sie jederzeit tatkräftig geholfen, Probleme jeglicher Art zu lösen. Herzlichen Dank für ihre Freundschaft und jeden anderen wertvollen, unterstützenden Beistand.

Für die Einarbeitung, Unterstützung und Hilfe in Bezug auf die Arbeiten mit Zellkulturen bzw. Aufmunterung während der Labortätigkeit danke ich Frau Helga Angeli ganz herzlich.

Ein weiterer, ganz besonderer Dank geht an meine Mitarbeiter, Herrn Dr. med. Jörn Kamradt und Frau Maria Link, die mir jederzeit hilfreich zur Seite gestanden haben.

Der allergrößte Dank geht an meine Eltern. Sie haben mich immer auf meinem Weg begleitet und unterstützt. Ohne Euch wäre ich nie soweit gekommen.

Meinem Mann Sebastian danke ich ganz besonders für seine Unterstützung und Geduld während der Erstellung meiner Doktorarbeit.

Meiner Tochter Anna danke ich für all die heiteren Momente und schönen Ablenkungen, die sie mir während der letzten Monate meiner Promotionszeit bescherte.

Lebenslauf

Name: Birgit Klemmer geb. Kreutzer
Geburtsdatum: 09.12.1977
Geburtsort: Völklingen
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1984 - 1988 Grundschule Bous
1988 - 1994 Realschule Völklingen
1994 - 1998 Wirtschafts-Wissenschaftliche Gymnasium Saarbrücken
Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1998 - 1999 Biologie Universität Saarbrücken (2 Semester)
1999 - 2006 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes
Hauptfach: Virologie/Immunologie
Nebenfächer: Humangenetik und Molekularbiologie
2005 - 2006 Diplomarbeit am Institut für Strukturbiologie an der Universität des Saarlandes
Thema der Diplomarbeit: Klonierung, Expression, Aufreinigung und Kristallisation der A1- und B-Domäne von RIBEYE
2006 - 2007 Graduiertenkolleg „Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von zellulärem Membrantransport“
Streichung des Stipendiums aufgrund der Annahme eines Rufes des Doktorvaters an die Universität in Kiel
2007 - 2010 Anfertigung der Dissertation an den Universitätskliniken Homburg/Saar, Klinik für Urologie
Thema der Dissertation: Untersuchungen zur pathophysiologischen Funktion des Sec62-Proteins bei der Entwicklung von bösartigen Tumoren des Menschen und seiner Bedeutung als Tumor- und Prognosemarker

