

**Charakterisierung einer neuen
Amplifikationseinheit
auf Chromosom 3q25-q26 beim Prostatakarzinom
mit Hilfe molekular-zytogenetischer und quantitativer
PCR-Techniken**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Dipl. Biol.

Roland Kindich

Saarbrücken

August 2007

Tag des Kolloquiums: 19. Dezember 2007

Dekan: Prof. Dr. U. Müller

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Meese
Prof. Dr. B. Wullich

Meinen Eltern

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Bernd Wullich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Eckart Meese für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Human-genetischen Institut der Medizinischen Fakultät in Homburg, sowie für seine Bereitschaft, diese Arbeit als Erstgutachter zu bewerten.

Meinen Mitarbeitern Dr. Volker Jung, Dr. Jörn Kamradt, Dr. Frank Becker, Frau Helga Angeli, Frau Eva Schmidt, Frau Maria Chazimanoli, Frau Kerstin Wahrheit, Frau Maria Link, Frau Nadine Pasler sowie Prof. Dr. Gerhard Unteregger für die Hilfsbereitschaft, Aufmunterung und gute Laune.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang A. Schulz und dem Team des Urologischen Forschungslabors der Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf für die freundliche Aufnahme, Unterstützung, Betreuung und Kooperation vor allem während der Arbeiten in Düsseldorf.

Herrn Prof. Dr. Zimmermann, Dr. Martin Jung und dem Team des Institutes für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Medizinischen Fakultät in Homburg für die freundliche Zusammenarbeit innerhalb des gemeinsamen Projektes.

Herrn Dr. Jörn Kamradt und Dr. Jan Lehmann für die statistische Auswertung der Daten.

Allen Mitarbeitern, die mir während meiner Homburger Zeit privat und beruflich viel Freude und Ablenkung verschafft haben und mir hilfreich zur Seite standen. Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Markus Seifert, Frau Dr. Yasmin Mehraein, Frau Dr. Sandra Ehlhardt, Herr Dipl. Biol. Jens Radermacher und Frau Dipl. Biol. Eva Brunner.

Meinen Eltern, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung mein Studium erst ermöglicht haben.

Publikationen

Jung V*, **Kindich R***, Kamradt J, Jung M, Müller M, Schulz WA, Engers R, Unteregger G, Rahnenführer J, Stoeckle M, Zimmermann R, Wullich B: Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals *TLOCI/SEC62* as a probable target gene in prostate cancer. *Mol Cancer Res* **2006** Mar;4(3):169-76.

* Both authors contributed equally to this work.

Kindich R, Florl AR, Kamradt J, Lehmann J, Müller M, Wullich B, Schulz WA: Relationship of *NKX3.1* and *MYC* gene copy number ratio and DNA hypomethylation to prostate carcinoma stage. *Eur Urol* **2006** Jan;49(1):169-75.

Kindich R, Florl AR, Jung V, Engers R, Müller M, Schulz WA, Wullich B: Application of a modified *real-time* PCR technique for relative gene copy number quantification to the determination of the relationship between *NKX3.1* loss and *MYC* gain in prostate cancer. *Clin Chem* **2005** Mar;51(3):649-52.

Tagungsbeiträge

Kindich R, Jung V, Müller M, Schulz WA, Stöckle M, Wullich B (2005): *TLOCI* amplification and overexpression in prostate cancer. (57th Congress of the German Society of Urology, Düsseldorf)

Kindich R, Florl AR, Wullich B, Müller M, Ackermann R, Schulz WA (2004): DNA hypomethylation in prostate carcinoma correlates with the *NKX3A/MYC* gene copy number ratio. (99th Annual Meeting of the American Urological Association Education and Research Inc., San Francisco, California)

Kindich R, Florl AR, Müller M, Wullich B, Schulz WA (2004): Detection of genomic imbalances in prostate cancer using a novel DNA copy number quantification assay. (16th Symposium on Experimental Urology, Lübeck)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebs	1
1.2	Das Prostatakarzinom	1
1.2.1	Aufbau, Funktion und Pathologie der Prostata	2
1.2.2	Inzidenz und Ätiologie des Prostatakarzinoms	3
1.2.3	Histologie des Prostatakarzinoms	4
1.2.4	Klassifikation des Prostatakarzinoms	5
1.2.5	Diagnose und Therapie des Prostatakarzinoms	7
1.2.6	Problematik des Prostatakarzinoms	8
1.3	Molekulargenetik des Prostatakarzinoms	9
1.3.1	Chromosomale Veränderungen	9
1.3.2	Tumorsuppressorgene und Onkogene.....	11
1.3.2.1	<i>Tumorsuppressorgen NKX3.1</i>	12
1.3.2.2	<i>Onkogen MYC</i>	12
1.3.3	Genamplifikation	13
1.3.4	Chromosomale Region 3q25-q26 im Prostatakarzinom	16
1.4	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Verbrauchsmittel.....	19
2.1.3	Chemikalien	19
2.1.4	Enzyme	20
2.1.5	Antikörper und Sonden	20
2.1.6	Medien, Puffer und Lösungen.....	20
2.1.6.1	<i>Medien (Zellkulturen)</i>	20
2.1.6.2	<i>Puffer und Lösungen</i>	20
2.1.7	Kits	23
2.1.8	Sequenzen	24
2.1.8.1	<i>Größenstandards</i>	24
2.1.8.2	<i>Oligonukleotidprimer zur Untersuchung der Gen-Amplifikation</i>	25
2.1.8.3	<i>Oligonukleotidprimer zur Untersuchung der Gen-Expression</i>	26

2.1.9	Software	27
2.1.10	Datenbanken/Algorithmen/Software	27
2.1.11	Zelllinien	28
2.1.12	Gewebeproben	29
2.1.12.1	<i>Normalgewebe</i>	29
2.1.12.2	<i>Tumorgewebe</i>	29
2.1.12.3	<i>Blutproben</i>	31
2.1.13	Transport und Lagerung von Gewebeproben	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Zellbiologische Methoden	32
2.2.1.1	<i>Kultivierung humaner Zelllinien</i>	32
2.2.1.2	<i>Passagierung, Subkultivierung und Zählung von Zellen</i>	32
2.2.1.3	<i>Einfrieren und Lagerung von Zellen</i>	33
2.2.2	Nukleinsäurepräparation	33
2.2.2.1	<i>Isolierung von Nukleinsäuren</i>	33
2.2.2.2	<i>DNA-Isolierung</i>	33
2.2.2.3	<i>DNA-Isolierung aus Blutlymphozyten</i>	34
2.2.2.4	<i>DNA-Isolierung aus Zelllinien</i>	34
2.2.2.5	<i>DNA-Isolierung nach der Hochsalz-Methode</i>	34
2.2.2.6	<i>DNA-Isolierung mit dem Blood-and-Cell-Culture-Midi-Kit</i>	35
2.2.2.7	<i>RNA-Isolierung</i>	35
2.2.2.8	<i>RNA-Isolierung nach der Trizol[®]-Methode</i>	35
2.2.2.9	<i>Strataprep-Total-RNA-Miniprep-Kit (Stratagene)</i>	37
2.2.2.10	<i>RNA-Isolierung mit dem RNeasy-Mini-Kit (Qiagen)</i>	38
2.2.2.11	<i>Enzymatischer Verdau der Nukleinsäure</i>	38
2.2.2.12	<i>Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren</i>	38
2.2.3	Gelelektrophorese	39
2.2.3.1	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	39
2.2.3.2	<i>DNA-Agarose-Gelelektrophorese</i>	39
2.2.3.3	<i>RNA-Agarose-Gelelektrophorese</i>	40
2.2.4	Blottingverfahren und Hybridisierungen	41
2.2.4.1	<i>Southern-Blot</i>	41
2.2.4.2	<i>Herstellung und Markierung der MYC- und FraX-Gensonde</i>	41
2.2.4.3	<i>Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	42

2.2.4.4	<i>Nachweis der Markierung im DOT-Blot</i>	43
2.2.4.5	<i>Restriktionsverdau genomischer DNA</i>	44
2.2.4.6	<i>DNA-Transfer und Prähybridisierung der Membran</i>	45
2.2.4.7	<i>Denaturierung und Hybridisierung der Sonden-DNA</i>	46
2.2.4.8	<i>Stringenzwaschung der Membran</i>	46
2.2.4.9	<i>Immunologische Detektion und Auswertung</i>	46
2.2.5	Western-Blot.....	47
2.2.6	Standard PCR-Methoden.....	48
2.2.6.1	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i>	48
2.2.6.2	<i>Reverse-Transkription und RT-PCR</i>	49
2.2.6.3	<i>ALU-PCR</i>	49
2.2.6.4	<i>GAPDH-PCR</i>	51
2.2.6.5	<i>Gradienten-PCR</i>	52
2.2.6.6	<i>MYC-PCR</i>	53
2.2.7	Real-time PCR.....	54
2.2.7.1	<i>Quantitative real-time PCR mit dem LightCycler</i>	54
2.2.7.2	<i>Aufbau und Prinzip des Gerätes</i>	54
2.2.7.3	<i>Detektion der PCR-Produkte</i>	55
2.2.7.4	<i>Der CP-Wert</i>	56
2.2.7.5	<i>Schmelzkurvenanalyse</i>	57
2.2.7.6	<i>PCR-Effizienz und Standardkurven</i>	58
2.2.8	Real-time PCR-Methoden zur relativen Quantifizierung von Genen.....	61
2.2.8.1	<i>Real-time PCR-Methode zur Untersuchung der Genkopienzahl</i>	62
2.2.8.2	<i>Real-time RT-PCR-Methode zur Untersuchung der Genexpression</i>	64
2.3	Statistische Auswertung der Daten.....	65
3	Ergebnisse	66
3.1	Real-time PCR-Methode zur Bestimmung der Genkopienzahl.....	66
3.1.1	Auswahl und Design der Primer.....	66
3.1.2	PCR-Optimierung.....	66
3.1.3	PCR-Bedingungen.....	67
3.1.4	Beladungsschema.....	68
3.1.5	Sensitivität.....	69
3.1.6	Reproduzierbarkeit.....	71
3.1.7	PCR-Effizienz und Standardkurven.....	73

3.1.8	Bestimmung der Grenzwerte	74
3.2	<i>Real-time</i> RT-PCR-Methode zur Untersuchung der Genexpression	75
3.2.1	Auswahl und Design der Primer	75
3.2.2	PCR-Optimierung	75
3.2.3	PCR-Bedingungen	78
3.2.4	Beladungsschema	79
3.2.5	PCR-Effizienz, Standardkurven und Coefficient-File	80
3.2.6	Reproduzierbarkeit	81
3.3	Southern-Blot zur Untersuchung einer <i>MYC</i> -Amplifikation	82
3.4	<i>Real-time</i> PCR zur Untersuchung einer <i>MYC</i> -Amplifikation	83
3.5	<i>Real-time</i> PCR-Untersuchungen der Gene <i>NKX3.1</i> und <i>MYC</i>	84
3.5.1	Korrelation der Daten mit klinischen Parametern	88
3.5.2	Untersuchung der Tumorproben mit <i>NKX3.1</i> -Verlust	89
3.5.3	Untersuchung der Tumorproben mit <i>MYC</i> -Gewinn	90
3.5.4	Untersuchung der Ratio <i>NKX3.1/MYC</i>	91
3.6	Charakterisierung der Amplifikationsregion 3q25-q26	93
3.6.1	BAC-FISH-Untersuchungen zur Kartierung des Amplikons	94
3.6.2	<i>Real-time</i> PCR zur Untersuchung der Genkopienzahl	96
3.6.2.1	Untersuchung von Prostatakarzinomzelllinien und Tumorgewebeproben	97
3.6.2.2	Korrelation der Tumorproben mit klinischen Parametern	100
3.6.2.3	Untersuchung der Tumorproben mit erhöhter <i>TLOC1</i> -Genkopienzahl	101
3.6.3	<i>Real-time</i> RT-PCR zur Untersuchung der Genexpression	103
3.6.3.1	Untersuchung von Prostatakarzinomzelllinien und Tumorgewebeproben	104
3.6.3.2	Korrelation der Tumorproben mit klinischen Parametern	107
3.6.3.3	Untersuchung der Tumorproben mit erhöhter <i>TLOC1</i> -Genexpression	108
3.6.3.4	Untersuchung von Normal-Gewebeproben und einer Zellkultur	109
3.6.3.5	Untersuchung von BPH-Gewebeproben	110
3.6.4	Nachweis von <i>TLOC1</i> -Protein im Western-Blot	111
4	Diskussion	112
4.1	Genamplifikation in Tumoren	112
4.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR	116
4.3	Untersuchung der Gene <i>NKX3.1</i> und <i>MYC</i>	119
4.4	Charakterisierung der Region 3q25-q26 im Prostatakarzinom	120
4.5	Molekulargenetische Grundlagen von <i>TLOC1/SEC62</i>	123

4.6	Physiologische Funktion von <i>TLOC1/SEC62</i>	126
5	Zusammenfassung	128
6	Summary	130
7	Anhang	131
7.1	<i>Real-time</i> PCR-Daten zur Bestimmung der Grenzwerte	131
7.2	<i>Real-time</i> PCR-Daten der Genkopienzahl in Tumorzelllinien	132
7.3	<i>Real-time</i> PCR-Daten der Genkopienzahl in Tumoren	132
7.4	<i>Real-time</i> RT-PCR-Daten der Genexpression in Tumorzelllinien.....	133
7.5	<i>Real-time</i> RT-PCR-Daten der Genexpression in Tumoren	134
7.6	<i>Real-time</i> RT-PCR-Daten der Genexpression in Normalgeweben	136
7.7	Klinische Daten der untersuchten Prostatakarzinomproben	137
8	Literaturverzeichnis	138

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Ampere
AAH	Atypische Adenomatöse Hyperplasie
Abb.	Abbildung
ALU	kurze repetitive DNA-Sequenzen, hervorgerufen durch die Aktivität des Enzyms <i>ALU</i> -Restriktions-Endonuklease
AP	Alkalische Phosphatase

B

BAC	Bacterial Artificial Chromosome (engl.), künstliches Chromosom
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat, chromogenes Substrat für das Enzym Alkalische Phosphatase (AP)
BMI	Body Mass Index (engl.), Körpermassenzahl
BPH	Benigne Prostata Hyperplasie

C

°C	Grad Celsius
cm	Centimeter
cDNA	complementary (engl.), komplementäre DNA
CGH	Comparative-Genomische-Hybridisierung

D

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin, dient der Markierung von DNA und RNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (engl.), Nährmedium für die Zellkultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxynukleotid-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
DRU	Digital Rektale Untersuchung
ds DNA	doppel-strang DNA

E

E. coli	Escherichia coli
<i>EcoRI</i>	Escherichia coli Restriktionsenzym I
EDTA	Ethylendiamintetraaminosäure
Ery	Erythrocyten
et al.	et alia (lat.), und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

F

FA	Formaldehyd
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung

G

g Gramm
GITC Guanidinium-Isothiocyanat

H

h hour (engl.), Stunde
HCl Wasserstoff-Chlorid
H₂O_d Wasser (destiliert)

K

kb Kilobasenpaare
KCl Kalium-Chlorid
kDa Kilo-Dalton

L

l Liter
LC LightCycler, *real-time* PCR-Gerät
Lsg. Lösung

M

m milli- / Meter
M Molar
Mb Megabasenpaare
MgCl₂ Magnesium-Chlorid
min Minuten
MOPS 4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA messenger (engl.), Boten RNA

N

n nano-
NaAc Natrium-Acetat
NaCl Natrium-Chlorid
NaOH Natrium-Hydroxid
NBT Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, Di-Tetrazoliumsalsz, Redox-Farbstoff

O

OD optische Dichte
Oligo griechisch *oligo* - wenige

P

PBS phosphate buffered saline (engl.), Phosphatpuffer
PCa Prostatakarzinom
PCR Polymerase-Ketten (Chain)-Reaktion
pH negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonz.

R

Real-time PCR Echtzeit-PCR
RNA Ribonucleic Acid (engl.), Ribonukeinsäure
RNase Ribonuklease (Enzym)
RPMI Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RT Raumtemperatur / Reverse- Transkription

S

sek.	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat

T

T	Tumor
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetic Acid (Essigsäure)-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus (Bakterium)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tm	Schmelztemperatur
TURP	transurethrale Prostata Resektion
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRUS	transrektale Ultraschallsonographie

U

U	unit (engl.), Einheit
UICC	Union International Contre le Cancer (franz.), Internationale Vereinigung gegen Krebs
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht

V

V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	volume (engl.), Volumen pro Volumen

W

w/v	weight (engl.), Gewicht pro Volumen
-----	-------------------------------------

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Symbole:

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
μ	Mikro
Δ	Delta
%	Prozent

Sonstige Abkürzungen werden im Text erläutert.

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebserkrankungen stellen in Europa nach Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache dar (Becker 2001). Allein in Deutschland gibt es entsprechend den aktuellen Schätzungen des Robert Koch Instituts (5. Ausgabe, 2006) jährlich 424.250 Krebsneuerkrankungen und 11.422 Krebssterbefälle.

Während das mittlere Erkrankungsalter an Krebs für Männer und Frauen bei etwa 69 Jahren liegt, ist das mittlere Sterbealter an Krebs für Männer mit 71 und für Frauen mit 76 Jahren. Die häufigsten Krebsarten bilden in Deutschland Tumore der Lunge, Darm, Prostata und Brust (Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, 5. Ausgabe, 2006).

Die Ursachen, die zur Entstehung von Krebs führen, sind auf verschiedene genetische und umweltbedingte Faktoren zurückzuführen. Krebserkrankungen entstehen durch Ansammlung genetischer Veränderungen, die vererbt oder erworben sein können. Charakterisiert durch unkontrolliertes Wachstum, Hemmung der Differenzierung, Invasion und Metastasierung erfolgt die Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle in einem mehrstufigen genetischen Prozess (Vogelstein und Kinzler 1993).

1.2 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist in den westlichen Industriestaaten die häufigste maligne Erkrankung des Mannes ab 50 Jahre (Bracarda et al. 2005; Cancel-Tassin und Cussenot 2005) und nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache (Chong und Rashid 2005).

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts ist in Deutschland das Prostatakarzinom mit jährlich 48.650 Neuerkrankungen der häufigste diagnostizierte Tumor des Mannes (Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, 5. Ausgabe 2006).

Mit einem mittleren Erkrankungsalter von etwas über 70 Jahre liegt die Erkrankungsrate für das Prostatakarzinom in Deutschland im Vergleich zu den übrigen EU-Ländern an fünfter Stelle. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für das Prostatakarzinom bei 82% (Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, 5. Ausgabe 2006).

1.2.1 Aufbau, Funktion und Pathologie der Prostata

Die Prostata (Vorsteherdrüse) hat die Form und Größe einer Walnuss, befindet sich unterhalb der Harnblase, umschließt einen Teil der Harnröhre und gehört mit den Hoden zu den inneren Geschlechtsorganen des Mannes. Das Prostatagewebe besteht aus etwa 40 einzelnen Drüsen, die von Bindegewebe und glatter Muskulatur durchsetzt und von einer Kapsel umgeben ist (Abb. 1A). Zur Hauptfunktion der Prostata zählt die Produktion einer milchigen, leicht alkalischen Substanz, die zahlreiche Enzyme, Fette, Zucker und Mineralsalze enthält. Sie macht den größten Teil der Samenflüssigkeit aus und ist für die Beweglichkeit sowie den Transport der Samenzellen zuständig. Wachstum und Funktion der Prostata sind von dem männlichen Geschlechtshormon Testosteron abhängig, das hauptsächlich in den Hoden, zu einem geringen Teil aber auch in den Nebennieren gebildet wird (Prostatakrebs, Die blauen Ratgeber 17, 7. Ausgabe 2004).

Entsprechend dem Aufbau der Prostata können Veränderungen aus unterschiedlichen Bereichen der Prostata hervorgehen (Abb. 1B). Während die benigne Prostatahyperplasie (BPH) in der transitionalen Zone der Prostata entsteht und ab dem 55. Lebensjahr bei 1/3 der Männer zu einer altersbedingten gutartigen Vergrößerung der Prostata drüse führt, entwickelt sich das Prostatakarzinom aus der peripheren Zone (60-70%), der transitionalen Zone (10-20%) und der zentralen Zone (5-10%) der Prostata drüse (McNeal 1969, 1988; Schulz et al. 2003). Der klinische Verlauf des Prostatakarzinoms ist sehr unterschiedlich und kann zwischen langsam wachsenden und aggressiv wachsenden Formen unterschieden werden, die lokal begrenzt sind oder Metastasen bilden können.

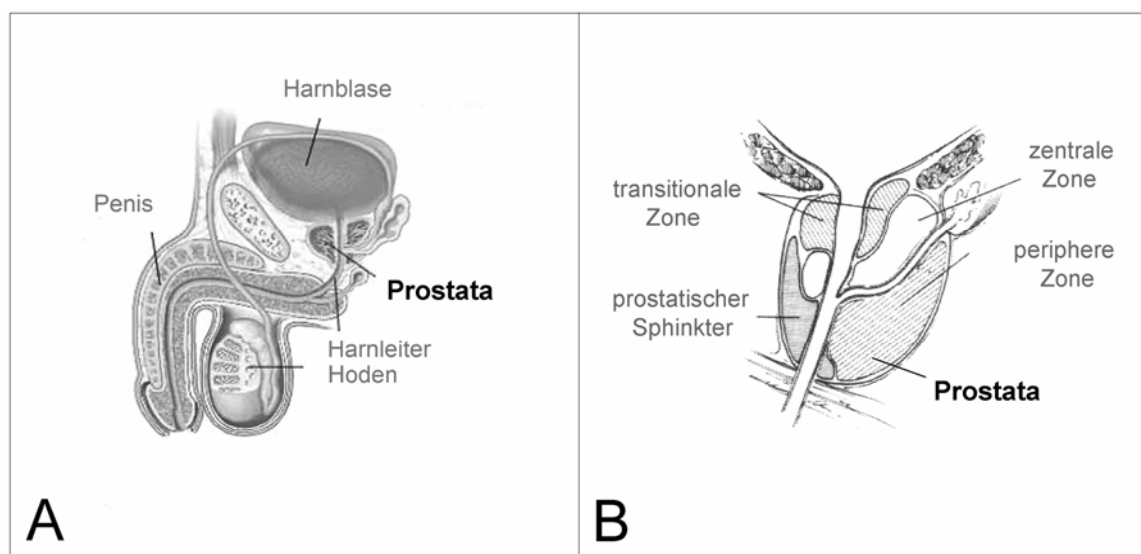


Abb. 1: Darstellung der männlichen Geschlechtsorgane mit Lokalisation (A) und Aufbau (B) der Prostata in verschiedenen Zonen der Prostatakarzinomentwicklung (transitionale, zentrale, und periphere Zone); Quellen modifiziert: <http://www.mojeprostate.cz> (Abb. 1A) und McNeal 1969 (Abb. 1B).

1.2.2 Inzidenz und Ätiologie des Prostatakarzinoms

Die Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms hat eine große geographische und ethnische Variation und ist in asiatischen Ländern geringer als in den westlichen Industriestaaten (Damber 2000; Matsuda et al. 2004). In Deutschland konnte seit Anfang der 90er Jahre ein Anstieg der Prostatakarzinominzidenz um 60-75% verzeichnet werden (Siddiqui et al. 2004), der neben dem zunehmenden Alter auf den erhöhten diagnostischen Nachweis des biochemischen Markers PSA (Prostata Spezifisches Antigen) im Blutserum zurückzuführen ist. Durch den Einsatz der PSA-Untersuchung können Karzinome früher erkannt und behandelt werden, wobei ein Rückgang der Sterberate zu beobachten ist (Jemal et al. 2006).

Risikofaktoren, die zur Entstehung von Prostatakrebs führen, sind neben zunehmendem Alter, Rasse, Art der Ernährung und Umwelteinflüssen auch eine familiär bedingte genetische Prädisposition (Li et al. 2004; Chan et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Übergewicht (BMI) durch fett- und kalorienreiche Ernährung (Damber 2000), regelmäßiger Konsum von rotem und gegrilltem Fleisch, Milch- und Molkerei-Produkten sowie ein hoher Anteil an gesättigten tierischen Fetten, Calcium und Zink zu einem erhöhten Prostatakarzinomrisiko führen können (Chan et al. 2005). Eine gesunde fettarme, faserreiche, vegetarische Ernährung mit vielen Ballaststoffen und einem hohen Anteil an Früchten, Gemüse, Olivenöl, Tomatenprodukten (Lycopene), Vitamin D3, Vitamin E, Selen und Omega-3-Fettsäuren senkt nachweislich das Prostatakarzinomrisiko (Chan et al. 2005; Chong und Rashid 2005; Sunny 2005). Besonders wirksam sind dabei die körpereigenen Abbauprodukte der tropischen Hülsenfrucht Soja (Isoflavonoide) und des Leinsamens (Lignane), die vor allem in vegetarischen Nahrungsmitteln ostasiatischer Länder wie Japan vorkommen (Chan et al. 2005). Einen chemopräventiven Schutz konnte auch für den Wirkstoff Catechin gezeigt werden, der zu der Gruppe der Polyphenole gehört und im Grünen Tee enthalten ist (Lee et al. 2006).

Eine genetische Prädisposition konnte für das hereditäre Prostatakarzinom in 5-10% der Fälle nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Genkopplungsanalysen wurden Suszeptibilitätsloci auf den Chromosomen 1, 8, 16, 17, 20 und X nachgewiesen (Kim und Steinberg 2000; Nupponen und Carpten 2001; Cussenot und Cancel-Tassin 2004; Cancel-Tassin und Cussenot 2005). Dabei konnten die Kandidatengene *RNASEL/HPC1* auf Chromosom 1q (Wang et al. 2002), *MSR1* auf Chromosom 8p und *ELAC2/HPC2* auf Chromosom 17p identifiziert werden (Nupponen und Carpten 2001).

1.2.3 Histologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist histologisch in 95% der Fälle ein Adenokarzinom (Karan et al. 2003) das überwiegend in der peripheren Zone der Drüse entsteht. Abhängig vom Grad der Veränderung unterschiedlicher Zelltypen (sekretorische, basale und neuroendokrine Zellen) können verschiedene Formen der Gewebeveränderung entstehen (Sakr und Partin 2001), die von einer atypischen adenomatösen Hyperplasie (*AAH*) über eine prostatiche intraepitheliale Neoplasie (*PIN*) bis hin zum Karzinom reichen (Abb. 2).

Als prä-maligne Läsion der Drüse stellt die high grade prostatiche intraepitheliale Neoplasie (*HGPIN*) die häufigste Form der Gewebeveränderung dar. Sie entsteht wie das Prostatakarzinom in der peripheren und transitionalen Zone der Drüse und stellt aufgrund mehrerer übereinstimmender molekular-genetischer Veränderungen eine Zwischenstufe zwischen dem benignem Epithel und dem Prostatakarzinom dar (Qian et al. 1999).

Eine high grade prostatiche intraepitheliale Neoplasie (*HGPIN*) konnte durch Autopsiestudien in 63-94% von malignen und 25-43% von benignen Prostaten gefunden werden (Sakr und Partin 2001). Durch Verlust der basalen und sekretorischen Zellschicht sowie Differenzierung und Akkumulation neuroendokriner Zellen (Abb. 2A) entsteht im Laufe der Zeit ein Prostatakarzinom mit unterschiedlicher Gewebedisorganisation (Abb. 2B), die zu verschiedenen molekulargenetischen Veränderungen führen kann (Abate-Shen und Shen 2000; Nelson 2003).

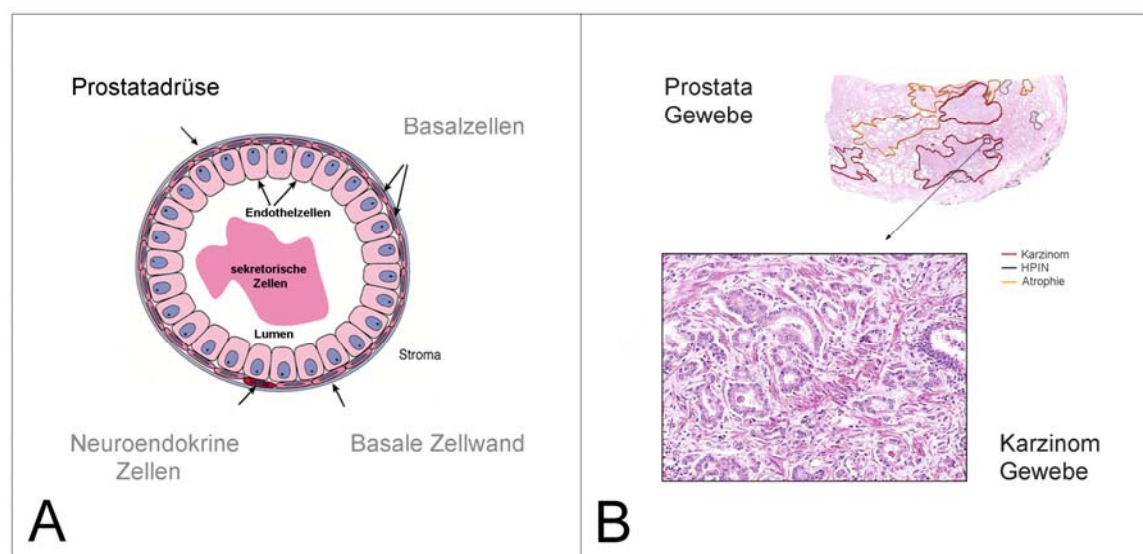


Abb. 2: Aufbau der Prostata mit den charakteristischen sekretorischen, basalen, und neuroendokrinen Zellen (A) und histologische Darstellung des heterogenen Prostatakarzinoms mit unterschiedlichen Typen von Gewebeveränderungen (B); Quellen modifiziert: Abate-Shen und Shen 2000 (Abb. 2A); Nelson 2003 (Abb. 2B).

1.2.4 Klassifikation des Prostatakarzinoms

Zur Diagnose des Prostatakarzinoms ist eine Klassifikation des Tumors notwendig, die sowohl die Tumorausbreitung als auch den Grad der Gewebedifferenzierung berücksichtigt (Tab. 1 und 2; Abb. 3).

Die Tumorausbreitung (*staging*) wurde gemäß der UICC, 5. Auflage, 1997 der TNM-Klassifikation bestimmt, die das Prostatakarzinom nach der lokalen Ausdehnung des Tumors (T = tumor), der Lokalisation und Anzahl befallener Lymphknoten (N = node) sowie Auftreten und Lokalisation von Metastasen (M = metastasis) einteilt und klinisch lokalisierte (T1, T2, T3, N0, M0) von fortgeschrittene (T3, T4, N1-N4, M1) Karzinome unterscheidet. Die Einteilung des Prostatakarzinoms wurde nach dem Grad seiner Ausbreitung tabellarisch (Tab. 1) und graphisch (Abb. 3A) dargestellt.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung gemäß UICC, 5. Auflage, 1997

Primärtumor (T)	
TX:	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0:	Keinen Anhalt für einen Primärtumor
T1:	Klinisch nicht erkennbarer Tumor
T1a:	Tumor; zufällig histologischer Befund in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b:	Tumor; zufälliger histologischer Befund in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c:	Tumor, aufgrund erhöhtem PSA Wert mittels Nadelbiopsie diagnostiziert
T2:	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a:	Tumor befällt eine Hälfte des Lappens oder weniger
T2b:	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens, aber nicht beide Lappen
T2c:	Tumor befällt beide Lappen
T3:	Tumor breitet sich durch die Prostatakapsel in extrakapsuläres Gewebe aus
T3a:	Einseitige extrakapsuläre Ausbreitung
T3b:	Beidseitige extrakapsuläre Ausbreitung
T3c:	Tumor infiltrierte Samenblase
T4:	Tumor ist fixiert oder infiltrierte andere benachbarte Strukturen als die Samenblase
T4a:	Tumor infiltrierte Blasenhalssphinkter externus und/oder Rectum
T4b:	Tumor infiltrierte Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert
Regionäre Lymphknoten (N)	
NX:	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0:	Keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1:	Metastase im solitären Lymphknoten, < 2 cm in der Ausdehnung
N2:	Metastase(n) im solitären Lymphknoten, > 2cm aber nicht mehr als 5 cm in der Ausdehnung oder in multiplen Lymphknoten, keine mehr als 5 cm in der Ausdehnung
N3:	Metastasen im Lymphknoten, mehr als 5 cm in der Ausdehnung
Fernmetastasen (M)	
M1a:	Nicht – regionäre Lymphknoten
M1b:	Knochen
M1c:	andere Lokalisation

Der Grad der Gewebedifferenzierung (*grading*) wurde entsprechend der Einteilung nach Gleason (1974) bestimmt und Karzinome in niedrig differenzierte (1) bis hoch differenzierte (5) Tumore eingeteilt. Nach histologischer Untersuchung wurde aufgrund der multifokalen Eigenschaft des Prostatakarzinoms der Tumor in zwei Bereiche [2x(G=1-5)] unterschiedlicher Gewebezusammensetzung betrachtet, die Grade des größten und zweitgrößten Tumorareals addiert und als kombinierter Gleasongrad (Gleason-Score) von 2 (1 + 1) bis 10 (5 + 5) angegeben. Die Einteilung des Prostatakarzinoms nach dem Grad der Gewebedifferenzierung wurde tabellarisch (Tab. 2) und graphisch (Abb. 3B) dargestellt.

Tabelle 2: Histologisches Grading des Prostatakarzinoms nach Gleason (1974)

Grad	Histologisches Muster
1	Umschriebene Knoten von einheitlichen, einzelnen, enggepackten und glatt begrenzten Drüsen.
2	Drüsen eher locker angeordnet, aber immer noch umschrieben. Minimale Ausbreitung der neoplastischen Drüsen in das umgebende Stroma.
3	Tumor infiltriert das umgebende Prostatagewebe. Drüsen variieren erheblich in Größe und Gestalt, sind aber abgrenzbare Einheiten.
4	Drüsen sind nicht länger einzeln und abgegrenzt, sondern scheinen verschmolzen mit unregelmäßigen Grenzen.
5	Aufhebung der glandulären Differenzierung. Tumoren bestehen aus soliden Nestern, Strängen oder Einzelzellen.

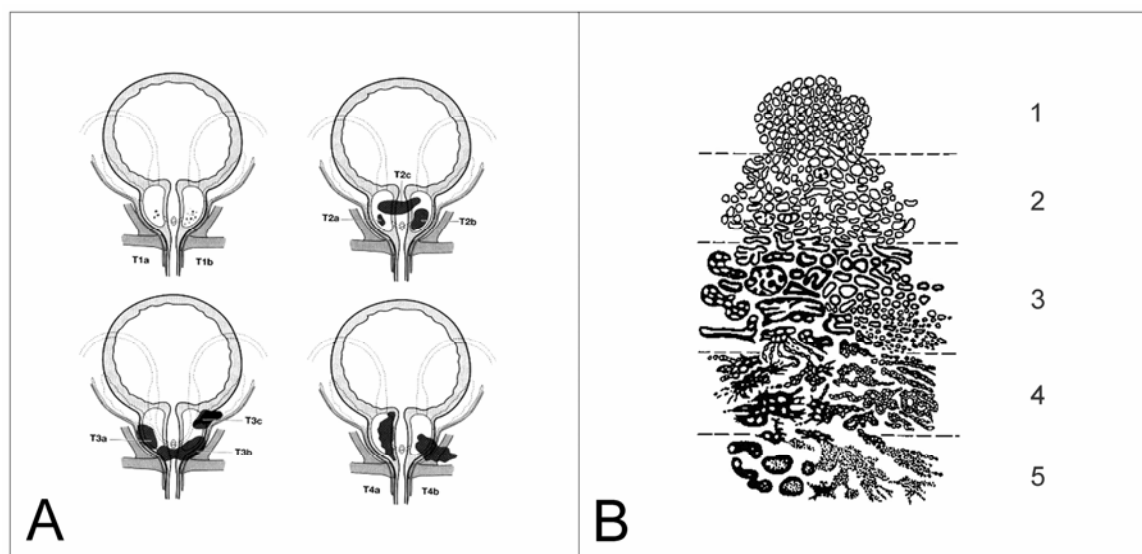


Abb. 3: Einteilung des Prostatakarzinoms nach dem Grad seiner Ausbreitung in Tumorstadien T1-T4 (A) und Grad der Gewebedifferenzierung G1-G5 (B), Quelle: Gleason 1974 (Abb. 2B)

1.2.5 Diagnose und Therapie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist ein langsam wachsender, im Frühstadium symptomloser und daher schwer zu diagnostizierender Tumor, der für viele Jahre klinisch unauffällig bleibt (Harvei 1999). Bei rechtzeitiger Diagnose bestehen jedoch für das Prostatakarzinom gute Heilungschancen.

Zur Diagnose einer Prostataerkrankung wird ab dem 50. Lebensjahr im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung eine digital-rektale-Untersuchung (DRU) der Prostata und eine Bestimmung der Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blutserum durchgeführt, der zur Zeit der einzige Marker für ein eventuell vorhandenes Prostatakarzinom ist (Altwein und Mohandessi 2000; Roscigno et al. 2004).

PSA wird von malignen und normalen Prostatazellen gebildet, wobei eine Erhöhung dieses Wertes mit einer gesteigerten Proliferation von Prostatazellen in Verbindung gebracht wird. Bei Verdacht auf ein Prostatakarzinom durch einen auffälligen rektalen Tastbefund oder einem erhöhten PSA-Wert ($>4\text{ng/ml}$) erfolgt zur Diagnosesicherung eine Gewebeentnahme (Biopsie), die heutzutage Ultraschall-gesteuert durchgeführt wird.

Nach einem positiven histologischen Befund werden weitere Untersuchungen durchgeführt, die Informationen über das Stadium der Tumorausbreitung liefern. Karzinome, die über die Prostata hinaus bereits Metastasen in unterschiedlichen Organen wie Samenblasen, Lymphknoten, Lunge oder Knochen gebildet haben, können durch bildgebende Methoden wie die Röntgenuntersuchung und die Knochenszintigraphie sichtbar gemacht werden (Abb. 4).

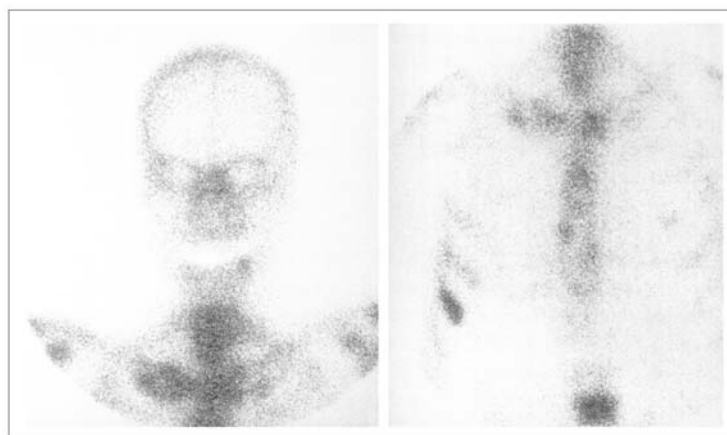


Abb. 4: Knochenszintigraphie zum Nachweis von PCa-Metastasen (Quelle: Prostatakrebs-Ratgeber Nr.17 der Deutschen Krebshilfe)

Zur Behandlung des Prostatakarzinoms stehen unterschiedliche Therapiemöglichkeiten zur Verfügung, die abhängig vom Stadium der Tumorerkrankung heilend (kurativ) oder schmerzlindernd (palliativ) sein können.

Während die Behandlung lokal begrenzter Prostatakarzinome (pT1-pT2) meistens operativ durch eine komplette Entfernung (Resektion) der Prostata oder mittels Strahlentherapie durchgeführt wird, ist im fortgeschrittenen Stadium (pT3-pT4) der Erkrankung eine Heilung nur noch begrenzt möglich. In diesen Fällen kann ein Androgenentzug die weitere Ausbreitung des Tumors in umliegendes Gewebe zumindest vorübergehend verhindern.

Eine Kombination von Hormon- und Strahlentherapie kann in 80-85% der Fälle zu einer Besserung der Erkrankung führen (Bracarda et al. 2005). Im Endstadium der Erkrankung, in dem der Tumor hormonunabhängig wächst und Metastasen in anderen Organen gebildet hat, ist eine Heilung nicht mehr möglich.

1.2.6 Problematik des Prostatakarzinoms

Die Problematik der Diagnose und Behandlung des Prostatakarzinoms liegt in der frühzeitigen Erkennung und Unterscheidung von klinisch insignifikanten und signifikanten Tumoren (Becopoulos 2005). Weil das Prostatakarzinom ein sehr heterogener und in der Regel langsam wachsender Tumor ist, der erst im Alter klinisch manifest wird und nur im fortgeschrittenen Stadium Symptome zeigt, ist eine frühzeitige Diagnose und Behandlung des Tumors dringend erforderlich. Eine zuverlässige Methode zur Unterscheidung klinisch relevanter von irrelevanten Tumoren gibt es jedoch mit ausreichender Sicherheit nicht.

Der einzige etablierte biochemische Marker, der im Prostatakarzinom Hinweise für das Vorliegen eines Tumors liefern kann, ist das PSA im Blutserum des Patienten (Small und Roach 2002). Da das Protein aber nicht nur im Tumor sondern auch in normalen und entzündlichen Zellen der Prostata gebildet wird, lässt eine Erhöhung dieses Wertes nicht immer auf ein Prostatakarzinom schließen und kann in einigen Fällen zu einer fehlerhaften Diagnose und Behandlung führen (Perry et al. 2006).

Mit einer hohen Sensitivität aber einer geringen Spezifität ist das PSA zur Erkennung früher Prostatakarzinome und Unterscheidung klinisch insignifikanter von signifikanten Tumoren nur begrenzt geeignet (Perry et al. 2006).

Ein beträchtlicher Anteil der Tumore, die durch einen erhöhten PSA-Wert ($>4\text{ng/ml}$) entdeckt werden sind klinisch nicht manifest und werden es wahrscheinlich auch nicht. Unklar ist, wie viele dieser Tumore klinisch insignifikant bleiben. Umgekehrt zeigen klinische Studien, dass zum Zeitpunkt der Diagnose bereits 20% der Patienten ein fortgeschrittenes Prostatakarzinom entwickelt haben, das nicht mehr geheilt werden kann (Siddiqui et al. 2004). Für die Kliniker stellt sich daher die Frage, ob ein Patient mit einem Prostatakarzinom nur beobachtet (*watchful waiting*) oder mit aggressiver Therapie behandelt werden soll. Aufgrund des unterschiedlichen klinischen Verlaufes der Prostatakarzinome, ist daher ein wichtiges Ziel der Prostatakarzinomforschung die Identifikation von Tumormarkern, die klinisch insignifikante von signifikanten Tumoren unterscheiden können.

1.3 Molekulargenetik des Prostatakarzinoms

Die molekularen Mechanismen zur Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms sind aufgrund der umfangreichen Heterogenität des Tumors weitgehend unbekannt (Fu et al. 2000; Karan et al. 2003; Strohmeyer, 2004). Wie bereits beim Mamakarzinom und Colonkarzinom gezeigt wurde, ist ein Mehrschritt-Modell der Tumorentwicklung durch Akkumulation genetischer Veränderungen auch für das Prostatakarzinom wahrscheinlich (Bott 2005; Strohmeyer et al. 2004).

Genetische Veränderungen können dabei entweder auf Nukleotidebene (Insertion, Deletion, Basensubstitution) oder auf chromosomaler Ebene (Translokation, Chromosomenbrüche) durch Gewinn oder Verlust ganzer oder bestimmter Teile von Chromosomen erfolgen. Eine steigende Anzahl chromosomaler Veränderungen konnte im Prostatakarzinom mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden (Karan et al. 2003).

1.3.1 Chromosomale Veränderungen

Durch molekulargenetische und molekular-zytogenetische Methoden wie die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) und die Mikrosatellitenanalyse konnten bis heute eine Vielzahl verschiedener genetischer Veränderungen auf unterschiedlichen Chromosomen nachgewiesen werden (Alers et al 2000; Dong 2001; Torring et al. 2007), die zu einer veränderten Genexpression oder zu Veränderungen in der Funktion von Proteinen führen können (Roylance et al. 1997).

Die häufigsten chromosomalen Veränderungen im Prostatakarzinom befinden sich in abnehmender Reihenfolge auf Chromosom 8 (Nupponen und Visakorpi 2000), 13 (Hyytinen et al. 1999), 7 (Alers et al. 2000), 10 (Leube et al. 2002), 16, 6 und 17. Zusätzliche Veränderungen konnten auf den Chromosomen 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15, 18, 20, X und Y gefunden werden (Sattler et al. 1999; Alers et al. 2000).

Häufige Verluste konnten auf den Chromosomen 2, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 16, 18 und Y, häufige Gewinne auf den Chromosomen 1, 3, 7, 8, 9, 15, 17, 20 und X gefunden werden (Sattler et al. 1999; Alers et al. 2000; Wullich et al. 2004). Während Verluste von genetischem Material in früheren Stadien des Prostatakarzinoms vorherrschen (Dong 2001), werden Gewinne vorwiegend in fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms gefunden (Damber 1999; Nupponen und Visakorpi 1999). Ein signifikanter Anstieg in der Anzahl chromosomaler Veränderungen und Gewinne pro Fall konnte mit zunehmendem Tumorstadium in Verbindung gebracht werden (Alers et al. 2001; Elo und Visakorpi 2001). Während in frühen Tumoren vor allem Verluste der Chromosomenarme 6q, 13q und 8p (Alers et al. 2001; Macoska et al. 1995; He et al. 1997) gefunden und mit der Entstehung des Prostatakarzinoms assoziiert wurden, konnten in fortgeschrittenen und metastasierenden Tumoren vorwiegend Gewinne auf den Chromosomen 1q, 7q, 8q und Xq nachgewiesen werden (Alers et al. 1997, 2001; Van Dekken et al. 2003).

Das Chromosom 8 gehört zu den häufigsten veränderten Chromosomen im Prostatakarzinom (Dong 2001). CGH, FISH und Mikrosatelliten-Untersuchungen haben übereinstimmend gezeigt, dass Veränderungen auf Chromosom 8 mit einem aggressiveren Verhalten des Prostatakarzinoms assoziiert sind (Van Dekken et al. 2003), wobei in den unterschiedlichen Studien eine Assoziation mit einem höheren Tumorstadium und höheren Tumorgrad (Alers et al. 2000; Tsuchiya et al. 2002; Matsuyama et al. 2003), höheren Metastasierungs- und Rezidivraten (Macoska et al. 2000; Steiner et al. 2002) sowie einer höheren Mortalität (Jenkins et al. 1998; Sato et al. 1999) gefunden wurde. Während die meisten Studien eine Assoziation mit 8p-Verlusten (Jenkins et al. 1998; Matsuyama et al. 2003) nachgewiesen haben, konnten in anderen Studien eine Assoziation mit 8q-Gewinnen (Sato et al. 1999; Steiner et al. 2002; Tsuchiya et al. 2002) gefunden werden. Verluste von Regionen auf Chromosom 8p konnten in bis zu 80% der Fälle in der frühen Karzinogenese des Prostatakarzinoms (Cher et al. 1996; Nupponen und Visakorpi 2000), Gewinne von Regionen auf Chromosom 8q in bis zu 85% der Fälle vor allem in Metastasen, androgenunabhängigen- und hormonrefraktären Prostatakarzinomen (Cher et al. 1996; Steiner et al. 2002) nachgewiesen werden.

Die Veränderungen auf Chromosom 8 sind nicht gleichförmig. In verschiedenen Tumorregionen scheinen Bereiche auf 8p und 8q individuell und/oder gleichermaßen betroffen zu sein (Virgin et al. 1999; Macoska et al. 2000). Tatsächlich sind diese beiden Veränderungen mechanistisch miteinander verbunden (Macoska et al. 2000; Birnbaum et al. 2003). Strukturelle chromosomale Veränderungen wie zum Beispiel die Bildung eines 8q-Isochromosoms führt zu Gewinnen von genetischem Material auf 8q bei gleichzeitigem Verlust von 8p (Macoska et al. 2000). Die individuellen Effekte eines Verlustes von 8p und eines Gewinns von 8q sind schwer zu unterscheiden. Eine Untersuchung der Ratio 8p/8q der beiden Regionen zueinander, die mit einem gesamtklinischen Verhalten assoziiert sind, könnte für eine molekulare Einteilung von Prostatakarzinomen und als ein prognostischer Parameter nützlich sein.

Unter den am häufigsten gemeinsam gewonnenen und verlorenen Genen im Prostatakarzinom gehören auf dem Chromosom 8 das Tumorsuppressorgen *NKX3.1* auf 8p21.2 und das Onkogen *MYC* auf 8q24.21 (Sato et al. 1999; Tsuchiya et al. 2002).

1.3.2 Tumorsuppressorgene und Onkogene

Tumorsuppressorgene und Onkogene bilden zwei Klassen von Kontrollgenen, die an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind (Anderson 1992). Im normalen Zustand kontrollieren sie die Proliferation und Differenzierung von Zellen und schützen diese vor einer malignen Entartung. Funktionelle Veränderungen der Kontrollgene können die Kontrollmechanismen der Zelle beeinflussen und zur Entstehung von Tumoren führen. Der Verlust der Funktion von Tumorsuppressorgen und die Aktivierung zellulärer Onkogene sind wichtige Ereignisse in der Transformation normaler Zellen (Duffy 1993).

Tumorsuppressorgene sind Gene, die im normalen Zustand die Proliferation von Zellen hemmen. Sie können durch verschiedene Mechanismen (z.B. Mutationen, Deletionen, Methylierung) inaktiviert werden. Sind beide Allele eines Gens betroffen, kommt es zum Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens und damit zur Tumorbildung. Onkogene gehen aus Proto-Onkogenen hervor, die für die normale Proliferation und Differenzierung von Zellen zuständig sind. Mutationen (z.B. Amplifikation) können zur Aktivierung von Proto-Onkogenen führen, wobei ein verändertes Allel zur Aktivierung ausreicht.

Zwei wichtige Vertreter dieser beiden Klassen von Genen stellen im Prostatakarzinom das Tumorsuppressorgen *NKX3.1* und das Onkogen *MYC* dar.

1.3.2.1 Tumorsuppressorgen *NKX3.1*

Das Tumorsuppressorgen *NKX3.1* ist ein prostataspezifisches Homeoboxgen, das im frühen Stadium des Prostatakarzinoms häufig verloren, methyliert und vermindert exprimiert ist (Abdulkadir et al. 2002, 2005; Asatiani et al. 2005). Das Gen kodiert für ein Transkriptionsfaktor, der an der normalen Differenzierung des Prostataepithels beteiligt ist (Abdulkadir et al. 2002; Shen und Abate Shen 2003). Durch Androgene induziert fördert es das Wachstum und die Differenzierung von Epithelzellen sowie die Produktion sekretorischer Proteine in der Prostata (Bowen et al. 2000; Abdulkadir et al. 2002; Schulz und Hatina 2006).

NKX3.1 ist in der Region 8p21.2 lokalisiert, die in bis zu 85% der Prostatakarzinome ein Verlust der Heterozygotie (LOH) aufweist (He et al. 1997; Voeller et al. 1997). Der Verlust des Gens ist an der Initiation und Progression von PIN-Läsionen beteiligt, die Vorläufer des Prostatakarzinoms darstellen (Abdulkadir et al. 2002, 2005). In Mausmutanten führt der Verlust eines oder beider Allele des Gens zur Entwicklung einer epithelialen Hyperplasie und PIN, die humanen PIN-Läsionen ähneln (Bhatia-Gaur et al. 1999; Abdulkadir et al. 2002, 2005; Magee et al. 2003).

Ein Verlust der *NKX3.1* Proteinexpression konnte in BPHs, humanen PIN-Läsionen, primären und hormonrefraktären Prostatakarzinomen sowie Metastasen nachgewiesen und mit der Tumorprogression assoziiert werden (Bowen et al. 2000; Abdulkadir et al. 2002; Asatiani et al. 2005). Während somatische Mutationen im *NKX3.1*-Gen bis heute nicht gefunden wurden (Voeller et al. 1997; Bowen et al. 2000) konnten im hereditären Prostatakarzinom Keimbahnmutationen des Gens nachgewiesen werden, die zu einer verminderten Bindung des mutierten Proteins an die DNA führen (Zheng et al. 2006).

1.3.2.2 Onkogen *MYC*

Das Proto-Onkogen *MYC* (*C-MYC*) ist ein zelluläres Onkogen, das an der Entstehung und Progression von vielen Tumoren des Menschen beteiligt ist (Boxer und Dang 2001; Adhikary und Eilers 2005; Hooker und Hurlin 2006). Das Gen gehört zur Familie der Onkogene *N-MYC* und *L-MYC*, die zur neoplastischen Transformation von Zellen weder Mutationen (Mai und Mushinski 2003) noch Wachstumsfaktoren benötigen (Bernard und Eilers 2006). Zur Initiation der Transformation reicht eine fehlerhafte Expression des Gens aus (Mai und Mushinski, 2003).

MYC ist in der Region 8q24.21 lokalisiert und kodiert für ein Transkriptionsfaktor, der zusammen mit den Bindungspartnern Max und Mad die Transkription verschiedener Gene positiv oder negativ regulieren kann (Gallant 2006; Hooker und Hurlin 2006; Kleinkohlbrecher et al. 2006). Die Aktivierung und Regulation der Transkription erfolgt durch Bindung von *MYC* und seinen Bindungspartnern an bestimmte E-Box-Sequenzen (CACGTG) im Promotorbereich von Genen (Hooker und Hurlin 2006).

Eine konstitutive Expression des Proto-Onkogens *MYC* kann zu einer veränderten Expression assoziierter Gene und zur onkogenen Transformation von Zellen führen (Wade und Wahl 2006). In transgenen Mäusen führt eine *MYC*-Überexpression zur Entwicklung epithelialer Gewebeveränderungen, die den PIN-Läsionen (Zhang et al. 2000; Sakr und Partin 2001) und schlecht differenzierten Prostatakarzinomen des Menschen (Williams et al. 2005) ähneln. Die veränderten Zellen exprimieren den Androgenrezeptor (AR) und das prostataspezifische Antigen (PSA), die beide charakteristische Marker für das Prostatakarzinom darstellen (Williams et al. 2005).

Neben der transkriptionellen Regulation bestimmter tumorassoziierter Gene kann *MYC* auch die Stabilität des Genoms beeinflussen, die durch eine Initiation der Genamplifikation und karyotypischer Instabilität gekennzeichnet ist (Mai und Mushinski 2003). Eine Amplifikation des *MYC*-Gens konnte in lokal fortgeschrittenen- (Tsuchiya et al. 2002; Sato et al. 2006) und hormon-refraktären Prostatakarzinomen (Cassinelli et al. 2005) gefunden und mit Tumorprogression und Krebs Tod (Tsuchiya et al. 2002; Sato et al. 2006) assoziiert werden. Eine erhöhte karyotypische Instabilität wurde zwischen einer *MYC* mRNA-Überexpression und einer erhöhten *hTERT*-Expression festgestellt, die eine Untereinheit des Enzyms Telomerase darstellt und für die Integrität der Telomere an den Chromosomenenden zuständig ist (Latil et al. 2000).

1.3.3 Genamplifikation

Eine alternative Methode der Genregulation stellt die Genamplifikation dar, die bei der Entstehung von Tumoren und zytostatikaresistenz-Genen eine wichtige Rolle spielt (Slack 2006). Sie konnte in verschiedenen Organismen wie z.B. Bakterien (*Escherichia Coli*; Slack 2006), Hefen (*Saccharomyces Cerevisiae*; Watanabe und Horiuchi 2005), Insekten (*Drosophila Melanogaster*; Spradling 1980) und Säugetieren (Bostock 1986; Coquelle et al. 1997) nachgewiesen und mit der Progression verschiedener Krebsarten assoziiert

werden (Coquelle et al. 2002). Die häufigsten DNA-Amplifikationsereignisse wurden in somatischen Zellkernen nachgewiesen und haben keinen Effekt auf die Evolution des Genoms (Bostock 1986).

Die Genamplifikation ist eine genetische Veränderung, die es Zellen ermöglicht, zusätzliche Kopien eines kleinen Teils ihres Genoms zu vermehren (Ciullo et al. 2002). Sie wird bei der Differenzierung von Zellen benötigt, dient der Steigerung der Gendosis und ist ein allgemeiner genetischer Mechanismus zur Hochregulation der Genexpression und Proteinmenge (Schwab 1999; Tower 2004; Claycomb und Orr-Weaver 2005).

Die Genamplifikation spielt in der Karzinogenese von Tumoren und bei der Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika eine wichtige Rolle (Slack 2006). Eine Zunahme in der Kopienzahl bestimmter Gene kann die Initiation und Progression von Tumoren begünstigen und Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber chemischen Agenzien ermöglichen (Narayanan et al. 2006). Die Genamplifikation kann in eine *entwicklungsregulierte* und *spontane* Form eingeteilt werden (Schwab 1999).

Eine *entwicklungsregulierte* Genamplifikation konnte bei Insekten und Geflügel beobachtet werden, die in einem bestimmten Entwicklungsstadium die Menge eines bestimmten Genproduktes (RNA oder Protein) steigern können (Schwab 1999; Tower 2004). Eine Amplifikation von Choriongenen konnte in Ovarien der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*, Spradling 1980), eine Amplifikation der Aktogene während der Myogenese in Hühnern (Tower 2004) beobachtet werden.

Eine *spontane* Genamplifikation konnte bei Säugetieren beobachtet und in zwei verschiedene Formen eingeteilt werden (Schwab 1999). Während die induzierte Genamplifikation unter Einwirkung zytotoxischer Mittel entsteht (Schimke 1984; Stark et al. 1989), beschreibt die nichtinduzierte Genamplifikation eine spontan auftretende Amplifikation, deren Auslöser unbekannt ist und vor allem während der Tumorgenese beobachtet wurde (Alitalo und Schwab 1986).

Genamplifikationen können zytogenetisch in extrachromosomale und intrachromosomale Amplifikationen (Stark et al. 1989; Windle und Wahl, 1992; Debatisse et al. 1998) eingeteilt und in Metaphasen von Tumoren als *double minutes (dmins)* oder *homogeneously staining regions (HSRs)* nachgewiesen werden (Narayanan et al. 2006).

Double minutes (dmins) sind kleine, ringförmig gepaarte extrachromosomale DNA-Fragmente, die kein Centromer aufweisen und bis zu mehreren hundert Kopien eines genomischen Abschnitts enthalten können (Schwab 1999; Narayanan et al. 2006). Sie

gehen aus ungefähr 250 bp große azentrische und autonomreplizierende extrachromosomale DNA-Abschnitte hervor, die als Episome bezeichnet werden (Carroll et al. 1988; Ruiz und Wahl 1990).

Homogeneously staining regions (HSRs) sind intrachromosomale DNA-Fragmente, die aus viele nacheinander angeordnete Kopien (Tandem-Wiederholungen) der amplifizierten DNA-Sequenz bestehen und nach einer Chromosomenbänderung als einheitlich gefärbte Chromosomenabschnitte erkennbar werden (Schwab 1999; Narayanan et al. 2006).

Bei der Entstehung von Genamplifikationen spielen fragile Stellen und Doppelstrangbrüche innerhalb von Chromosomen eine wichtige Rolle (Slack 2006). Sie führen zum Ausschluss und zur Reintegration von genetischem Material und sind an der Entstehung von extra- und intrachromosomalen Amplifikationen beteiligt (Coquelle et al. 1998).

Extrachromosomale Elemente wie Episome und *dmins* sind frühe und initiale Vorboten der Genamplifikation, gehen durch Deletion von genetischem Material aus Chromosomen hervor (Carroll et al. 1988) und konnten in tierischen und menschlichen Tumorzellen sowie in vielen zytostatikaresistenten Zelllinien und Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Ruiz und Wahl 1990; Schwab 1999). Sie können in Chromosomen wieder integriert werden und zu chromosomaler Instabilität und zur Ausbildung von HSRs führen (Coquelle et al. 1998; Ruiz und Wahl 1990; Schwab 1999).

Die Reintegration der amplifizierten Sequenzen (*dmins*) kann durch chemische Agenzien induziert werden und erfolgt häufig in der Nähe von zentromer- und telomer-gelegenen fragilen Stellen, die für die Initiation der Amplifikation (Telomer) sowie für die Bestimmung von Größe, Sequenzgehalt und Organisation der Amplifikationseinheit (Zentromer) zuständig sind (Coquelle et al. 1997, 1998; Debatisse et al. 1998). Eine Induktion fragiler Stellen zur Ausbildung intrachromosomaler Amplifikationen konnte für das chemische Agens Aphidicolin (Hypoxia) nachgewiesen werden. Es kann zur Fusion und Reintegration von *dmins* innerhalb von fragilen Stellen sowie zur Ausbildung von HSRs führen (Coquelle et al. 1998).

Spontane Genamplifikationen konnten während der Amplifikation von Proto-Onkogenen in unterschiedlichen Tumoren und Tumorzelllinien nachgewiesen und mit dem Stadium der Tumorprogression assoziiert werden (Alitalo und Schwab 1986; Fukumoto et al. 1988; Coquelle et al. 2002).

1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung einer bereits durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe untersuchten Amplifikationseinheit auf Chromosom 3q25-q26 (Sattler et al. 1999, 2000) zur Identifizierung neuer Kandidatengene für das Prostatakarzinom.

Im Einzelnen werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Eingrenzung und Feinkartierung der Amplifikationseinheit auf Chromosom 3q25-q26 wird mit Hilfe der Fluoreszenz-*insitu*-Hybridisierungs-Untersuchung (FISH) und region-spezifischer BAC-Klone an Prostatakarzinomzelllinien durchgeführt.
2. Gene, die in der Amplifikationseinheit lokalisiert sind, werden zusätzlich zu denen in der Literatur auf Chromosom 3q beschriebenen Genen bei Prostatakarzinomen auf Amplifikation untersucht. Für die Untersuchungen von primären Tumorgeweben soll mit dem LightCycler-Gerät eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Genkopienzahlen etabliert werden. Die Validierung der Methode erfolgt am Beispiel der Gene *NKX3.1* und *MYC* auf Chromosom 8.
3. Als amplifiziert nachgewiesene Gene werden mit Hilfe der *real-time* RT-PCR auf Überexpression untersucht. Dabei wird eine bereits etablierte Methode zur relativen Quantifizierung von Gen-Transkripten zur Anwendung gebracht.
4. Die Amplifikation der bereits identifizierten Gene *IL12A*, *MDS1*, *SLC2A2* und *SOX2* innerhalb der Region 3q25-q26 soll mit Hilfe der *real-time* PCR an einer größeren Zahl von Prostatakarzinomen unterschiedlichen Tumorstadiums und Malignitätsgrades untersucht werden.
5. Die als amplifiziert und überexprimiert nachgewiesene Gene werden hinsichtlich ihrer Relevanz als molekulare Marker für das Prostatakarzinom charakterisiert und Zusammenhänge zu klinischen, histomorphologischen und anderen molekularen Parametern überprüft.

Alle Untersuchungen in den Bereichen der Amplifikation und Expression der Gene werden zuerst an Prostatakarzinomzelllinien und anschließend an nativem Tumorgewebe sowie Normalgewebe durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Produkt	Firma	Ort
Agarose-Gelkammer, Easy-Cast™	Owl, Scientific Inc.	Wobum, USA.
Autoklav	Tuttnauer 5075 ELV	Wesel
Brutschrank (37°C), HERAcell	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Gefrierschrank (-80°C) Nepcoil UF600	Hettich AG	Bäch
Geldokumentationsanlage, Imago	B&L Systems	Maarsen, NL
Heizplatte	RS, Laborgeräte	Martinsried
Homogenisator, Micra RT D-8	Labortechnik	Müllheim
Kühl- und Gefrierschrank (4°C;-20°C)	Privileg	Fürth
Mikroskop, Umkehrmikroskop	Olympus	Hamburg
Mikrowelle, Privileg 1026E	Privileg	Fürth
Netzgerät, Electrophoresis Power Supply P300	Amersham Biosciences	Freiburg
PCR-Gerät, Thermocycler, PTC 200	Biozym	Oldendorf
PCR-Gerät, Real-time, LightCycler	Roche	Mannheim
PCR-Gerät, Gradient, Mastercycler	Eppendorf	Hamburg
Personal Densitometer, Molecular Dynamics	Amersham Biosciences	Freiburg
PH-Meter, InoLab	WTW	Weilheim
Photometer, Ultrospec 3000	Amersham Biosciences	Freiburg
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph	Kelheim
Vakuumpumpe mit Fußschalter, Vacusafe	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Vakuumentrifuge, SpeedVac, UniEquip	RS, Laborgeräte	Martinsried
UV-Transilluminator, UV-Stratalinker 1800	Stratagene	LaJolla, USA
Überkopffrotator, GFL 3025	Labortechnik GmbH	Burgwedel
Vortexer, VFL	Janke&Kunkel GmbH	Staufen
Werkbank, HERAsafe	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Waage, Fein (770), Grob (EW)	Kern	Balingen
Wasserbad (55, 65°C), Shake Temp, SW22	Julabo	Seelbach
Wasserbad (37°C) E1 medingen GmbH	Medingen GmbH	Medingen
Zentrifuge, Kühl (4°C), MR-23i	Jouan	Unterhaching
Zentrifuge, LightCycler Karussell	Roche	Mannheim
Zentrifuge, Tisch, 5415C	Eppendorf	Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmittel

Aluminiumfolie, Filmkassette, Glasplatten, Papiertücher, Pinzette, Plastikfolie, Schere, Skalpell

Produkt	Firma	Ort
Destilliertes Wasser	Delta Select GmbH	Pfullingen
EDTA-Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht
Film, X-omat Blue Film	Kodak	Stuttgart
Filterpapier 3MM; Whatman	Whatman	Dassel
Hybridisierungsröhren	Biometra	Göttingen
Kapillaren, LightCycler	Roche	Mannheim
Kühlblock, LightCycler	Roche	Mannheim
Nylonmembran (Filter)	Roche	Mannheim
PCR-Spitzen 10/20/200/1000 µl	Nerbe Plus GmbH	Winsen/Luhe
PCR-Gefäße	Eppendorf	Hamburg
Pipetten (5/10/25ml), Falcon	Becton Dickinson	Heidelberg
Sterilfilter (0,45µm), Millex-HA	Millipore	Bedford, U
Zentrifugenröhrchen (15/50ml)	Greiner	Frickenhäuser
Zellkulturflaschen (75cm ²)	Becton Dickinson	Heidelberg

2.1.3 Chemikalien

Produkt	Firma	Ort
Agarose, SeaKem LE	Cambrex	Oldendorf
Borsäure, PlusOne	Amersham Biosciences	Freiburg
Blockierungs-Lösung	Roche	Mannheim
Chloroform	Merck	Darmstadt
EDTA, PlusOne	Amersham Biosciences	Freiburg
Ethanol; 95%, 70%	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid (1:10.000)	Merck	Darmstadt
Formaldehyd	Merck	Darmstadt
Formamid	Merck	Darmstadt
Glycerol	Merck	Darmstadt
Harnstoff	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Isopropanol	Merck	Darmstadt
MOPS	Roth	Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth	Karlsruhe
Tris	Sigma Aldrich	Taufkirchen
Trizol [®]	Merck	Darmstadt
Trypsin	Sigma Aldrich	Taufkirchen

2.1.4 Enzyme

Produkt	Firma	Ort
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase	Roche	Mannheim
HotStart-Taq-Polymerase	Qiagen	Hilden
Proteinase-K	Roche	Mannheim
Restriktionsenzym-EcoRI	Roche	Mannheim
Reverse-Transcriptase, SuperScript-II	Invitrogen	Karlsruhe
RNase-freies-DNase-I	Roche	Mannheim
RNase-Inhibitor, RNase-Out	Invitrogen	Karlsruhe
Taq-Polymerase	Amersham Biosciences	Freiburg

2.1.5 Antikörper und Sonden

Anti-Digoxigenin-AP	Roche Diagnostics	Mannheim
<i>cMYC</i> -spezifische DNA-Sonde	ECO-RI Verdau	~12700bp
<i>FraX</i> -spezifische-DNA-Sonde, DX480	ECO-RI Verdau	~5000 bp

2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen in destilliertem- (H_2O_d) oder RNasefreiem (DEPC) Wasser angesetzt, je nach Anwendung autoklaviert und bei RT 4 °C oder -20°C gelagert.

2.1.6.1 Medien (Zellkulturen)

DMEM	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
RPMI	Sigma-Aldrich	Taufkirchen

2.1.6.2 Puffer und Lösungen

Isolierung von Nukleinsäuren

Ery-Lysis-Puffer (1x):

155 mM NH_4Cl

10 mM $KHCO_3$

0,1 mM EDTA

SE-Puffer (1x): (PH 8,0)

75 mM $NaCl_2$

25 mM EDTA

TE-Puffer (1x): (PH 7,6)

10 mM TrisHCl

1 mM EDTA

Trypsin-EDTA-Lösng:

0,5 M Trypsin

0,2 M EDTA

PBS-Puffer (1x):

3 mM KCl

140 mM NaCl

8 mM Na₂HPO₄·2H₂O1,5 mM KH₂PO₄**SDS (10 %):** 1 ml**NaCl (6 M):** 4 ml**DNA-Agarosegel-Elektrophorese****TAE-Lauf-Puffer (1x):** (PH 8,0)

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA

Ethidiumbromid-Lösung:

5 µl Ethidiumbromid (1 µg/ml);

50 ml TAE-Puffer (1x);

GelStar®-Lösung (Biozym)

(10.000x konzentriert, in DMSO gelöst)

TBE-Lauf-Puffer (1x): (PH 8,0)

90 mM Tris-Borat;

2 mM EDTA

Proben-Lade-Puffer (6x):

0,2 % (w/v) Bromphenolblau

0,2 % (w/v) Xylencyanol

60 % (v/v) Glycerin

60 mM EDTA

RNA-Agarosegel-Elektrophorese**FA-Gel (1,2 %):**

0,6 g Agarose

5 ml FA-Gelpuffer (10x)

auf 50 ml mit RNasefreiem H₂O_d auffüllen**Gel-Laufpuffer (1x):**

100 ml FA-Gelpuffer (10x)

20 ml 37 % Formaldehyd (12,3 M)

880 ml RNase freies Wasser

FA-Gel-Puffer (10x):

200 mM MOPS

50 mM NaAcetat

10 mM EDTA

(PH 7,0 mit NaOH)

RNA-Ladepuffer (5x):

16 µl gesättigte Bromphenolblau Lsg.

80 µl 500 mM EDTA (PH 8,0)

720 µl 37% Formaldehyd (12,3 M)

2 µl 100% Glycerol

3084 µl Formamid

4 ml FA-Gelpuffer (10x) auf 10 ml mit H₂O_d

Dot-Blot**Denaturierungslösung :**

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

TN-Puffer: (PH 7,6)

0,1 M Tris-Base
0,15 M NaCl

Dot-Puffer:

0,1 M Tris-Base
0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂

SSC (6x)

Blockierungslösung (1 %)

Neutralisierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl (PH 7,2)
1 mM EDTA (PH 8,0)

Färbelösung :

5,7 ml Dot-Puffer + 33 µl NBT mischen + 25 µl BCIP und auf die Membran geben 30 min-3 h im Dunkeln inkubieren
In 70 % EtOH spülen

SSC (20x):

3 M NaCl
0,3 M Tri-Natriumcitrat (PH 7,0)

Southernblot**TAE (1x):** (PH 8,0)

40 mM Tris
5 mM NaAcetat
1 mM EDTA

TBE (10x): (PH 8,0)

1 M Tris
0,83 M Borsäure
10 mM EDTA

Proben-Lade-Puffer (1x):

70 % (v/v) Glycerin
40 mM EDTA
Bromphenolblau / Xylencyanol

Hybridisierungs-Stamm-Lsg: (PH 7,2)

0,5M Na₂HPO₄·2H₂O
PH mit Orthophosphorsäure einstellen
auf 200ml H₂O_d auffüllen
9ml und 10ml Portionen wegfrieren (-20°C)

Southern-I-Lösung:

0,5 M NaOH
1 M NaCl

Southern-II-Lösung: (PH 7,0)

1 M Tris
1 M NaCl

Transfer-Puffer: (PH 7,0)

SSC (20x)
3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat

Maleinsäurepuffer (10x): (PH 7,5)

1M Maleinsäure
1,5M NaCl
PH mit NaOH Plätzchen einstellen
auf 500ml H₂O_d auffüllen

SDS (20%): bei 60°C lösen

Hybridisierungsmix:

9ml Stammlösung (-20°C)
 1ml Blockierungs-Reagenz (-20°C)
 0,3g SDS (bei 58°C im Hybr.Ofen lösen)

Waschlösung-I: (PH 7,2)

10 ml 0,5 M Na₂HPO₄·2H₂O
 2,5 ml 20% SDS
 auf 500ml H₂O_d auffüllen
 (Lösung frisch ansetzen)
 aliquotieren 50ml kalte, 50ml warme Lsg.

Antikörper-Lösung.:

20ml Blockierungs-Reagenz
 2µl Anti-Dig-AP

CDP-Star-ready-to-use Lösung:

Tropfenweise

Stripping-Lösung:

0,2 M NaOH
 0,1 % SDS
 auf 200 ml H₂O_d auffüllen

Fixierer (2L):

1400 ml H₂O_d
 500 ml Lsg.A und 100 ml Lsg.B

Blockierungslösung (1x):

5g Blockierungs-Reagenz auf
 50ml Maleinsäure (10x)
 in der Mikrowelle lösen und autoklavieren
 in 1ml Portionen wegfrieren

Waschlösung-II:

100 ml Maleinsäure (1x), 3 ml Tween
 auf 1 Liter H₂O_d auffüllen
 (Lösung frisch ansetzen)

Detektionspuffer: (PH 9,5)

5,8 g NaCl
 12,1 g Tris
 Auf 1 L H₂O_d auffüllen
 PH mit 25 % HCl einstellen

Depurinierungs-Lösung:

0,25M HCl

Entwickler (2L):

1452 ml H₂O_d
 500 ml Lsg.A
 24 ml Lsg.B
 24 ml Lsg.C
 (Lösungen vermischen und dunkel stellen)

2.1.7 Kits

Produkt	Firma	Ort
<i>Blood-and-Cell-Culture-Midi-Kit</i>	Qiagen	Hilden
<i>CDP-Star-ready-to-use-Kit</i>	Roche	Mannheim
<i>HotStart-Taq-Polymerase-Kit</i>	Qiagen	Hilden
<i>LC-FastStart-DNA-Master-SYBR-Green-I</i>	Roche	Mannheim
<i>PCR-DIG-Probe-Synthesis-Kit</i>	Roche	Mannheim
<i>RNeasy-Mini-Kit</i>	Qiagen	Hilden
<i>StrataPrep-Total-RNA-Miniprep-Kit</i>	Stratagene	Austin/Texas
<i>SuperScript-II-Reverse-Transkriptase-Kit</i>	Invitrogen	Karlsruhe
<i>QIAquick-PCR-Purification-Kit</i>	Qiagen	Hilden
<i>QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Kit</i>	Qiagen	Hilden

2.1.8 Sequenzen

2.1.8.1 Größenstandards

Produkt	Firma	Ort
Peq-Gold 50 bp DNA-Leiter 0.05 – 1.03 kbp	PeqLab	Erlangen
Peq-Gold 100 bp DNA-Leiter 0.10 – 3 kbp	PeqLab	Erlangen
Peq-Gold DNA-Sizer-III 0,12 – 21.2 kbp	PeqLab	Erlangen
RNA-Leiter 0.24 – 9.4 kbp	Invitrogen	Karlsruhe
DNA-Molecular-Weight-Marker-VII 0,081 – 8,5 kbp	Roche	Mannheim

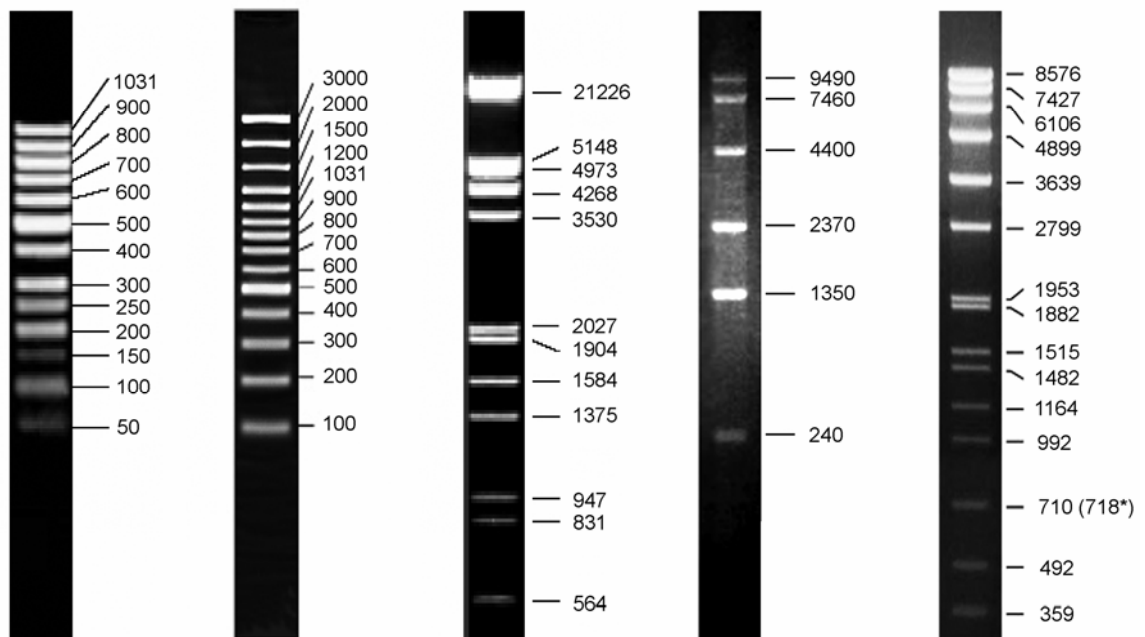


Abb. 6: Größenstandards (bp)

2.1.8.2 Oligonukleotidprimer zur Untersuchung der Gen-Amplifikation

Real-time PCR-Primer zur Untersuchung der Gen-Amplifikation

Gen Name	Primer	Sequenz 5'→3'	Größe (bp)	Tm (°C)	Produkt (bp)
Glycerinaldehyd phosphat-Dehydrogenase	<i>GAPDH</i> F	AACGTGTCAGTGGTGGACCTG	21	59	160
	<i>GAPDH</i> R	AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT	21		
Topoisomerase-II-Isoenzym-Beta	<i>TOP2B</i> F	CAACTTTTTGCTGGCATCTG	20	60	147
	<i>TOP2B</i> R	GCTGGAATGTCTGGAAAAGC	20		
Homeo-Box Transkriptionsfaktor	<i>NKX3.1</i> F	CTCCCTCTGGCTCTGGCTCTG	21	68	260
	<i>NKX3.1</i> R	CGGGAGGCGGAAAGTGAAAGC	21		
Oncogen MYC	<i>MYC</i> F	GGAGGAACAAGAAGATGAGG	20	59	315
	<i>MYC</i> R	GTTCGCCTCTTGACATTCTC	20		
Androgen-Rezeptor	<i>AR</i> F	CGGAAGCTGAAGAACTTGG	20	58	155
	<i>AR</i> R	ATGGCTTCCAGGACATTCAG	20		
Interleukin 12A	<i>IL12A</i> F	CCACAAAAATCCTCCCTTGA	20	59	145
	<i>IL12A</i> R	GGAGGGACCTCGCTTTTTAG	20		
Myelodysplastisches Syndrom-1	<i>MDS1</i> F	ACTCAGCAGGAATGGGGATA	20	59	153
	<i>MDS1</i> R	TGCCAGATGCAGATGGAGTA	20		
human Telomerase RNA-Komponente	<i>hTERC</i> F	AAGCGAACTGCATGTGTGAG	20	57	160
	<i>hTERC</i> R	AAGAGTTGGGCTCTGTCAGC	20		
Sterile-Alpha-Motiv-Domäne-7	<i>SAMD7</i> F	AGTGGTTTTCTTGGGCTGTA	20	57	151
	<i>SAMD7</i> R	GGACACTGGAGCCATAGAGG	20		
Translokations-Protein 1	<i>TLOC1</i> F	TCCCTTCTGAGGCAGTGTTT	20	57	156
	<i>TLOC1</i> R	GGAGTCAATGAAGCCCACAT	20		
SKIL (SKI-Like)	<i>SKIL</i> F	TTTCTGCCTCTTCCATCACC	20	59	150
	<i>SKIL</i> R	GACTTGGGGCAAACAGAGTC	20		
Solute-Carrier-Family-2-Member-2	<i>SLC2A2</i> F	CAATGAACCCAAAACCAACC	20	58	154
	<i>SLC2A2</i> R	CTTCCAAGTGTGTCCCAAG	20		
Phosphoinositid-3-Kinase-Catalytisches-Alpha-Polypeptid	<i>PIK3CA</i> F	ATGATGCTTGGCTCTGGAAT	20	58	155
	<i>PIK3CA</i> R	ATTTTTGTTGTCCAGCCACC	20		
SRY (geschlechtsbestimmende Region)-box-2	<i>SOX2</i> F	CGGAAAACCAAGACGCTCAT	20	60	153
	<i>SOX2</i> R	GTTCATGTGCGCGTAACTGT	20		

2.1.8.3 Oligonukleotidprimer zur Untersuchung der Gen-Expression

Real-time PCR-Primer zur Untersuchung der Gen-Expression

Gen Name	Primer	Sequenz 5' → 3'	Größe (bp)	T _m (°C)	Produkt (bp)
Beta2 Microglobulin	<i>B2M</i> F	GATGAGTATGCCTGCCGTGTG	21	60	113
	<i>B2M</i> R	CAATCCAAATGCGGCATCT	19		
Humane Telomerase RNA-Komponente	<i>hTERC</i> F	CTCCACCGTTCATTCTAGAGCAA	24	60	175
	<i>hTERC</i> R	GCTGACAGAGCCCAACTCTT	20		
Sterile-Alpha-Motiv-Domäne-7	<i>SAMD7</i> F	ACAGCTTCATTCGCAGCCTT	20	60	179
	<i>SAMD7</i> R	ACATACTTCCCACATGCTGAGATAACC	26		
Translokations-Protein-1	<i>TLOC1</i> F	GGCCAGCAGAAATGAGAGTAGG	22	60	138
	<i>TLOC1</i> R	AAGTGGTGCCTTCCTCCAGTT	21		
Solute-Carrier-Family-2-Member-2	<i>SLC2A2</i> F	GACCACGTCTGCTGCTT	18	60	152
	<i>SLC2A2</i> R	ATGTGAACAGGGTAAAGGCC	20		
Phosphoinositid-3-KinaseCatalytisches-Alpha-Polypeptid	<i>PIK3CA</i> F	ATGCAGCCATTGACCTGTTTATA	23	60	186
	<i>PIK3CA</i> R	GGCACACGTTCTCGTTTATAACC	23		

ALU-Primer zur Überprüfung einer DNA-Kontamination nach Reverser-Transkription

Primer	Sequenz 5' - 3'	Größe (bp)	T _m (°C)	Produkt (bp)
<i>ALU</i>	TCATGTGCGACGCGAGACTCCATCTCAA	26	55	unspez.

GAPDH-Primer zur Abschätzung der Menge der umgeschriebenen cDNA

Primer	Sequenz 5' - 3'	Größe (bp)	T _m (°C)	Produkt (bp)
<i>GAPDH</i> F	GGAAGGTGAAGGTCGGAGT	19	58	650
<i>GAPDH</i> R	ATCACGCCACAGTTTCCC	18		

MYC- und *FraX*-Primer zur Herstellung der DNA-Sonden für den Southern-Blot

Primer	Sequenz 5' - 3'	Größe (bp)	T _m (°C)	Produkt (bp)
<i>MYC</i> F	GGAAAACGGGAATGGTTTTT	20	55	494
<i>MYC</i> R	GATTCCAGGAGAATCGGACA	20		
<i>FraX</i> 480 F	AACTACCCACACGACAGGCCCG	22	64	480
<i>FraX</i> 602 R	GCTAGCAGGGCTGAAGAGAAGATG	24		

2.1.9 Software

LightCycler-Relative-Quantification 1.01	Roche	Mannheim
LightCycler-Software 3.5	Roche	Mannheim
MD-Image-Quant-Software Version 3.3	Roche	Mannheim
SPSS Statistik-Software Version 10.0	SPSS Inc.	Chicago, USA

2.1.10 Datenbanken/Algorithmen/Software

ATCC (American Type Culture Collection)

<http://www.lgcpromochem-atcc.com>

Blastn (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

<http://www.dsmz.de>

Ensembl Genome Browser

<http://www.ensembl.org>

NCBI (National Center for Biotechnology Information)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

NCBI Map Viewer / Homo sapiens Build 35.1

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>

OMIM™ (Online Mendelian Inheritance in Man™)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

PFAM (Protein Families Database of Alignments)

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam>

Primer3 - Primerdesign - Software

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

The Entrez Nucleotides Database

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>

The GDB Human Genome Database

<http://gdbwww.gdb.org>

2.1.11 Zelllinien

Bei den in der Tabelle 3 aufgeführten permanenten Zelllinien handelt es sich um die Prostatakarzinomzelllinien PC3, DU145 und LNCaP und den Subtypen PC3-N und PC3-N-125-1L, sowie um die benigne Prostatahyperplasiezelllinie BPH1 und die Colonkarzinomzelllinie COLO320DM, die von den Zellkulturdatenbanken ATCC und DSMZ (Kapitel 2.1.10) käuflich erworben wurden. Die Zelllinie DU145MN1 wurde von der urologischen Universitätsklinik Essen durch Dr. A. Bex zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Name und Beschreibung der verwendeten Zelllinien.

Name	Beschreibung
BPH1	BPH1 ist eine androgenabhängige menschliche Zelllinie, die aus benigne Prostata-Epithelzellen eines 68-Jahre alten Mannes etabliert wurde (ACC Nr. 143).
PC3-N PC3-125-1L	PC3-N und PC3-125-1L sind Sublinien der PC3-Zelllinie und wurden nach orthoper bzw. subkutaner Implantation auf die Nacktmaus aus Lymphknotenmetastasen bzw. Lungenmetastasen generiert. Ihre zytologische Charakterisierung erfolgte in unserer Arbeitsgruppe durch Frau Dr. Ramona Lensch (Lensch et al. 2002).
DU145	DU145 ist eine androgenunabhängige permanente Zelllinie, die von Stone et al. (1978) aus der Hirnmetastase eines menschlichen Prostatakarzinoms etabliert wurde (ATCC Nr. HTB-81).
DU145MN1	DU145MN1 ist ebenfalls androgenunabhängig und geht aus der Zelllinie DU145 hervor. Es handelt sich hierbei um eine Xenograft-Zelllinie, die nach orthotoper Implantation von DU145 Zellen in Prostaten der Nacktmaus aus einer Lymphknotenmetastase etabliert wurde. Sie besitzt ein deutlich gesteigertes Metastasierungsverhalten gegenüber der parentalen Zelllinie (Bex et al. 2001).
LNCaP	LNCaP ist eine androgenabhängige menschliche Prostatakarzinomzelllinie, die 1977 von Horoszewicz et. al. (1983) aus einer Lymphknotenmetastase eines 50 Jahre alten Mannes isoliert und etabliert wurde (ATCC Nr. CRL-1740).
PC3	PC3 ist eine androgenunabhängige menschliche Prostatakarzinomzelllinie, die 1978 aus einer Knochenmetastase eines Grad-IV-Prostatakarzinoms eines 62 Jahre alten Mannes etabliert wurde (Kaighn et al. 1979) und histologisch einem undifferenzierten Adenokarzinom entspricht (ATCC Nr. CRL-1435).
Colo320DM	COLO320DM ist eine menschliche Colonkarzinomzelllinie, die aus dem Colonkarzinom einer 55 Jahre alten Frau etabliert wurde (ATCC Nr. CCL-220). Dabei handelt es sich um eine hyperdiploide Zelllinie, die in 24% der untersuchten Methaphasen double minutes (<i>dmin</i>) nachweist (Quinn et. al. 1979).

2.1.12 Gewebeproben

Zur Bestimmung der Genkopienzahl der Gene *NKX3.1* und *MYC* auf Chromosom 8 wurden 63 native Prostatakarzinome, 8 Blutproben, 5 Prostatakarzinomzelllinien und eine Colonkarzinomzelllinie verwendet. Untersuchungen zur Bestimmung der Genkopienzahl der Gene innerhalb der Amplifikationseinheit auf Chromosom 3q25-q26 wurden an 22 der 63 Prostatakarzinomproben durchgeführt. Untersuchungen der Genexpression wurden an jeweils 13 von 22 Prostatakarzinomproben, 4 Normalproben und 6 BPH-Proben durchgeführt.

2.1.12.1 Normalgewebe

Bei den Normalgeweben handelt es sich um Prostata-, Milz- und Nierengewebe, sowie um eine Zahnfleischfibroblastenkultur. Das Gewebematerial stammt von an Herzinfarkt verstorbenen Einzelpersonen ab und wurde freundlicherweise von der Abteilung für Humangenetik des Universitätsklinikums des Saarlandes Herrn Dipl. Biol. Jens Radermacher zur Verfügung gestellt (Milz, Niere) oder käuflich erworben (Prostata). Die Zahnfleischfibroblastenkultur wurde aus Zahnfleischgewebe eines gesunden Patienten in unserem Labor gezüchtet. Bei den BPH-Proben handelt es sich um ein gutartig verändertes Gewebe der Prostata, das im Rahmen einer Tumor-Vorsorgeuntersuchung unter Standardbedingungen entnommen und aufgrund histologischer Untersuchung als normal befundet wurde.

2.1.12.2 Tumorgewebe

Bei den insgesamt 63 untersuchten Prostatakarzinomen handelt es sich um primäre Prostata-Adenokarzinome unterschiedlichen Tumorstadiums und Malignitätsgrad, die außer einem T4-Tumor durch eine radikale Prostatektomie von unbehandelten Tumorpatienten gewonnen, makroskopisch und histologisch durch einen speziell qualifizierten Pathologen untersucht, schockgefroren und bis zur DNA- und RNA-Isolierung gelagert wurde. Sie bilden eine Untergruppe einer bereits beschriebenen Serie, die nach den Kriterien der Verwertbarkeit großer Mengen an DNA und einem komplett standardisierten Follow-up gesammelt wurden (Florl et al. 2004). Entsprechend der TNM-Klassifikation 1997 wurden 22 Tumorproben als pT2, 38 Tumorproben als pT3 und 3 Tumorproben als pT4 eingestuft. Entsprechend der Gleasonsumme wurden 17 Tumore <7, 27 Tumorproben mit 7 und 19 Tumorproben >7 eingeordnet (Tab. 4).

Tabelle 4: Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Prostatakarzinomproben

Nr.	Proben	Alter	Tumor Stadium	Gleason 1	Gleason 2	Gleason Summe
1	P8	66	cT4	5	5	10
2	P10	68	3c	3	4	7
3	P14	74	2c	3	4	7
4	P26	71	3b	4	3	7
5	P28	68	3a	4	3	7
6	P36	73	3c	4	3	7
7	P42	74	3c	5	3	8
8	P43	58	3a	4	3	7
9	P44	57	2c	3	4	7
10	P47	53	3c	3	4	7
11	P49	62	3a	4	3	7
12	P51	59	2c	3	4	7
13	P52	56	3c	5	4	9
14	P65	62	3b	4	3	7
15	P74	53	3a	3	2	5
16	P80	66	3a	3	5	8
17	P85	68	3a	2	3	5
18	P87	62	3a	3	5	8
19	P91	61	3b	4	5	9
20	P97	72	3a	3	4	7
21	P99	68	2b	3	2	5
22	P107	59	3a	3	4	7
23	P109	66	3a	4	5	9
24	P117	68	3b	3	2	5
25	P119	62	3b	4	5	9
26	P123	57	2a	2	3	5
27	P133	72	2b	4	3	7
28	P135	65	2a	2	3	5
29	P137	73	2b	3	5	8
30	P139	65	3b	4	5	9
31	P141	68	2b	3	1	4
32	P143	66	3b	3	5	8
33	P145	71	4	4	3	7
34	P147	70	2b	3	2	5
35	P153	75	3a	3	2	5
36	P155	55	3a	2	3	5
37	P161	63	2b	3	2	5
38	P163	66	3a	3	2	5
39	P165	71	3a	4	3	7
40	P167	67	3a	4	5	9
41	P169	72	3a	3	4	7
42	P171	61	2b	3	2	5
43	P173	63	2b	3	4	7
44	P175	73	2b	5	3	8
45	P177	68	3c	5	4	9
46	P183	67	3a	4	2	6
47	P185	56	2b	3	2	5
48	P193	68	2b	3	5	8
49	P197	63	3b	5	3	8
50	P201	66	3a	4	4	8
51	P203	73	2a	3	4	7
52	P205	73	3a	4	3	7
53	P209	71	3a	4	3	7
54	P211	67	3b	5	4	9
55	P213	60	2a	4	3	7
56	P219	64	4	4	3	7
57	P223	72	2b	3	4	7
58	P225	62	3b	3	3	6
59	P230	67	2a	3	4	7
60	P236	74	3a	3	4	7
61	P238	61	2a	3	3	6
62	P243	46	2a	5	3	8
63	P247	55	3c	4	3	7

Die Prostatakarzinomproben wurden freundlicherweise von der Abteilung für Urologie der Universitätsklinik der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schulz und Herrn Dr. Mirko Müller zur Verfügung gestellt. Die jeweiligen Gewebeproben wurden nach standardisierten Methoden entnommen und durch den Pathologen des Institutes für Pathologie der Universitätsklinik in Düsseldorf Herrn Priv. Doz. Dr. Rainer Engers histologisch begutachtet und entsprechend klassifiziert.

2.1.12.3 Blutproben

Blutproben von 8 gesunden männlichen Probanden, die sich für die Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben wurden als Referenzgewebe zu den Tumorgeweben und zur Erstellung von Grenzwerten (*cutoff*) der untersuchten Gene verwendet.

2.1.13 Transport und Lagerung von Gewebeproben

Nach Transport des Operationspräparates in das pathologische Institut, erfolgte die Entnahme der Gewebeproben aus makroskopisch tumorverdächtigen Arealen durch den Pathologen. Die Gewebeproben wurden in steriler Aluminiumfolie verpackt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert. DNA- und RNA-Isolierung wurde anschließend entsprechend den Methoden (Kapitel 2.2.2) durchgeführt. Die Anfertigung eines histologischen Schnittpräparates wurde für jede Gewebeprobe durchgeführt und diente als zusätzliche histologische Kontrolle für den Pathologen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Zellen permanenter Zelllinien und Zellkulturen wurden in Zellkulturflaschen als Monolayerkulturen kultiviert und regelmäßig auf eventuelle Kontaminationen durch Mykoplasmen getestet. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen in einem 37°C Brutschrank mit 5% CO₂-Sättigung. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Abhängig vom Zelltyp wurden die Zellen mit DMEM-Medium (Dubelcos MEM) bzw. RPMI-Medium unter Zusatz von jeweils 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und nicht essentielle Aminosäuren mit 10% FCS kultiviert. PC3-Zellen (PC3, PC3-N, PC3-125-1L), DU145-Zellen (DU145, DU145MN1) und Zahnfleischfibroblasten wurden in phenolrothaltigem DMEM-Medium mit 2 mM L-Glutamin, 1,5 g/L Natriumbicarbonat und 1 mM Natriumpyruvat, LNCaP-Zellen, BPH1-Zellen und COLO320DM-Zellen in phenolrotfreiem RPMI-Medium mit 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat kultiviert.

2.2.1.2 Passagierung, Subkultivierung und Zählung von Zellen

Die Passagierung und Subkultivierung der Zellen erfolgte abhängig von deren Metabolismus und Wachstumsaktivität 2-3-mal wöchentlich nach Standardbedingungen. Dabei wurde die Vitalität und Morphologie der jeweiligen Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft und das verbrauchte Zellkulturmedium gewechselt.

Die Subkultivierungsratio von PC-3, DU145, BPH1 und LNCaP-Zellen betrug 1:3 bis 1:8 und von COLO320DM-Zellen 1:5 bis 1:10. Die Passagierung der Zellen erfolgte bei Erreichen eines konfluenten Monolayers durch Proteolyse nach Zugabe von Trypsin-EDTA (0,25% (w/v) Trypsin, 0,53 mM EDTA). Dabei wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst, in eine jeweils neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Überprüfung der Gesamtzellzahl wurde vor der Passagierung der Zellen mit der Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

2.2.1.3 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Das Einfrieren der Zellen wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Dabei wurden die im Zellkulturmedium aufgenommenen Zellen nach Zentrifugation bei 3000 Upm für 5 min pelletiert, mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt und in ein Kryogefäß überführt. Nachdem die Zellen ü.N. bei -80°C im Gefrierschrank eingefroren wurden, erfolgte die langfristige Lagerung der Zellen in flüssigen Stickstoff bei -150°C.

2.2.2 Nukleinsäurepräparation

2.2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus Zelllinien, Blut- und Gewebeproben wurde mit der konventionellen Hochsalz-Methode und dem *Blood-and-Cell-Culture-DNA-Midi-Kit* (Qiagen) durchgeführt.

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde entsprechend einer modifizierten Form der Guanidin-Iso-Thiocyanat-Methode mit TRIZOL[®] (Invitrogen) und dem *RNeasy-Mini-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Der DNase-Verdau erfolgte anschließend mit dem *Strataprep-Total-RNA-Miniprep-Kit* (Stratagene).

2.2.2.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung genomischer DNA aus Blutlymphozyten und Zelllinien wurde mit der konventionellen Hochsalz-Methode durchgeführt. Dabei wurde eine 6 M NaCl-Lösung benutzt um Zellbestandteile und Proteine zu fällen. Nach Zugabe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) konnte die DNA von Proteinen getrennt und mit Isopropanol gefällt werden.

Die Isolierung hochmolekularer genomischer DNA erfolgte aus allen Gewebetypen mit dem *Blood-and-Cell-Culture-DNA-Midi-Kit* (Qiagen) über Zentrifugiersälchen, die eine Silikamembran enthalten. Dabei bindet DNA unter Hochsalzbedingungen an die Membran und kann nach Zugabe eines Puffers eluiert werden. Die einzelnen Isolierungsschritte unterscheiden sich für die unterschiedlichen Gewebetypen lediglich bis zum Proteinase-K-Verdau.

2.2.2.3 DNA-Isolierung aus Blutlymphozyten

Die Isolierung der DNA aus Blutlymphozyten erfolgte aus 7-10 ml EDTA-Blut. Die Lyse der Erythrozyten im Blut erfolgte durch Zugabe des dreifachen Volumens des Ery-Lysis-Puffers (1x). Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis folgte für 10min eine Zentrifugation bei 4°C und 3000 Upm. Das entstandene Zellpellet wurde anschließend in 4,5 ml SE-Puffer (1x) resuspendiert und mit 0,5 ml SDS-Lösung (10%) versetzt, wobei Proteine gefällt wurden. Der anschließende Verdau der Proteine erfolgte ü.N. im 55°C Wasserbad nach Zugabe einer Spatelspitze Proteinase-K (Roche).

2.2.2.4 DNA-Isolierung aus Zelllinien

Zur Isolierung der DNA aus Zelllinien wurden zwei Zellkulturflaschen (75cm²) mit einer Gesamt-Zellzahl von 2×10^7 Zellen benötigt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach dem Abheben des Mediums durch Zugabe von 8-10 ml Trypsin/Zellkulturflasche direkt auf den Zellrasen und Inkubation der Zellen für 10 min im 37°C Brutschrank. Nach dem Ablösen der Zellen vom Untergrund wurden die Zellen gepoolt, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 4°C und 3000 Upm abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 4 ml PBS (1x) gewaschen, erneut zentrifugiert und in 4 ml SE-Puffer (1x) resuspendiert. Durch Zugabe von 9 ml SE-Puffer (1x) und 1 ml SDS (10%) wurden die Proteine gefällt und ü.N. im 55°C Wasserbad nach Zugabe einer Spatelspitze Proteinase-K (Roche) verdaut.

2.2.2.5 DNA-Isolierung nach der Hochsalz-Methode

Die folgenden Schritte der DNA-Isolierung erfolgten für alle Gewebetypen gleich. Nach dem Proteinase-K-Verdau wurden 4ml NaCl (6M) auf Eis zugegeben und vorsichtig gemischt, bis eine homogene Lösung entsteht.

Die Zugabe von 15 ml PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1), das mischen der Flüssigkeit 1 h im Überkopfröhrer, sowie die anschließende Zentrifugation für 20 min bei 4°C und 3000 Upm ermöglicht die Trennung der Proteine von den Nukleinsäuren in drei Phasen, wobei sich die DNA in der obersten, die Proteine in der mittleren und die restlichen Bestandteile der Zelle in der untersten Phase befinden. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase abgehoben und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol (-20°C) und vorsichtigem mischen der Flüssigkeit wurde die genomische DNA gefällt und als Faden sichtbar. Die DNA wurde

mit einer Glaspipette in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und in 1 ml 70%igem Ethanol (-20°C) durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 3000 Upm gewaschen. Nach entfernen des Ethanols wurde das Pellet je nach Größe zwischen 3-5 min in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet, in 50-100 µl TE-Puffer (1x) aufgenommen und ü.N. bei 4°C im Kühlschrank gelöst und gelagert. Eine langfristige Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank. Nach der Isolierung erfolgte die Konzentrationsbestimmung der DNA im Photometer (Kapitel 2.2.2.12).

2.2.2.6 DNA-Isolierung mit dem *Blood-and-Cell-Culture-Midi-Kit*

Für quantitative Untersuchungen wurde die Isolierung der DNA aus Blut, Geweben und Zelllinien mit dem *Blood-and-Cell-Culture-Midi-Kit* (Qiagen) in zwei wesentliche Schritte durchgeführt, wobei das Ausgangsmaterial zuerst enzymatisch verdaut und anschließend über eine Säule aufgetrennt wurde. Dabei wurden entweder 5 ml EDTA-Blut, 30 mg Gewebe (Tumor/Normal) oder 2×10^7 Zellen einer Zellkultur benötigt. Die Isolierung der DNA erfolgte standardgemäß entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.2.7 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde entsprechend einer modifizierten Form der Guanidin-Iso-Thiocyanat-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987) mit TRIZOL[®] (Invitrogen) und dem *RNA-Miniprep-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Alle Schritte der RNA-Isolierung, ausgenommen der Gewebeentnahme und Homogenisierung, wurden aus Kontaminationsgründen und zum Schutz vor RNasen unter einer Werkbank bei 4°C auf Eis durchgeführt. Nutzgegenstände wie Pinzetten, Scheren sowie Aluminiumfolie wurden für 3 h bei 225°C sterilisiert und verwendete Lösungen mit DEPC behandelt.

2.2.2.8 RNA-Isolierung nach der Trizol[®]-Methode

Die Isolierung der RNA mit Trizol[®] beruht auf eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Iso-Thiocyanat, die Zellen direkt lysiert und RNA stabilisiert. Die Isolierung aus Gewebematerial unterscheidet sich von der Isolierung aus Zellkultur dadurch, dass Gewebe vor dem eigentlichen Isolierungsschritt homogenisiert werden musste.

2.2.2.8.1 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien wurden zwei Zellkulturflaschen (75cm²) mit einer Gesamt-Zellzahl von 2×10^7 Zellen benötigt. Vor der Isolierung wurden die Zellkulturflaschen dem 37°C Brutschrank entnommen und die Zellen unter einem Umkehrmikroskop (Olympus) auf Wachstum, Beschaffenheit und möglicher Kontamination mit Mycoplasmen untersucht. Anschließend wurden die dichtbewachsene Zellen zur Isolierung der Gesamt-RNA verwendet.

Vor der Isolierung mussten die Zellen geerntet und lysiert werden. Dabei wurde das Zellkulturmedium abgehoben, verworfen und jeweils 7,5 ml Trizol/Zellkulturflasche direkt auf den Zellrasen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 10 min im 37°C Brutschrank inkubiert, das Trizol[®] mit den lysierten Zellen abgehoben, und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Nach Zugabe von 1500 µl Chloroform (200µl Chloroform/ml Trizol[®] und Zellkulturflasche) wurde das Gemisch für 15 sek kräftig geschüttelt, für 3 min bei RT stehen gelassen und zur Phasentrennung für 45 min mit 4000 Upm bei 4°C in der Kühlzentrifuge (Rotanta/RP, Hettlich) zentrifugiert. Die obere der drei entstandenen Phasen wurde abgehoben, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform überschichtet. Nachdem die Proben für 10 min auf dem Überkopprotator inkubiert und für 15 min mit 4000 Upm bei 4°C zentrifugiert wurden, konnte der Schritt mit gleichem Volumen reinem Chloroform wiederholt werden.

Die Fällung der RNA erfolgte nach Zugabe eines Volumens Isopropanol (-20°C) unter leichtem Schütteln und anschließender Lagerung für 5 min auf Eis. Die ausgefällte RNA konnte nach erneuter Zentrifugation für 45 min bei 4°C und 4000 Upm auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens als Pellet abzentrifugiert und der Überstand verworfen werden. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 1 ml 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das RNA-Pellet wurde je nach Größe zwischen 3-5 min in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet, in 50-100 µl Rnase freiem DEPC-Wasser aufgenommen und ü.N. bei -20°C im Gefrierschrank gelöst. Eine längerfristige Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C im Gefrierschrank. Nach der Isolierung erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA im Photometer (Kapitel 2.2.2.12).

2.2.2.8.2 RNA-Isolierung aus Geweben

Die RNA-Isolierung aus Geweben wurde zum Schutz vor Kontaminationen durch degradierende Enzyme wie RNasen an einem mit Ethanol gereinigten und steril abgedeckten Arbeitsplatz folgendermaßen durchgeführt.

Nachdem das zur RNA-Isolierung benötigte Gewebematerial dem -80°C Gefrierschrank entnommen und in flüssigen Stickstoff zum Arbeitsplatz gebracht wurde, konnte mit einer sterilen Pinzette und einem sterilen Skalpell ein ungefähr 30 mg schweres Stück dem Gewebematerial abgetrennt, in einer vorher austarierten sterilen Aluminiumfolie verpackt, auf einer Feinwaage abgewogen und in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das noch schockgefrorene, in Aluminiumfolie verpackte Gewebestück wurde anschließend mit einem Skalpell homogen zerkleinert, in ein mit 3 ml Trizol[®] gefülltes 15 ml Zentrifugenröhrchen (1 ml Trizol[®]/mg Gewebe) überführt und für ca. 30 sek gevortext.

Um die Effizienz des Gewebeaufschlusses durch das Trizol[®] zu erhöhen, wurden die Proben zusätzlich für 15 sek mit einem Homogenisator behandelt und anschließend für 10 min im 37°C Brutschrank inkubiert. Alle weiteren Isolierungsschritte zur Phasentrennung und Fällung wurden entsprechend den Bedingungen der RNA-Isolierung aus Zelllinien durchgeführt.

2.2.2.9 Strataprep-Total-RNA-Miniprep-Kit (Stratagene)

Die Aufreinigung der RNA wurde nach der Isolierung mit Trizol[®] mit dem *Strataprep-Total-RNA-Miniprep-Kit* (Stratagene) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden zum gelösten Pellet 1,75 μl β -Mercaptoethanol, 250 μl Lysis-Puffer und 250 μl 70%iges Ethanol (-20°C) gegeben.

Nach Mischen und Überführen des Ansatzes wurde die RNA durch Zentrifugation bei 13000 U/min in einer Tischzentrifuge für 1 min an die RNA-bindende Säule gebunden und das Filtrat verworfen. Anschließend wurde nach den Wasch-Schritten mit jeweils 600 μl High-Salt Buffer und Low-Salt Buffer und Zentrifugation bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge für 1-2 min die RNA von DNA- und Protein-Resten gereinigt und nach wiederholter Zentrifugation für 1 min in ein 1,5 ml PCR-Gefäß mit 50 μl RNase-freiem Wasser aufgenommen, die Konzentration im Photometer bestimmt und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.2.10 RNA-Isolierung mit dem *RNeasy-Mini-Kit* (Qiagen)

Für quantitative Untersuchungen wurde die Isolierung der Total-RNA aus allen Gewebetypen mit dem *RNeasy-Mini-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Dabei sorgt die Gegenwart eines Salzes für die spezifische Bindung der RNA an die Silicamembran. Nach dem Gewebeaufschluss mit Trizol[®] wurden alle weiteren Isolierungsschritte entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die Membran nach Bindung der RNA mit unterschiedlichen Pufferlösungen behandelt und durch mehrfache Zentrifugationsschritte von der Säule eluiert, in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen, die Konzentration im Photometer bestimmt und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert wurde.

2.2.2.11 Enzymatischer Verdau der Nukleinsäure

Um eine DNA-Kontamination der RNA auszuschließen, wurde nach der RNA-Isolierung ein DNase-Verdau durchgeführt wobei DNA enzymatisch abgebaut wurde. Der DNase-Verdau wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem *Strataprep-Total-RNA-Miniprep-Kit* (Stratagene) direkt auf Säule (Kapitel 2.2.2.9) und unter Zugabe von 50 µl DNase Digestion-Buffer mit 5µl Rnase-freie DNase-I (45U) nach Inkubation für 15 min bei 37°C im Brutschrank durchgeführt.

Die Isolierung von Total-RNA mit dem *RNeasy-Mini-Kit* (Qiagen) erforderte laut Herstellerangaben keinen zusätzlichen DNase-Verdau. RNA-Proben, die nach elektrophoretischer Auftrennung im Gel dennoch DNA-Verunreinigungen aufzeigten, wurden nachträglich mit DNase-I (1U/µg RNA) für 30 min bei 37°C im Brutschrank behandelt. Die Inaktivierung der Enzymaktivität erfolgte anschließend bei 75°C für 5 min im Wasserbad (Huang et al. 1996).

2.2.2.12 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäure (DNA bzw. RNA) wurde spektralphotometrisch durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm im Photometer durchgeführt (Technical Note No. LC 11/2000, Roche). Dabei entspricht die Nukleinsäure bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer optischen Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml bei RNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde über den Quotienten E_{260}/E_{280} bestimmt, der sich aus der Extinktion der Nukleinsäure und Proteine ergibt und

einen Wert von 1,8–2,0 aufweist. Eine mögliche Protein-Kontamination (280 nm) lässt sich durch eine Verringerung des Quotienten, eine DNA-Kontamination (260 nm) durch eine Vergrößerung des Quotienten feststellen. Die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurde mit dem Photometer Ultrospec3000 (Amersham Biosciences) durchgeführt.

2.2.3 Gelelektrophorese

2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Nukleinsäure-Fragmenten (DNA oder RNA), die entsprechend ihrer Größe nach aufgetrennt und mit Fragmenten bekannter Größe (Längenmarker) verglichen werden können. Sie funktioniert wie ein molekulares Sieb, in der ein elektrisches Feld negativ geladene DNA-Fragmente zur positiv geladenen Elektrode (Anode) transportiert und in Abhängigkeit von ihrer Größe auftrennt. Das Laufverhalten ist von unterschiedlichen Faktoren wie zBsp. elektrische Feldstärke, Porengröße des Gels, Ionenstärke des Puffers, PH-Wert, Temperatur und Nettoladung des Moleküls abhängig.

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wurden in dieser Arbeit 1-2%ige Agarosegele unter Verwendung von Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) und Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE) verwendet. Der Nachweis der DNA-Proben erfolgte nach Betrachtung der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm in einer Gel-Dokumentationsanlage (Imago, B&L Systems). Die Agarosegele wurden fotografiert und zur Weiterverarbeitung auf einem Computer gespeichert (Abb. 7).

2.2.3.2 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben erfolgte jeweils in 1-2%ige Agarosegele unter Zugabe von 1/10 Ethidiumbromidlösung. Nach Vorbereitung wurden die DNA-Proben und ein Längenstandard (Marker) mit 1/5 Volumen Ladepuffer (6x) versetzt, in die Taschen des Agarosegels aufgetragen und in TAE-Puffer (1x) bzw. TBE-Puffer (1x) bei 90 V und 150-300 mA für 120-150 min aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnte hochmolekulare DNA (>21 kbp) nachgewiesen werden (Abb. 7A).

2.2.3.3 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Qualität der isolierten RNA wurde entsprechend den Bedingungen des *RNeasy-Mini-Kits* (Qiagen) mit einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel durchgeführt.

Dabei wurde durch Zugabe von MOPS und Formaldehyd die RNA denaturiert und die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert. Alle RNA Arbeiten wurden zum Schutz vor Kontamination durch RNAsen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Lösungen wurden autoklaviert oder mit DEPC-Wasser behandelt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben erfolgte jeweils in 1,2%ige Formaldehyd-Agarosegele unter Zugabe von 1/10 Ethidiumbromidlösung. Nach Vorbehandlung der RNA durch Inkubation für 5 min in einem 65°C Wasserbad und anschließendem Abschrecken auf Eis für 1 min, wurden die Proben sowie ein Längensstandard (RNA-Leiter, Invitrogen) mit 1/4 Volumen RNA-Ladepuffer (5x) versetzt, in die Taschen des Agarosegels aufgetragen und in Formaldehyd-Gel-Laufpuffer (1x) bei 70 V und 150 mA für 60 min aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA konnten zwei spezifische Bandenmuster nachgewiesen werden, die für die beiden Untereinheiten der ribosomalen RNA (18S rRNA und 28S rRNA) von Eukaryonten charakteristisch sind (Abb. 7B).

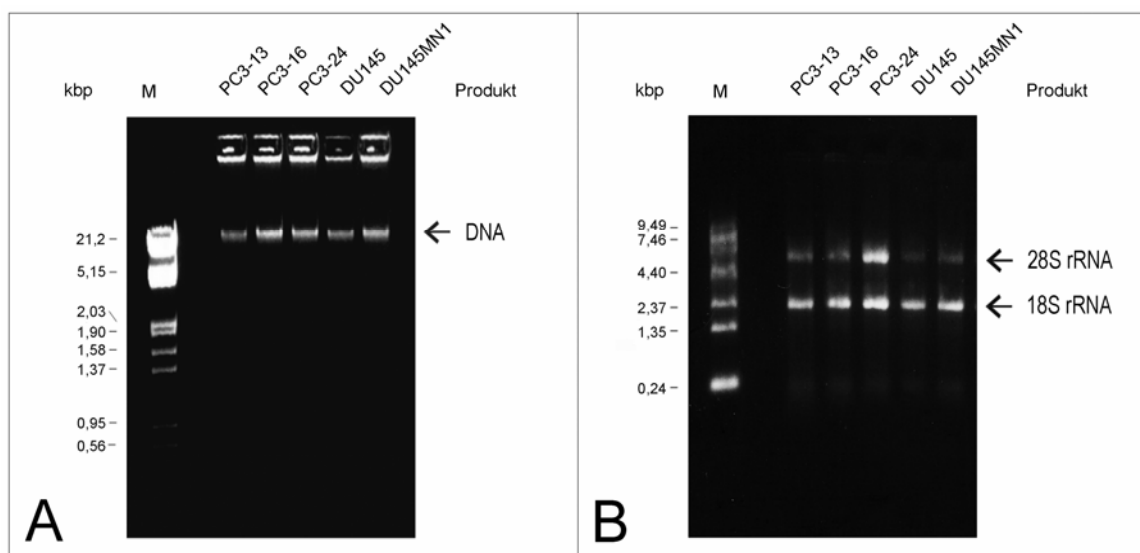


Abb. 7: Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der Qualität der isolierten DNA (A) und RNA (B) am Beispiel der Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145 und DU145MN1. Darstellung der hochmolekularen DNA-Banden (A) und der ribosomalen RNA-Banden 18S rRNA und 28S rRNA (B). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese im DNA-Agarosegel (2%) sowie im RNA-Formaldehyd-Agarosegel (1,2%). Zur Abschätzung der Größe und Menge der isolierten Nukleinsäure wurde für die DNA der Marker (Peq Gold DNA-Sizer III, Erlangen) und für die RNA der Marker (RNA-Leiter, 0,24-9,49 kbp, Invitrogen) verwendet.

2.2.4 Blottingverfahren und Hybridisierungen

2.2.4.1 Southern-Blot

Der Southern-Blot ist eine Methode zur Übertragung (Blotten) doppelsträngiger DNA auf eine Membran (Southern E.M. 1975). Die Southern-Blot-Analyse wurde zum Nachweis einer *MYC*-Amplifikation an den Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145 und DU145MN1 sowie der Colonkarzinomzelllinie COLO320DM durchgeführt.

Dabei wurde genomische DNA (10 µg) der jeweiligen Zelllinien isoliert, mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* enzymatisch gespalten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und entsprechend dem Southern-Blot-Verfahren auf eine Nylon-Membran (Roche) übertragen. Der Nachweis der gesuchten DNA-Fragmente erfolgte über Chemolumineszenz durch Detektion markierter komplementärer Gensonden mit dem Digoxigenin-System (Roche).

2.2.4.2 Herstellung und Markierung der *MYC*- und *FraX*-Gensonde

Als Gensonde zum Nachweis des *MYC*-Gens wurde ein 494 bp langes PCR-Produkt verwendet, welches mit dem *PCR-DIG-Probe-Synthese-Kit* (Roche) aus DNA der Prostatakarzinomzelllinie PC3-16 mit Hilfe der PCR amplifiziert und unter Verwendung von Digoxigenin-dUTP-Nukleotiden markiert wurde.

Zur Herstellung und Markierung der *MYC*-Sonde wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz 100 ng DNA, PCR-Puffer (1x), Primer _{Fwd/Rev} (je 0,5 µM), PCR-DIG-Labeling-Mix (1x), Enzym-Mix (1,95 U) eingesetzt und den Rest mit H₂O_d entsprechend aufgefüllt. Die PCR-Bedingungen zur Durchführung einer PCR-Reaktion wurden in der Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: PCR-Bedingungen zur Durchführung der DIG-Markierung

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min/sek)	Zyklen
Enzym Aktivierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	1 min	
Anlagerung	55	30 sek	30
Amplifikation	72	2 min	
Finale Erweiterung	72	7 min	1

Als Sonde zum Nachweis des *FRAX*-Gens und zur Normalisierung der *MYC*-Daten wurde ein 480 bp langes PCR-Produkt verwendet, welches mit Hilfe der PCR und Digoxigenin-dUTP-markierten Nukleotiden (Roche) aus einem Plasmid (OX5.1) amplifiziert wurde. Die Sonde wurde durch Herrn Dr. Georg Weber vom Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung gestellt und stammte ursprünglich von Prof. Peter Steinbach aus Ulm.

2.2.4.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der markierten Sonden-DNA (*MYC*) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem *QIAquick-PCR-Purification-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Damit konnten PCR-Produkte von 10 bp - 100 kb Länge von Primer, Nukleotide, Polymerasen und Salze über eine Säule gereinigt werden.

Die Aufreinigung erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 Upm in einer QIAquick-Säule nach Zugabe von 50 µl PCR-Ansatz und 250 µl PB-Puffer für 30-60 sek. Nachdem der Überstand verworfen wurde erfolgte ein Waschschriff unter Zugabe von 750 µl PE-Puffer und eine Zentrifugation bei 13000 Upm für 1 min. Zum trocknen wurde die Säule noch mal zentrifugiert.

Um die gebundene DNA von der Säule zu lösen wurden 50 µl TrisHCl (10 mM) auf die Säule mittig aufgetragen für 1 min bei RT inkubiert, bei 13000 Upm zentrifugiert und die Sonden-DNA bei -20°C gelagert. Die Überprüfung der Qualität der markierten Sonden-DNA wurde gelelektrophoretisch durch Auftrennung der PCR-Produkte im 2%-igen Agarosegel nachgewiesen, wobei nach mehrfachem Einbau von DIG-dUTP markierten Nukleotiden das Molekulargewicht der markierten PCR-Produkte erhöht wurde (Abb. 8).

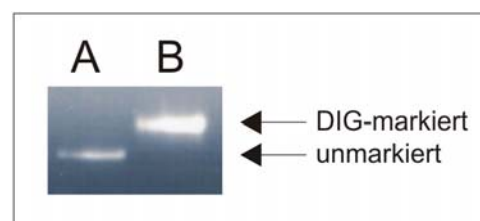


Abb. 8: *MYC*-Banden der Zelllinie PC3-16 im Agarosegel (2%) vor (A) und nach DIG-Markierung (B) der amplifizierten PCR-Produkte

2.2.4.4 Nachweis der Markierung im DOT-Blot

Die Überprüfung der Effizienz der Markierung erfolgte colorimetrisch (NTB/BCIP) durch den Dot-Blot nach Auftragung der markierten Sonden-DNA auf eine Nylon-Membran (Roche). Aufgrund der Intensität der enzymatischen Farbreaktion einzelner Verdünnungsstufen der PCR-markierten Sonden-DNA konnte die Einbaueffektivität des Farbstoffs Digoxigenin bis auf den Faktor 1:1000 nachgewiesen werden (Abb. 9).

Dabei wurde eine Verdünnungsreihe (6 Verdünnungsstufen) der PCR-amplifizierten und DIG-markierten Sonden-DNA 1:10 mit 6x SSC hergestellt, jeweils 2 µl PCR-Produkt/Verdünnungsstufe auf die Nylon-Membran aufgetragen, für 15 min bei RT luftgetrocknet und die DNA durch UV-Licht im UV-Strata-Linker für 40 sek auf die Membran fixiert.

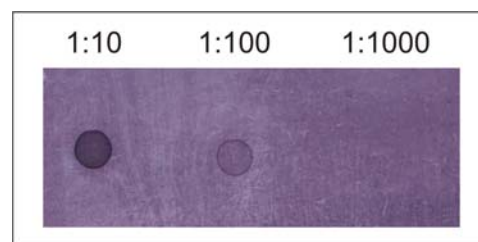


Abb. 9: Dot-Blot zur Überprüfung der Qualität der DIG-markierten Sonden-DNA nach Auftragung auf eine Nylon-Membran

Das anschließende Blocken der Membran für 30 min bei 37°C in 1% Blockinglösung (Roche) mit 6x SSC verhindert eine unspezifische Bindung des Farbstoffs Digoxigenin an die Membran. Nachdem 3 µl Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase und 3 ml TN-Puffer auf die Membran gegeben, für 30 min bei RT unter gleichmäßigem Schütteln inkubiert und die Membran anschließend zweimal mit TN-Puffer gewaschen und für 10 min mit 3 ml Dot-Puffer behandelt wurde, erfolgte die Detektion der DIG-markierten Sonde für 30-180 min bei RT im dunkeln nach Zugabe der Färbelösung (5,7 ml Dot-Puffer, 33 µl NBT und 25 µl BCIP) auf die Membran.

Zum Reaktionsstop und zur Hintergrundreduktion wurde die Membran in 70% Ethanol (RT) kurz gespült und trocken gelassen. Anhand der Farbreaktion der einzelnen Verdünnungsstufen konnte die Einbaueffektivität der DIG-Markierung beurteilt werden.

2.2.4.5 Restriktionsverdau genomischer DNA

Um eine gleichmäßige Hybridisierung der markierten Sonden-DNA an die Proben-DNA zu gewährleisten, wurde nach Isolierung die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (Roche) verdaut. Dabei wurde DNA an ganz bestimmten Restriktions-Schnittstellen geschnitten (G↓AATTC ; CTTAA↓G) und in kleine Fragmente zerstückelt, die nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel als DNA-Schmier erkennbar wurden (Abb. 10).

Zur Durchführung eines Restriktionsverdaus wurde in einem 35 µl Restriktionsansatz 10 µg DNA, 100 U Restriktionsenzym *EcoRI* und Restriktionspuffer (1x) eingesetzt und mit H₂O_d entsprechend aufgefüllt. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C im Wasserbad. Nach enzymatischen Verdau erfolgte die elektrophoretische Auftrennung des Restriktionsansatzes in einem 1%-igen Agarosegel (LE-Agarose, Biozym) mit 35 µl Restriktionsansatz, 3 µl Proben-Lade-Puffer (6x) und 5 µl H₂O_d unter Verwendung eines DIG-markierten Längenstandards (DNA-Marker-VII-Dig, Roche) bei 40 V und 150 mA für 17 Stunden über Nacht. Nach Auftrennung der verdauten DNA wurde das Gel für 30 min in Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht überprüft und fotografiert.

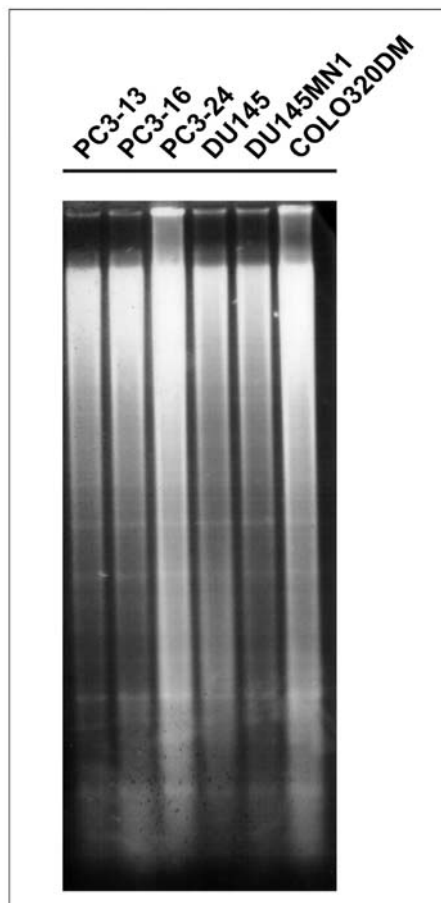


Abb. 10: Elektrophoretische Auftrennung der DNA der Zelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145, DU145MN1 und COLO320DM im Agarosegel (1%) nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*

2.2.4.6 DNA-Transfer und Prähybridisierung der Membran

Nach dem Restriktionsverdau erfolgte eine Vorbehandlung des Agarosegels bei der die DNA in der Southern-I-Lösung für 30 min denaturiert und in der Southern-II-Lösung für 30 min neutralisiert wurde. Die Anpassung des Gels an den Transferpuffer erfolgte in 10x SSC für 30 min.

Die Übertragung der DNA auf die Nylon-Membran (Roche) erfolgte entsprechend dem Aufbau in Abbildung 11. Dabei sorgen ein Gewicht und trockene Filterpapiere dafür, dass durch Kapillarkräfte die DNA aus dem Gel und über den Transferpuffer auf die Membran übertragen wird. Der Blotvorgang erfolgte über Nacht für 17-18 h bei RT.

Nachdem die Membran für 10 min in 2x SSC gespült, auf ein Whatmanpapier für 5 min angetrocknet und im Crosslinker unter UV-Bestrahlung bei 1200 μ Joule für 40 sek fixiert wurde erfolgte die Prähybridisierung der Membran in der Hybridisierungsröhre unter Zugabe von 10 ml Hybridisierungsmix für 90 min bei 58°C im Hybridisierungsofen.

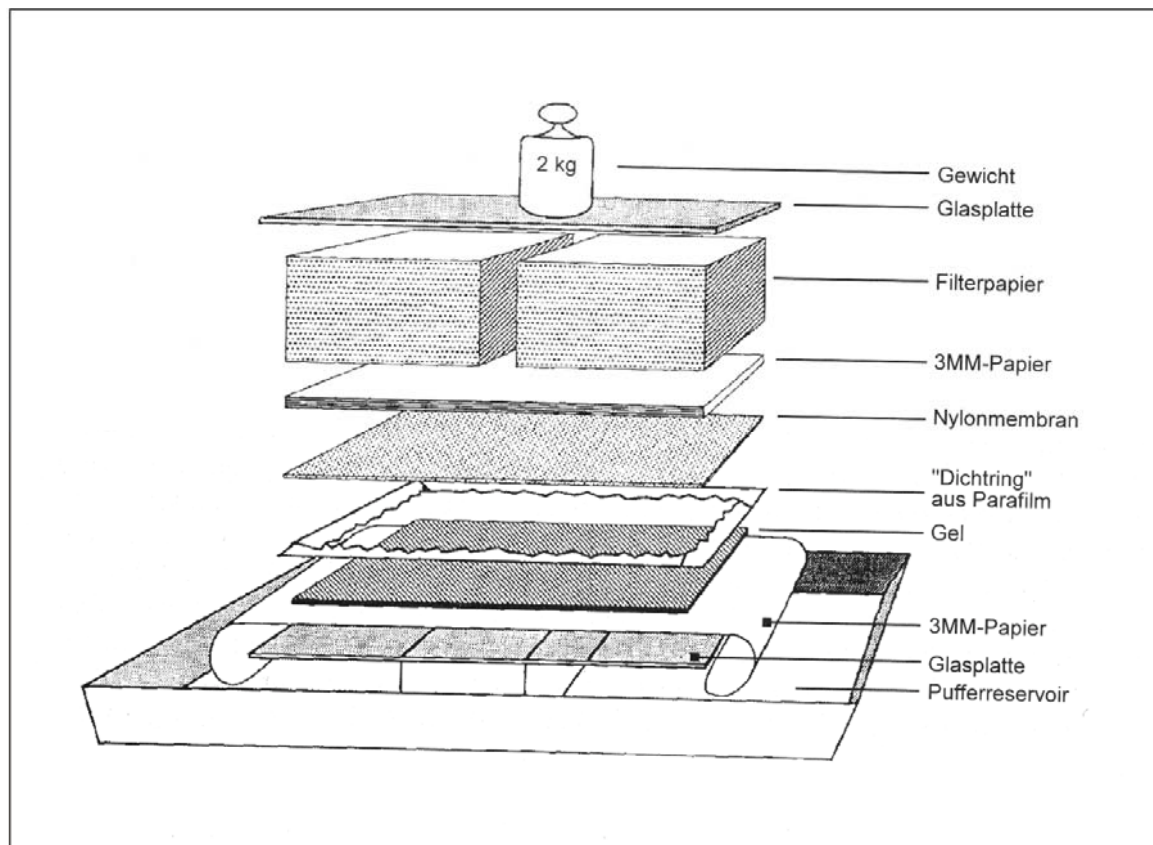


Abb. 11: Querschnitt eines Southern-Blot-Aufbaus (Quelle: Gentechnische Methoden 2. Auflage, Spektrum Verlag 1999)

2.2.4.7 Denaturierung und Hybridisierung der Sonden-DNA

Vor der eigentlichen Hybridisierung erfolgte die Denaturierung der Sonden-DNA. Dabei wurden zu 10 ml Hybridisierungs-Mix (9 ml Stammlösung + 1 ml Blockinglösung + 0,3 g SDS) markierte Sonden-DNA (10 µl) zugegeben und 10 min auf der Heizplatte (95°C) zum Kochen gebracht. Die Hybridisierung der Sonden-DNA an die Membran erfolgte anschließend über Nacht bei 58°C im Hybridisierungssofen.

2.2.4.8 Stringenzwaschung der Membran

Zur Reduktion von Hintergrundsignalen wurde nach der Hybridisierung eine Stringenzwaschung der Membran durchgeführt. Dabei wurde in der Hybridisierungsröhre die Membran für 2x10 min in 2x50 ml Waschlösung-I bei 58°C gespült und mit 380 ml Blockinglösung für 60 min bei RT inkubiert und geblockt. Anschließend wurde die Antikörperlösung mit 20 ml Blockinglösung und 2 µl *Anti-DIG-AP* (Roche) auf die Membran gegeben und für 30 min bei RT im Hybridisierungssofen inkubiert. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu gewährleisten wurde die Membran für 3x15 min in je 300 ml Waschlösung-II bei RT gespült.

2.2.4.9 Immunologische Detektion und Auswertung

Die Immunologische Detektion der hybridisierten Sonde wurde mit dem *CPD-Star-read-to-use-Kit* (Roche) durch Anti-DIG-AP Fab-Fragmenten und dem chemilumineszenz Substrat *CSPD* nachgewiesen. Dabei wird *CSPD* von der alkalischen Phosphatase umgesetzt und durch Produktion sichtbaren Lichtes als schwarze Bande auf dem Röntgenfilm sichtbar.

Zur immunologischen Detektion wurde die Membran in der Hybridisierungsröhre für 5 min in 20 ml Detektionspuffer gelegt, tropfenweise *CDP-Star*-Lösung auf die Membran aufgetragen, für 5 min bei RT inkubiert und in einer Plastikfolie luftblasenfrei eingeschweißt. Anschließend wurde die Membran mit der DNA-Seite nach oben in eine Röntgen-Kassette (24x30cm) gelegt, ein Film (X-Omat-Blue, Kodak) aufgelegt und für 2-3 h in der Dunkelkammer exponiert. Nach Entwicklung des Films durch abwechselnde Behandlung mit der Entwicklerlösung (30 sek) und der Fixiererlösung (30 sek) wurde der Film eine Stunde bei RT getrocknet. Die Auswertung der Intensität der Gelbanden auf dem Röntgenfilm wurde mit dem Personal-Densitometer (Molecular Dynamics) und der MD-Image-Quant-Software Version 3.3 durchgeführt.

2.2.5 Western-Blot

Western-Blot-Untersuchungen zum Nachweis einer *TLOC1*-Protein-Überexpression wurden durch Prof. Richard Zimmermann, Dr. Martin Jung und Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg durchgeführt.

Western-Blot-Untersuchungen wurde für das Protein *TLOC1* und den Referenz-Proteinen (*Sec61ap* und β -*Tubulin*) an den Prostatakarzinom-Zelllinien PC3, DU145 und DU145MN1 sowie an einer benignen Prostata-Hyperplasie-Zelllinie BPH1 durchgeführt, die als Kontrollzelllinie diente. Zum Nachweis einer Proteinexpression wurden Antikörper vom Hasen verwendet, die gegen das carboxy-terminale Ende des Peptids von *TLOC1/Sec62p* (CGETPKSSHEKS), gegen das carboxy-terminale Ende des Peptids von *Sec61ap* (CKEQSEVGSMGALLF) und gegen das β -*Tubulin* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) gerichtet waren.

Nachdem die Proben in ein 15%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt, durch ein Elektrolot auf eine Polyvinyliden-Fluorid-Membran geblottet und durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern und peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Hase-IgG Antikörper nachgewiesen wurden, konnten die gebundenen Antikörper nach Inkubation der Blots unter Chemolumineszenz auf einen Röntgenfilm visualisiert werden. Die densitometrische Auswertung des Films wurde mit dem Personal-Densitometer (Molecular Dynamics) durchgeführt.

Zur Durchführung der Experimente wurde eine identische Anzahl an Zellen von verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien (PC3, DU145 und DU145MN1) und der Kontrollzelllinie (BPH1) verwendet, der SDS-PAGE Gelelektrophorese und den Westernblot-Untersuchungen unterworfen und mit einem Antipeptid-Antikörper, der gegen dem carboxy-terminalen Ende des *TLOC1*-Proteins gerichtet war, nachgewiesen. Zum Vergleich wurden die Blots mit einem Antikörper untersucht, der gegen das *Sec61ap* gerichtet war und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ein allgemein exprimiertes Protein darstellt. Als zweites Kontrollgen diente das Referenzgen β -*Tubulin*, das in der Zellwand lokalisiert und am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt ist (Jung et al. 2006).

Zur Untersuchung der Protein-Überexpression wurde das Verhältnis (Ratio) der untersuchten Proteine (*Sec62p/Sec61ap* und *Sec62p/ β -Tubulin*) in den Prostatakarzinom-Zelllinien und der Kontroll-Zelllinie bestimmt und im Verhältnis zueinander gesetzt. Die Ratio der untersuchten Proteine wurde für die Kontroll-Zelllinie BPH1 gleich 1 gesetzt.

2.2.6 Standard PCR-Methoden

2.2.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der PCR dient der enzymatischen-*in-vitro*-Amplifikation bestimmter Nukleinsäureabschnitte zum diagnostischen Nachweis und Analyse. Die Voraussetzung zur Amplifikation bilden Enzyme (DNA-Polymerasen), die in Anwesenheit von Nukleotiden (dNTP's) kurze Oligonukleotidsequenzen (Primer) mit einem freien 3'-OH-Ende entsprechend verlängern und somit den gewünschten DNA-Abschnitt vervielfältigen können.

Eine typische PCR-Reaktion (Abb. 11) besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Schritten: *Denaturierung (1)*, *Anlagerung (2)* und *Amplifikation (3)*.

Nach Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95°C in zwei Einzelstränge werden im darauf folgenden Schritt der Hybridisierung bei einer optimalen Temperatur (60°C) die synthetisch hergestellten Primer komplementär an die Zielsequenz gebunden und durch die DNA Polymerase bei 72°C verlängert (Abb. 12A).

Dieser Ablauf erfolgt zyklisch mehrmals hintereinander (Abb. 12B), wobei das PCR-Produkt mit jedem weiteren PCR-Zyklus exponentiell vermehrt wird. Die Konzentration des PCR-Produktes wird dabei logarithmisch gegen die PCR-Zyklenzahl (n) aufgetragen (Abb. 12C).

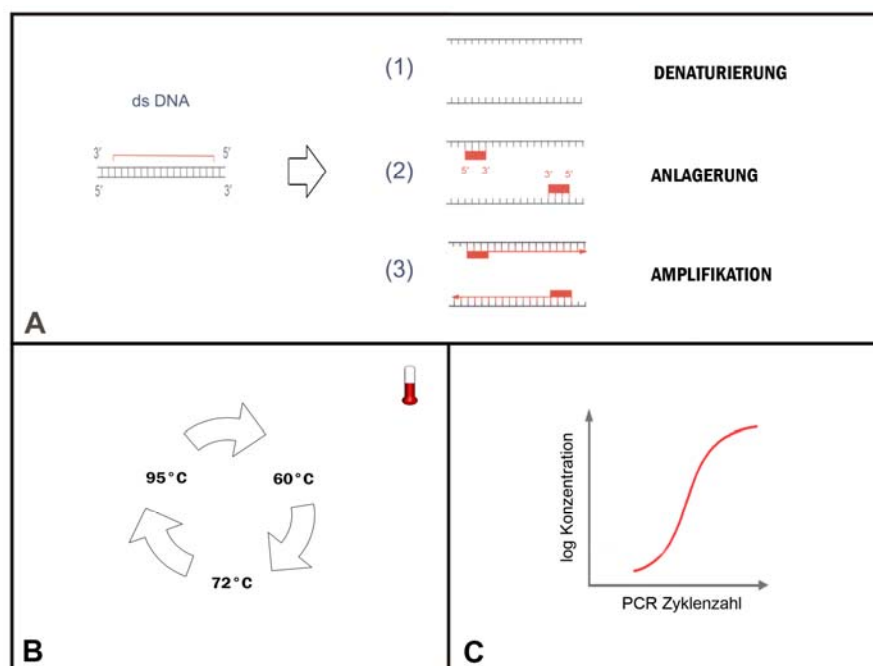


Abb. 12: Prinzip (A) und Verlauf der PCR-Reaktion (B,C)

2.2.6.2 Reverse-Transkription und RT-PCR

Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem *SuperScript-II-Reverse-Transcriptase-Kit* (Invitrogen) in einem zwei Schritt Prozess durchgeführt, wobei die RNA zuerst in cDNA umgeschrieben und in einem darauf folgenden PCR-Schritt amplifiziert wird. Für die RT-PCR wurden Oligo(dT₁₂₋₁₈)-Primer verwendet, die spezifisch an die Poly(A)-Sequenz von eukaryontischer mRNA binden und mit der Reversen Transkriptase ein kontinuierliches cDNA Fragment in 3'-5' Richtung bilden. Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Nukleasen (RNAsen) wurde in den Reaktionsansatz der RNase-Inhibitor *RNaseOUT* (Invitrogen) eingesetzt.

Für die Umschreibung wurde in einem 20 µl Reaktionsansatz jeweils 1 µg isolierte gesamt RNA, Oligo_{dT(12-18)} Primer (0,5 µM), dNTPs (je 0,2 mM), Firststrand Buffer (1x), DTT (10 mM), RNase Inhibitor (2 U) sowie *Superscript-II* RT-Polymerase (10 U) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde abhängig von der Konzentration der isolierten Gesamt-RNA mit RNase-freiem Wasser entsprechend aufgefüllt. Um eine Bindung der RNA mit sich selbst zu vermeiden, wurde die RNA zuerst bei 65°C für 5 min erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte anschließend bei 42°C für 50 min, die Inaktivierung der Reversen-Transkriptase (RTase) bei 70°C für 15 min (Tab. 6).

Tabelle 6: PCR-Bedingungen zur Durchführung einer RT-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Denaturierung der RNA	65	5
Synthese der cDNA	42	50
Inaktivierung der RTase	70	15

2.2.6.3 ALU-PCR

Um die Reinheit der RNA zu gewährleisten, wurde nach der Reversen-Transkription (Kapitel. 2.2.5.2) eine *ALU-PCR* durchgeführt. *ALU*-Sequenzen sind phylogenetisch hochkonservierte, etwa 300 bp lange repetitive Sequenzen, die in dimerer Organisation und hoher Kopienzahl vor allem in genreiche Regionen vorkommen, über 10 % des gesamten menschlichen Genoms ausmachen und bestimmte Erkennungsstellen für die Restriktionsendonuclease *ALU-I* besitzen (Batzer und Deininger 2002).

Der Nachweis von *ALU*-Sequenzen in der RNA durch die *ALU*-PCR weist auf eine DNA-Kontamination hin. Die *ALU*-PCR wurde mit dem *HotStar-Taq-Polymerase-Kit* (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Abb. 13).

Zur Durchführung einer *ALU*-PCR wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz 100 ng isolierte gesamt RNA, PCR-Puffer (1x), *ALU*-Primer (0,5 µM), dNTP-Mix (je 0,2 mM), sowie *HotStar-Taq-Polymerase* (1,25 U) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit RNase-freiem Wasser abhängig von der Konzentration der isolierten Gesamt-RNA entsprechend aufgefüllt.

Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion diente dabei 5ng DNA aus Blutlymphozyten. Die PCR-Bedingungen zur Durchführung einer *ALU*-PCR wurden in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: PCR-Bedingungen zur Durchführung einer *ALU*-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	15	1
Denaturierung	94	1	30
Anlagerung	55	1	
Amplifikation	72	4	
Finale Erweiterung	72	10	1

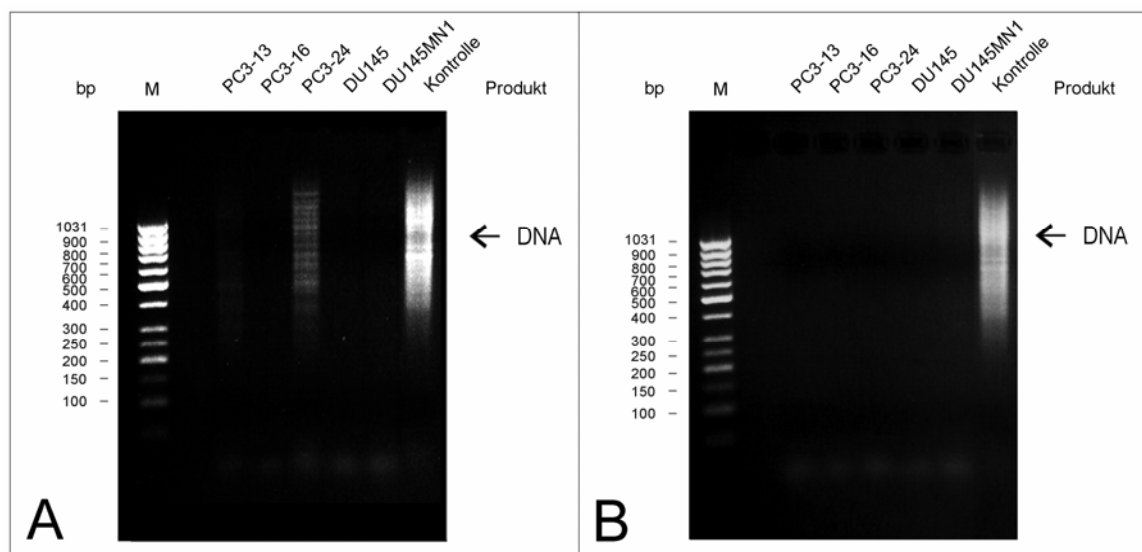


Abb. 13: *ALU*-PCR zum Nachweis einer DNA-Kontamination in RNA-Proben der Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145 und DU145MN1 nach unvollständigem- (A) und vollständigem- (B) Verdau der DNA durch das Enzym *DNase-I*. Als Positivkontrolle diente DNA aus Blut. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese im Agarosegel (2%). Zur internen Kontrolle wurde der Marker (50 bp DNA-Leiter, Peq Gold, PeqLab) verwendet.

2.2.6.4 *GAPDH*-PCR

Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung der RNA-Umschreibung in cDNA wurde nach der Reversen-Transkription (Kapitel 2.2.5.2) eine *GAPDH*-PCR durchgeführt. Dabei konnte mit Hilfe der PCR das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen Glycerin-Aldehy-Dehydrogenase (*GAPDH*) in der cDNA nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde DNA aus Blutlymphozyten verwendet (100 ng). Die *GAPDH*-PCR wurde mit dem *HotStar-Taq-Polymerase-Kit* (Qiagen) durchgeführt (Abb. 14). Zur Durchführung einer *GAPDH*-PCR wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz 2 µl umgeschriebene cDNA, PCR-Puffer (1x), Primer F_{wd}/R_{ev} (0,5 µM), dNTP-Mix (je 0,2 mM), sowie HotStar-Taq-Polymerase (1,25 U) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit RNase-freiem Wasser entsprechend aufgefüllt. Die PCR-Bedingungen zur Durchführung einer *GAPDH*-PCR wurden in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: PCR-Bedingungen zur Durchführung einer *GAPDH*-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min/sek)	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	15 min	1
Denaturierung	94	1 min	30
Anlagerung	58	45 sek	
Amplifikation	72	45 sek	
Finale Erweiterung	72	10 min	1

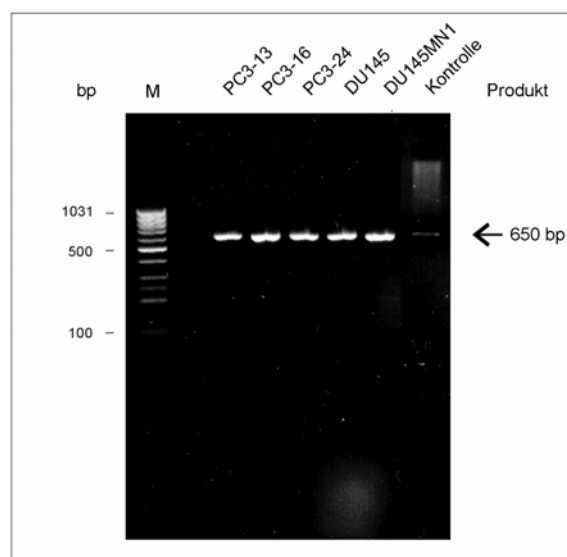


Abb. 14: *GAPDH*-PCR zur qualitativen und quantitativen Überprüfung der Reversen-Transkription der RNA am Beispiel von cDNA-Proben der Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145 und DU145MN1. Als Positivkontrolle wurde DNA aus Blut verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese im Agarosegel (2%). Zur Abschätzung der Größe und Menge der PCR-Produkte wurde der Marker (50 bp DNA-Leiter, Peq Gold, PeqLab) verwendet.

2.2.6.5 Gradienten-PCR

Zur Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur der *MYC*-PCR-Primer wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die Annealingtemperatur ist von der Schmelztemperatur (T_m) der Primer abhängig, bei der mindestens 50% der Primer an die Ziel-DNA binden. Die Schmelztemperatur der *MYC*-PCR-Primer wurde mathematisch mit Hilfe der Gleichung: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{C}+\text{G})$ errechnet und dient als Ausgangswert für die weitere experimentelle Bestimmung des T_m -Wertes, der von der Länge und Sequenz der Primer abhängig ist. Die Gradienten-PCR wurde mit dem *HotStar-Taq-Polymerase-Kit* (Qiagen) durchgeführt. Die experimentelle Bestimmung des T_m -Wertes erfolgte durch einen Temperaturgradienten ($T_m 60 \pm 5^\circ\text{C}$) in einem Gradientencycler (BioRad), wobei an verschiedenen Annealingtemperaturen identische PCR-Ansätze durchgeführt wurden (Abb. 15). Die Menge der gebildeten PCR-Produkte, die sich aus der Intensität der Bande im Agarosegel ergibt, weist somit auf eine optimale Annealingtemperatur (55°C) der *MYC*-PCR-Primer hin.

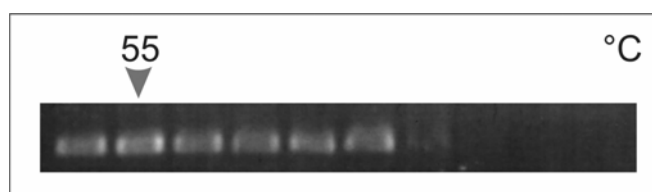


Abb. 15: Darstellung der optimalen Annealingtemperatur der *MYC*-PCR-Primer nach DNA-Amplifikation der Colonkarzinomzelllinie COLO320DM im Gradientencycler und Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel (2%).

Zur Durchführung einer Gradienten-PCR wurde in einem $50 \mu\text{l}$ Reaktionsansatz jeweils 500 ng DNA, PCR-Puffer (1x), Primer F_{wd}/R_{ev} ($0,5 \mu\text{M}$), dNTP-Mix (je $0,2 \text{ mM}$), sowie HotStar-Taq-Polymerase ($1,25 \text{ U}$) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit H_2O_d bis auf ein Gesamtvolumen von $50 \mu\text{l}$ entsprechend aufgefüllt. Die PCR-Bedingungen zur Durchführung einer Gradienten-PCR wurden in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: PCR-Bedingungen zur Durchführung einer Gradienten-PCR

Schritt	Temperatur ($^\circ\text{C}$)	Zeit (min)	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	15	1
Denaturierung	94	1	35
Anlagerung	60 ± 5	1	
Amplifikation	72	1.30	
Finale Erweiterung	72	5	1

2.2.6.6 *MYC*-PCR

Der qualitative Nachweis einer *MYC*-Amplifikation erfolgte mit Hilfe der PCR und dem *HotStar-Taq-Polymerase-Kit* (Qiagen) an den Prostatakarzinomzelllinien (PC3-13; PC3-16; PC3-24; DU145; DU145MN1) sowie an der Colokarzinomzelllinie COLO320DM (Abb.16).

Zur Durchführung einer *MYC*-PCR wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz 500 ng DNA, PCR-Puffer (1x), Primer F_{wd}/R_{ev} (0,5 µM), dNTP-Mix (je 0,2 mM), sowie HotStar-Taq-Polymerase (1,25 U) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit H₂O_d bis auf ein Gesamtvolumen von 50µl entsprechend aufgefüllt. Die PCR-Bedingungen zur Durchführung einer *MYC*-PCR wurden in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: PCR-Bedingungen zur Durchführung einer *MYC*-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min/sek)	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	15 min	1
Denaturierung	94	30 sek	30
Anlagerung	55	30 sek	
Amplifikation	72	1.30 min	
Finale Erweiterung	72	10 min	1

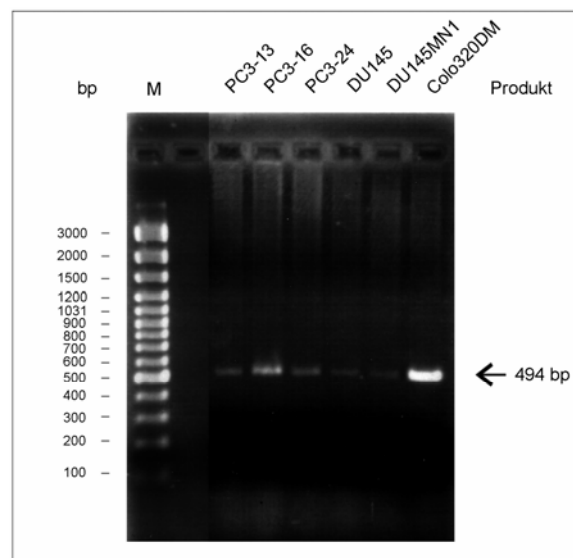


Abb. 16: *MYC*-PCR zum qualitativen Nachweis einer *MYC*-Amplifikation am Beispiel der Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145, DU145MN1 und der Colokarzinomzelllinie Colo320DM. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Elektrophorese im Agarosegel (2%). Zur Abschätzung der Größe der PCR-Produkte wurde der Marker (100 bp DNA-Leiter Plus, Peq Gold, PeqLab) verwendet.

2.2.7 Real-time PCR

2.2.7.1 Quantitative *real-time* PCR mit dem LightCycler

Die Methode der *real-time* PCR basiert auf dem Prinzip der konventionellen PCR (Kapitel 2.2.6.1), wobei die Amplifikation des Ausgangsmaterials über einen PC-Monitor in Echtzeit überwacht und die Transkriptmenge eines Gens quantitativ bestimmt werden kann.

2.2.7.2 Aufbau und Prinzip des Gerätes

Der LightCycler[®] (Abb. 17A) wurde von der Firma Roche in Mannheim entwickelt und besteht aus einem PCR-Cycler und einem Fluorimeter (Abb. 17B). In Kombination mit einem Computer mit Monitor und Software (LightCycler-Software Version 3.5.28) wird er für quantitative Untersuchungen verwendet.

Der PCR-Cycler bildet die Amplifikationseinheit des Gerätes, die den Reaktionsablauf der einzelnen PCR-Schritte über einen Luftstrom regelt. Dabei sorgen eine Heizspirale und ein Ventilator durch gleichmäßige Verteilung und abwechselndes Aufheizen und Abkühlen der Luft für eine optimale Temperatur innerhalb der Reaktionskammer.

Das Fluorimeter bildet die Detektionseinheit des Gerätes, die aus einem Anregungs- und drei Detektionskanälen F1, F2, F3 (F1 = grün = 521 nm / F2 = rot = 640 nm / F3 = tiefrot = 705 nm) besteht. Die Detektion erfolgt nacheinander durch stufenweise Positionierung der Proben über die optische Einheit des Fluorimeters.

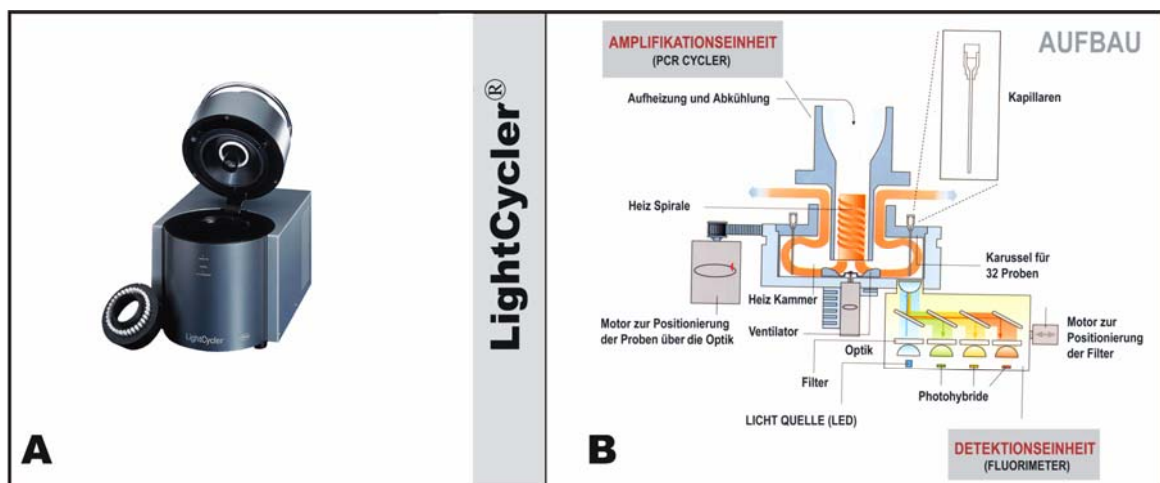


Abb. 17: Darstellung des LightCycler Gerätes (A) und dessen Aufbau (B); Quelle modifiziert: LightCycler Operators Manual Version 3.5 (Roche Molecular Biochemicals)

Das Prinzip des LightCyclers beruht auf die Bestimmung der Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb eines Reaktionsansatzes, wobei nach Anregung durch eine Lichtquelle (LED) emittierte Fluoreszenz durch halbdurchlässige Spiegel und wellenspezifische Filter (521 nm, 640 nm, 705 nm) geleitet, und von drei Photohybriden unterschiedlicher Wellenlängen (530 nm, 640 nm, 710 nm) gemessen wird. Die optischen Signale werden in elektrische Signale umgewandelt, an einem Computer weitergeleitet und in Form von Falschfarben als Fluoreszenzkurven auf dem Monitor dargestellt.

Die PCR-Reaktionen finden nicht wie üblich in kleinen Reaktionsgefäßen, sondern in Glaskapillaren statt, die aufgrund ihrer Beschaffenheit eine schnelle und gleichmäßige Verteilung der Temperatur innerhalb des Reaktionsansatzes ermöglichen.

Nach Fertigstellung des Reaktionsansatzes und Befüllung der Glaskapillaren werden diese in einen Probenkarussell gesteckt, der Platz für 32 Kapillaren hat. Anschließend wird das Probenkarussell in die Reaktionskammer der Amplifikationseinheit gestellt, in der eine Heizspirale und ein Ventilator für eine optimale Temperatur der PCR-Reaktion sorgen. Die Intensität der Emission der Fluoreszenzfarbstoffe wird in jeder Glaskapillare gemessen, nachdem ein Motor die einzelnen Proben schrittweise über die optische Einheit des Fluorimeters bewegt hat.

2.2.7.3 Detektion der PCR-Produkte

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte über die Fluoreszenzmessung von DNA-bindenden Fluorochromen (SYBR-Green-I). SYBR-Green-I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sequenzunabhängig aber spezifisch an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindet. Er wird bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und hat sein Emissionsmaximum bei 521 nm (LC Operator's Manual Version 3.5, 2000, Roche). Das Prinzip der Detektion mit SYBR-Green-I beruht auf die Bestimmung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs nach Bindung an doppelsträngige DNA (Abb. 18).

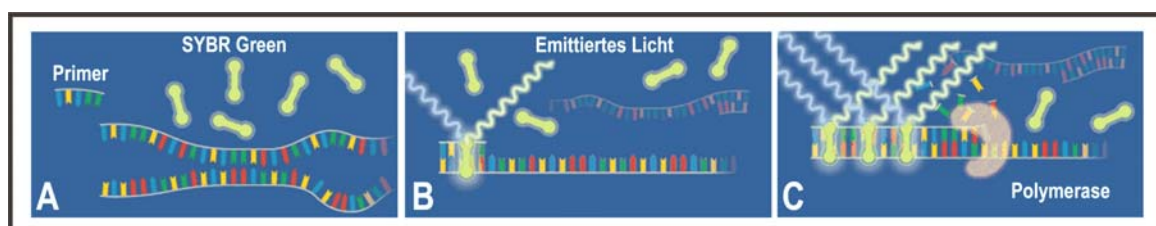


Abb. 18: Prinzip der sequenzunabhängigen Detektion durch SYBR-Green-I; Quelle modifiziert: <http://www.gene-quantification.de>

Die Leuchtkraft des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green-I ist in gelöster Form gering (Abb. 18A), erhöht sich aber drastisch in gebundener Form. Während der PCR-Reaktion beginnt nach Anlagerung der Primer (Abb. 18B) die Taq-Polymerase mit der Kettenverlängerung, wobei zuerst wenige und danach immer mehr Fluoreszenzmoleküle in den entstehenden DNA-Doppelstrang eingebaut werden (Abb. 18C). Angeregt durch eine Lichtquelle im *real-time* PCR-Gerät beginnen sie zu fluoreszieren. Das von ihnen abgegebene Licht kann von der optischen Detektionseinheit des Gerätes erfasst und der Anstieg der Fluoreszenz im Reaktionsgefäß gemessen werden.

Die Fluoreszenzintensität einer Probe ist zur Konzentration des neu gebildeten PCR-Produktes direkt proportional. Mit Hilfe der LightCycler Software 3.5 (Roche) wird dem Fluoreszenzsignal jeder Probe ein bestimmter CP-Wert (crossing point) zugeordnet, der sich aus der Anzahl der PCR-Zyklen einer PCR-Reaktion ergibt.

2.2.7.4 Der CP-Wert

Der CP-Wert (crossing point) dient der Bestimmung der Konzentration eines PCR-Produktes in einer Probe und wird aus den Fluoreszenzwerten der PCR-Produkte bestimmt. Er repräsentiert einen bestimmten PCR-Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal einer Probe über das Hintergrundsignal ansteigt und zur Ausgangskonzentration der Probe proportional ist. Der CP-Wert wird in der exponentiellen (log-linearen) Phase der PCR-Amplifikation gemessen, in der eine Quantifizierung der PCR-Reaktionen aller Proben unter ähnliche Bedingungen möglich ist (Abb. 19).

Der CP-Wert wurde mit der LightCycler-Software 3.5 (Roche) und der Second-Derivative-Maximum-Methode bestimmt. Die Software bestimmt den CP-Wert an jenem PCR-Zyklus, an der die zweite Ableitung der Fluoreszenzkurve einen Maximalwert erreicht hat. Anhand der CP-Werte und der bekannten Konzentrationen der Standards wird eine Standardgerade erstellt. Die Probenkonzentration wird anschließend von der Software anhand der Standardgeraden und den ermittelten CP-Werten bestimmt.

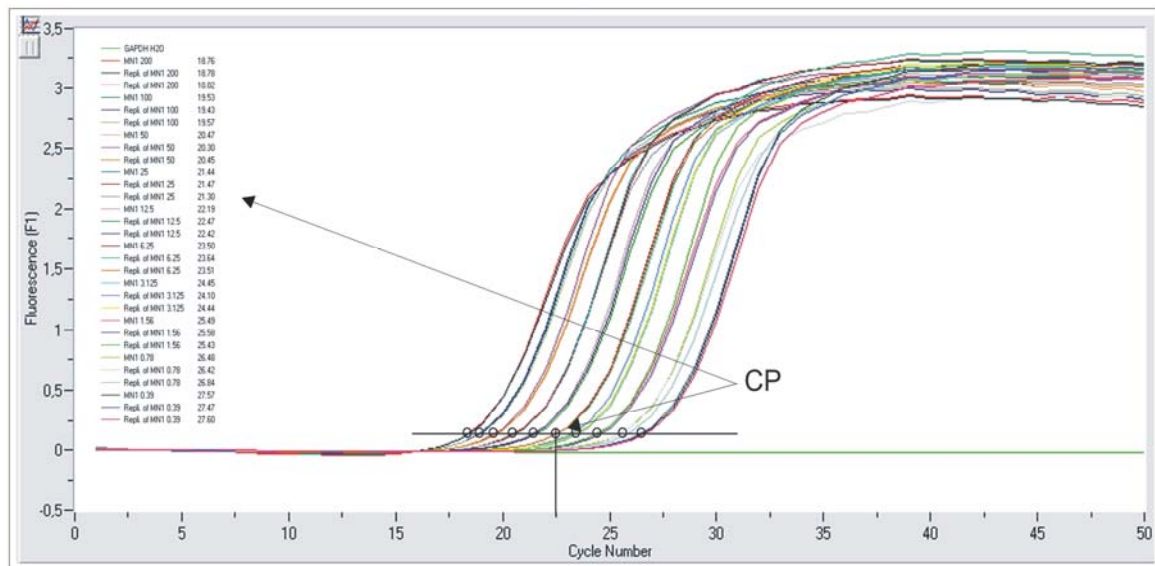


Abb. 19: Darstellung der Fluoreszenzkurven unterschiedlicher Standard-DNA Konzentrationen (1:2) der Prostatakarzinomzelllinie DU145MN1 zur Bestimmung der CP-Werte am Beispiel des Referenzgens *GAPDH*

2.2.7.5 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse dient dem spezifischen Nachweis der PCR-Produkte in einem Reaktionsansatz. Sie wird bei der sequenzunabhängigen Detektion mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green-I (Kapitel 2.2.6.3) durchgeführt, wobei die Fluoreszenzwerte der PCR-Produkte sowie unspezifische Nebenprodukte und Primerdimere sichtbar gemacht und einer charakteristischen Schmelztemperatur zugeordnet werden (Abb. 20).

Das Prinzip der Analyse beruht auf einer kontinuierlichen Messung des Fluoreszenzsignals der PCR-Produkte innerhalb eines Reaktionsgefäßes, wobei nach einer stufenweisen Temperaturerhöhung doppelsträngige DNA denaturiert und der gebundene Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green-I bei einer spezifischen Schmelztemperatur freigesetzt wird. Die Menge der pro Zeiteinheit freigesetzten Fluoreszenz wird graphisch in Form eines Fluoreszenz/Temperatur Diagramms dargestellt (Abb. 20A), der im Wendepunkt der Kurve eine maximale Fluoreszenzänderung ($-dF/dT$) aufweist und nach mathematischer Ableitung (negative 1. Ableitung) in Form einer Schmelzkurve (Abb. 20B) dargestellt werden kann. Der maximale Wert der Fluoreszenzänderung (Peak) kann dann einer bestimmten Schmelztemperatur zugeordnet werden, die für jedes PCR-Produkt charakteristisch ist. Die Schmelztemperatur kann von der Länge der PCR-Produkte und dem GC-Gehalt der PCR-Primer beeinflusst werden und unter nicht optimalen Bedingungen zu Primerdimeren führen (Abb. 20C).

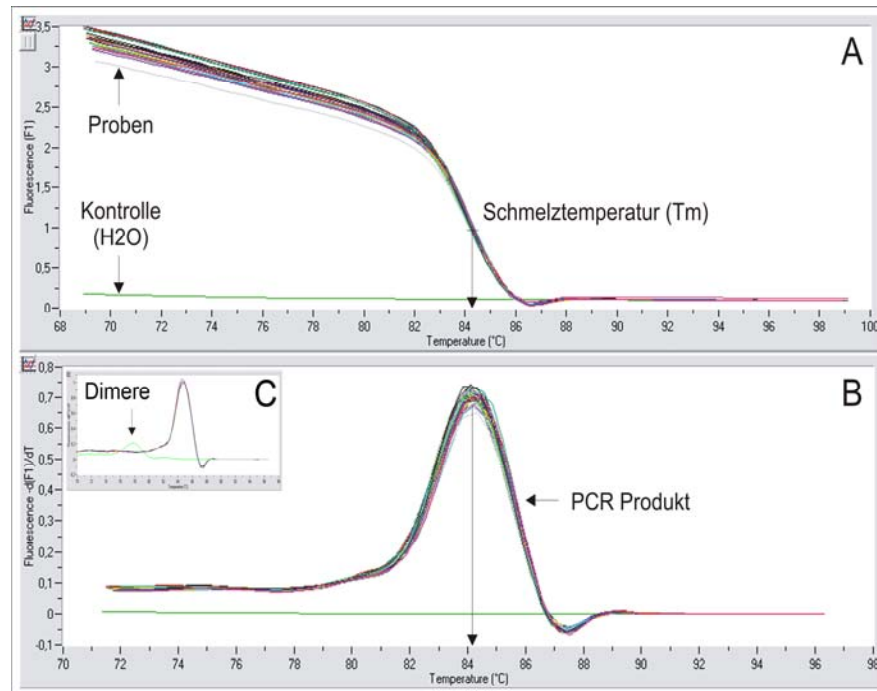


Abb. 20 : Schmelzzkurvenanalyse (A,B,C) am Beispiel des Referenzgens *GAPDH*

2.2.7.6 PCR-Effizienz und Standardkurven

Die Effizienz der PCR ist ein Maß für die Genauigkeit der Amplifikation eines PCR-Produktes innerhalb einer PCR-Reaktion. Sie ist von der Ausgangskonzentration der eingesetzten Nukleinsäure abhängig und entspricht der PCR-Kinetik durch folgende Formel (Gleichung 1):

$$N_n = N_0 \times E^n$$

$E = 2$ (theoretisch)

$E \neq 2$ (experimentell)

Gleichung 1: Formel zur Berechnung der PCR-Kinetik

N_n = Nukleinsäure Endkonzentration

N_0 = Nukleinsäure Anfangskonzentration

E^n = PCR-Effizienz nach n Zyklen

Die Effizienz einer PCR hat einen theoretischen Wert von 2, bei dem das PCR-Produkt nach jedem Zyklus unter optimalen Bedingungen verdoppelt wird. Experimentell kann die Effizienz von dem theoretischen Wert abweichen und muß deshalb für jedes Experiment neu bestimmt werden.

Einfluss auf die PCR-Effizienz haben unterschiedliche Faktoren wie, Ausgangskonzentration des Templates, Qualität der Nukleinsäure, Dauer einer PCR-Reaktion, Effizienz der Polymerase, Nukleotid- und $MgCl_2$ -Konzentration, Primersequenz und Primerlänge, Endkonzentration des PCR-Produktes sowie Pipettierfehler.

Die experimentelle Bestimmung der PCR-Effizienz wird in der *real-time* PCR mit Hilfe einer Standardkurve durchgeführt, die aus einer Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen einer Standard-Probe erstellt wird (Abb. 21). Die Standard-Probe kann dabei eine Nukleinsäure (DNA, cDNA) unterschiedlichen Gewebetyps sein, in der das zu untersuchende Gen eine hohe Ausgangskonzentration aufweist.

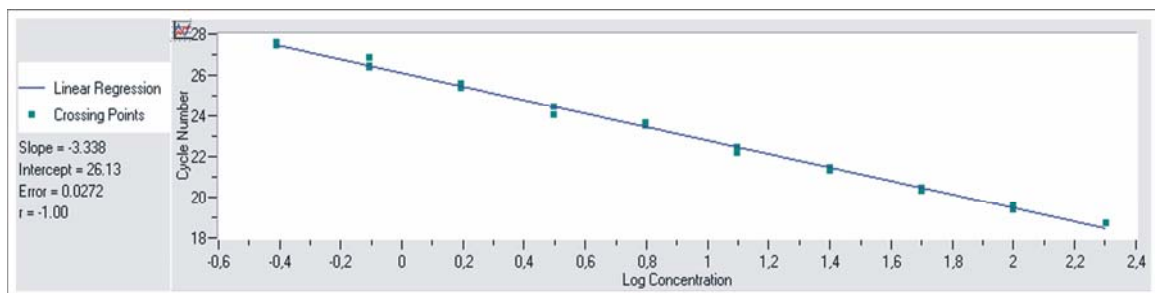


Abb. 21 : Darstellung der Standardkurve zur Berechnung der PCR-Effizienz am Beispiel des Referenzgens *GAPDH* über 10 Verdünnungsstufen (1:2) der Standardzelllinie DU145MN1

Die Standardkurve wird mathematisch als Regressionsgerade über die einzelnen Verdünnungsstufen (CP-Werte) der Standard-Probe dargestellt, wobei der y-Achsenabschnitt der PCR-Zyklenzahl (n) und der x-Achsenabschnitt der logarithmischen Auftragung der Konzentration ($\log N_n / \log E$) der einzelnen Proben entspricht und N_n die Konzentration der Proben am CP-Wert bedeutet. Nach Ermittlung der CP-Werte der einzelnen Konzentrationsstufen erfolgt die mathematische Bestimmung der PCR-Effizienz über die Steigung (*slope*) der Regressionsgerade (Gleichung 2 und 3).

$$\text{Steigung} = \frac{-1}{\log E}$$

Gleichung 2: Formel zur Berechnung der Steigung der Regressionsgerade

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Gleichung 3: Formel zur Berechnung der PCR-Effizienz (E); Quelle: Rasmussen et al. 2001



Im Idealfall ergibt eine PCR-Reaktion mit einer Effizienz von 2 eine Standardkurve mit einer Steigung von -3,3. Eine PCR mit einer geringeren Effizienz ($E < 2$) entspricht dabei einer steileren Standardkurve mit größeren CP-Werten ($> 3,3$). Experimentell unterscheiden sich jedoch die Effizienzen der PCR-Primer für das Ziel- und Referenzgen. Um in den untersuchten Proben einen quantitativen Vergleich der Genkonzentration zu ermöglichen, müssen die Effizienzen beider Gene möglichst gleich sein.

Die Bestimmung der Effizienz der PCR-Primer kann auf zwei unterschiedlichen Arten durchgeführt werden, wobei es eine *Effizienzberechnung ohne*- und *mit Effizienzkorrektur* gibt.

Bei der *Effizienzberechnung ohne Effizienzkorrektur* wird der erwartete experimentelle Wert der PCR-Effizienz für das Ziel- und Referenzgen mit dem theoretischen Wert 2 gleichgesetzt ($E=2$). Diese Effizienzberechnung setzt dabei voraus, dass die erwartete experimentelle Effizienz beider Gene dem theoretischen Wert entspricht.

Bei der *Effizienzberechnung mit Effizienzkorrektur* wird die PCR-Effizienz für das Ziel- und Referenzgen einzeln bestimmt. Diese Effizienzberechnung berücksichtigt die tatsächlich gemessene PCR-Effizienz beider Gene, die sich aus den jeweiligen Standardkurven generieren lassen.

Die Art der Berechnung der PCR-Effizienz ist von der Auswahl der geeigneten Quantifizierungsstrategie der *real-time* PCR abhängig.

2.2.8 *Real-time* PCR-Methoden zur relativen Quantifizierung von Genen

Zur Charakterisierung der Amplifikationseinheit auf Chromosom 3q25-q26 wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene *real-time* PCR-Methoden auf dem LightCycler-System (Roche) durchgeführt.

Während zur Untersuchung von Genamplifikationen auf Chromosom 3q eine neue *real-time* PCR-Methode entwickelt wurde, erfolgte die Untersuchung der Expression der Gene innerhalb der Amplifikationseinheit mit Hilfe der relativen Quantifizierungs-Software *RelQuant* (Roche).

Beide Methoden basieren auf dem Prinzip der relativen Quantifizierung von Genen, bei der nicht die absolute Kopienzahl oder Konzentration eines Gens bestimmt wird.

Bei der relativen Quantifizierung wird das PCR-Signal eines Zielgens in dem zu untersuchenden Gewebe (Tumor) im Verhältnis zu einem Kontroll-Gewebe (Blut) gebracht und auf ein Referenzgen (Haushaltsgen) normalisiert (Livak und Schmittgen, 2001). Das Haushaltsgen stellt dabei ein Gen dar, das in jeder Zelle ubiquitär vorkommt und homogen reguliert wird (Abb. 22).

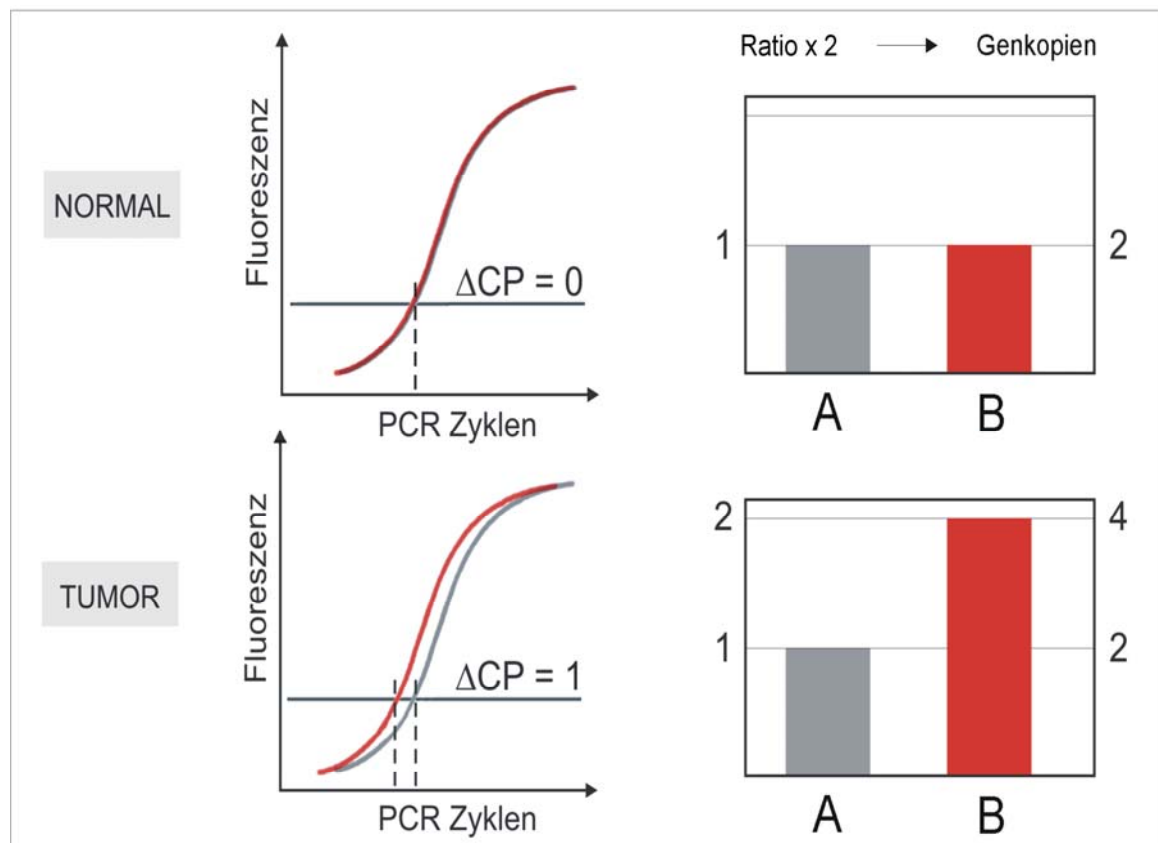


Abb. 22 : Prinzip der relativen Quantifizierung von Genprodukten am Beispiel der Fluoreszenzkurven eines Zielgens (B) gegenüber dem Referenzgen (A) im Tumor- und Normalgewebe

Während im Falle einer Genamplifikation im Normalgewebe für das Zielgen und das Referenzgen keine Veränderungen zu erwarten sind ($\Delta CP=0$) kann es im Tumor zu einer Amplifikation des Zielgens gegenüber dem Referenzgen kommen, das sich in einer Verschiebung der PCR-Zyklenzahl bzw. des CP-Wertes ($\Delta CP=1$) darstellt. Die Folge ist dabei eine Verdopplung der Ratio des Zielgens gegenüber dem Referenzgen im Tumor gegenüber Normal (Abb. 22).

2.2.8.1 Real-time PCR-Methode zur Untersuchung der Genkopienzahl

Zur Charakterisierung der Amplifikationseinheit auf Chromosom 3q25-q26 wurde eine neue *real-time* PCR-Methode entwickelt, die zum Nachweis von Genkopienzahlveränderungen am Beispiel der Gene *NKX3.1* (8p21) und *MYC* (8q24) etabliert und validiert wurde (Kindich et al. 2005, 2006). Dabei handelt es sich um eine *real-time* PCR-Methode zur relativen Quantifizierung von Genkopien deren Berechnungen auf eine Modifikation der $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Delta-Delta-CT) Methode basiert (Livak und Schmittgen 2001).

Die $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Delta-Delta-CT) Methode stellt eine relative Quantifizierungsmethode dar, die zur Untersuchung von Gentranskripten (RNA) und Genkopien (DNA) geeignet ist. Die relative Expression eines Zielgens in der zu untersuchenden Probe (Tumor) wurde im Verhältnis zu einem Kontrollgewebe (Blut) gebracht und auf ein Referenzgen (Haushaltsgen) normalisiert (Livak und Schmittgen 2001). Expressionsunterschiede beider Gene wurden in Form einer Ratio dargestellt und über die Delta-Delta-CT-Methode berechnet. Entsprechend unterschiedlicher Nomenklaturen ist der CT-Wert (cycle threshold, ABI) dem CP-Wert (cycle point, LightCycler) gleich und stellt den Fluoreszenzwert dar, der über den Hintergrund hinaus gemessen werden kann (Kapitel 2.2.6.4). Während das eine Delta (Δ_1) die Abweichung der CP-Werte eines Zielgens zum Referenzgen beschreibt, ist das zweite Delta (Δ_2) die Abweichung der CP-Werte der beiden Gene in der Probe (Tumor) gegenüber der Kontrolle (Blut).

$$\Delta CP = CP_{Zielgen} - CP_{Referenzgen}$$

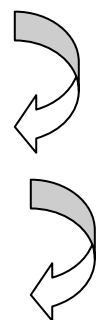
Gleichung 1: Berechnung von ΔCP

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP_{Probe} - \Delta CP_{Kontrolle}$$

Gleichung 2: Berechnung von $\Delta\Delta CP$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Gleichung 3: Berechnung der Ratio; Quelle: Pfaffl; BIOSpektrum-1/04-10.Jahrgang



Das Ergebnis der Methode ist eine relative Genkopienzahl, die in Form einer Ratio dargestellt und wird als x-fache Amplifikation (DNA) eines Zielgens gegenüber einem Referenzgen bezeichnet wird (Gleichung 3). Zur Berechnung der Genkopienzahl wurde die Ratio mit dem Faktor 2 (Ratio x 2) multipliziert (Gleichung 6). Dabei geht man davon aus, dass ein Normalgewebe (Blut) diploid ist und 2 Kopien des untersuchten Gens enthält (Abb. 22).

$$\text{Ratio} \times 2 = \text{Genkopienzahl}$$

Gleichung 6: Formel zur Berechnung der Genkopienzahl

Die $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Delta-Delta-CT) Methode ist eine Methode ohne Effizienzkorrektur, in der für alle untersuchten Proben eine Verdopplung der DNA-Menge ($E=2$) in jedem Zyklus vorausgesetzt wird und die PCR-Effizienz nur einem theoretischen Wert entspricht.

Im Gegensatz zur Delta-Delta-CT-Methode wurde in dieser Arbeit eine effizienz-korrigierte Berechnung der PCR-Daten ($E \neq 2$) durchgeführt, in der die optimale Effizienz des Zielgens und des Referenzgens in jedem PCR-Lauf einzeln bestimmt wurde. Die Bestimmung der PCR-Effizienz erfolgte dabei über PCR-Lauf-interne Standardkurven, die aus DNA einer Standard-Probe (COLO320DM oder DU145MN1) über 3 Verdünnungsstufen (1:10) in jedem PCR-Lauf generiert wurden. Die Ratio der untersuchten Gene wurde aus den optimalen *real-time* PCR-Effizienzen und den CT-Wert-Abweichungen des Zielgens zum Referenzgen in der zu untersuchenden Probe gegenüber einer Kontrolle bestimmt.

Zur Bestimmung von Genkopienzahl-Veränderungen wurden in dieser Arbeit zwei Gleichungen benutzt. Die Bestimmung der Genkopienzahl und Ratio der Gene *NKX3.1* und *MYC* wurden mit der Gleichung 4 (Kindich et al. 2006), die Bestimmung der Genkopienzahl der Gene innerhalb der Amplifikationseinheit 3q25-q26 mit der Gleichung 5 (Pfaffl et al. 2001) durchgeführt.

$$\text{Ratio} = E^{-[(CP_{Ziel} - CP_{Ref})_{Probe} - (CP_{Ziel} - CP_{Ref})_{Kontrolle}]}$$

$$E = (E_{Ziel} + E_{Ref}) / 2$$

Gleichung 4: Formel zur Berechnung der Ratio der Gene *NKX3.1* und *MYC*

$$\text{Ratio} = \frac{E_{Ziel}^{\Delta CP_{Ziel}(Kontrolle-Probe)}}{E_{Ref}^{\Delta CP_{Ref}(Kontrolle-Probe)}}$$

Gleichung 5: Formel zur Berechnung der Ratio der Gene innerhalb der Amplifikationseinheit 3q25-q26

2.2.8.2 *Real-time* RT-PCR-Methode zur Untersuchung der Genexpression

Die Bestimmung der Expression der untersuchten Gene innerhalb der Amplifikations-einheit auf Chromosom 3q25-q26 wurde mit dem LightCycler-System (Roche) und der relativen Quantifizierungs-Software *RelQuant* Version 1.01 (Roche) durchgeführt.

Dabei handelt es sich um eine *real-time* PCR-Methode deren Berechnungen auf eine effizienzkorrigierte calibrator-normalisierte Methode basiert, wobei die Ratio der Expression eines Zielgens/Referenzgen in den untersuchten Proben im Verhältnis zur Ratio der Expression eines Zielgens/Referenzgen eines Calibrators gesetzt wird, der aus cDNA der Zelllinie DU145MN1 generiert wurde. Der Calibrator wurde verwendet um Lauf zu Lauf-Variationen zwischen den PCR-Läufen zu minimieren.

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz wurden für jedes Gen PCR-Lauf-externe Standardkurven aus jeweils drei-fünf 1:10 Verdünnungen der Standard-cDNA (DU145MN1) generiert. Die zur Untersuchung der Genexpression verwendeten Primerpaare wurden in Kapitel 2.18 dargestellt.

Die calibrator-normalisierte Ratio (Norm. Ratio) der Zielgene zum Referenzgen wurden für die jeweils untersuchten Proben und den Calibrator nach Gleichung 7 und 8 (Technical Note No. LC 13/2001, Roche) berechnet:

$$Norm.Ratio = E_{Ziel}^{CP_{Ziel}(Calibrator) - CP_{Ziel}(Probe)} \times E_{Ref}^{CP_{Ref}(Probe) - CP_{Ref}(Calibrator)}$$

Gleichung 7: Formel zur Berechnung der normalisierten Ratio

$$Norm.Ratio = \frac{E_{Ziel}^{\Delta CP_{Ziel}(Calibrator - Probe)}}{E_{Ref}^{\Delta CP_{Ref}(Calibrator - Probe)}}$$

Gleichung 8: Formel zur Berechnung der normalisierten Ratio



2.3 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software SPSS Version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Abhängig von der Art der untersuchten Variablen wurden unterschiedliche statistische Tests durchgeführt.

Der Vergleich von Proben mit kontinuierlichen Variablen z.B. *NKX3.1/MYC*-Ratio gegen nominalen Daten z.B. Tumorstadium (pT2 gegen pT3/4; Gleasonsumme (<7 gegen ≥ 7), *MYC*-Gewinn ja/nein) die als Variablen nicht der gaußschen Normalverteilung entsprachen, wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test und der Shapiro-Wilk-Methode durchgeführt.

Für alle Variablen mit normaler gaußschen Verteilung wurde der students-T-test durchgeführt. Die Bestimmung der nominalen Daten erfolgte mit dem Fischer-Test. Log-rank-Tests wurden als ein statistischer Hypothesen-Test durchgeführt, der zum Vergleich der Zeit zur Progression nach Operation zwischen Tumorgruppen mit einer *TLOCI*-Genamplifikation und solchen ohne Genamplifikation diente.

Alle p-Werte basieren auf einen zweiseitigen Test. Der Grenzwert zur Erlangung einer statistischen Signifikanz wurde entsprechend dem Alpha-Wert $\leq 0,05$ gesetzt, der einer 95,95%-igen Übereinstimmung entspricht.

3 Ergebnisse

Zur Charakterisierung der Amplifikationseinheit auf Chromosom 3q25-q26 wurden auf dem LightCycler-System (Roche) zwei *real-time* PCR-Methoden durchgeführt (Kapitel 2.2.7): eine zur Bestimmung der Genkopienzahl und eine zur Quantifizierung der mRNA-Expression.

3.1 *Real-time* PCR-Methode zur Bestimmung der Genkopienzahl

3.1.1 Auswahl und Design der Primer

Auswahl und Design der Primer erfolgte mit Hilfe der Internet Datenbank: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und der Software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Die Primer-Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden so gewählt, dass sie Intron-Exon- bzw. Exon-Bereiche genspezifisch überspannen. Um eine Coamplifikation bekannter Pseudogene weitgehend auszuschließen, erfolgte anschließend ein Abgleich der ausgewählten Primer-Sequenzen mit dem menschlichen Genom durch den Software-Algorithmus Blast Nucleotide (BLASTN; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Die Primer-Sequenzen wurden durch die Firmen MWG Biotech AG (Martinsried) und Operon Biotechnologies GmbH (Köln) hergestellt.

3.1.2 PCR-Optimierung

Die Optimierung der PCR-Bedingungen zur Durchführung einer *real-time* PCR-Reaktion wurde entsprechend der Anleitung (Technical Note No. LC 9/2000, Roche) an unterschiedlichen Parametern durchgeführt. Neben der Primer-konzentration (0,5 μ M) wurde die optimale Primer-Annealing-Temperatur (T_m) und die Magnesiumchlorid-Konzentration ($MgCl_2$) bestimmt. Die Optimierung der Primer-Annealing-Temperatur erfolgte in 1-2°C Schritten ober- und unterhalb der errechneten Annealing-Temperatur. Die Optimierung der Magnesiumchlorid-Konzentration ($MgCl_2$) wurde abhängig von den jeweilig verwendeten Kits (*Fast-Start-DNA-Master-SYBR-Green-I-LightCycler-Kit*, Roche / *Quantitect-SYBR-Green-PCR-Kit*, Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers mit einer Magnesiumchlorid-Reihe (1-5 mM $MgCl_2$) durchgeführt. Die Auswahl des geeigneten Haushaltsgens erfolgte entsprechend den Bestimmungen zur Auswahl von Haushaltsgenen (Technical Note No. LC 15/2002, Roche).

3.1.3 PCR-Bedingungen

Die *real-time* PCR zur Untersuchung der Kopienzahlen der Gene *NKX3.1* und *MYC* wurde mit dem *LightCycler-FastStart-DNA-Master-SYBR-Green-I-Kit* (Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers in Duplikaten mit 20 µl Reaktionsvolumen, 1x SYBR-Green-I-PCR-Puffer-Mix, 5 mM MgCl₂, 0,5 µM je Primer, 1x FastStart-Taq-DNA-Polymerase und 50 ng genomischer DNA durchgeführt (Tab. 11).

Tabelle 11: *Real-time* PCR-Bedingungen für den *LightCycler-FastStart-DNA-Master-SYBR-Green-I-Kit*

Schritte		Temp (°C)	Zeit (min/sek)	Zyklen
Denaturierung		95	10 min	36-40
PCR	Denaturierung	95	15 sek	
	Annealing	T _m *	5 sek	
	Synthese	72	20 sek	
Schmelzkurvenanalyse (kont. Fluoreszenzmessung)		T _m (+10) - 99	15 sek 0,1°C/sek	

T_m*= Annealingtemp. (°C) der Gene *GAPDH* (59), *NKX3.1* (68), *MYC* (59), *TOP2B* (60), *AR* (58)

Die *real-time* PCR zur Untersuchung der Kopienzahlen der Gene *IL12A*, *MDS1*, *hTERC*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA* und *SOX2* innerhalb der Amplifikationsregion 3q25-q26 wurde mit dem *QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Kit* entsprechend den Angaben des Herstellers in einem 20 µl Reaktionsansatz mit 1x SYBR-Green-I-PCR-Puffer-Mix, 3-5 mM MgCl₂, 0,5 µM Primer und 25 ng genomischer DNA durchgeführt (Tab. 12).

Tabelle 12: *Real-time* PCR-Bedingungen für den *QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Kit*

Schritte		Temp (°C)	Zeit (min/sek)	Zyklen
Denaturierung		95	15 min	40-50
PCR	Denaturierung	94	15 sek	
	Annealing	T _m *	20 sek	
	Synthese	72	15 sek	
Schmelzkurvenanalyse (kont. Fluoreszenzmessung)		T _m (+10) - 99	15 sek 0,1°C/sek	

T_m*= Annealingtemp. (°C) der Gene *GAPDH* (59), *TOP2B* (60), *IL12A* (68), *MDS1* (59), *hTERC* (57), *SAMD7* (57), *TLOC1* (57), *SKIL* (59), *SLC2A2* (58), *PIK3CA* (58), *SOX2* (60)

3.1.4 Beladungsschema

Die Beladung der Proben eines *real-time* PCR-Experiments erfolgte entsprechend der Tabelle 13. Da die Kapazität für die Beladung der Proben im LightCycler-Gerät 1.0 auf 32 Kapillaren/Lauf beschränkt ist und jeweils Duplikate von den jeweiligen Proben, Kontrollen und Standards durchgeführt wurden, konnten pro PCR-Lauf und Gen insgesamt 11 Proben untersucht werden. Referenz- und Zielgen wurden in unterschiedlichen PCR-Läufen an den jeweiligen optimalen PCR-Bedingungen durchgeführt (Kapitel 3.1.3).

Tabelle 13: Beladungsschema zur Durchführung eines *real-time* PCR-Experiments

Nr.	Probe	PCR-Lauf (Referenzgen*/ Zielgen*)
1	Kontrolle (-)	Kontrolle
2		Replikate von Kontrolle
3	Probe 1	Probe 1
4		Replikate von Probe 1
5	Probe 2	Probe 2
6		Replikate von Probe 2
7	Probe 3	Probe 3
8		Replikate von Probe 3
9	Probe 4	Probe 4
10		Replikate von Probe 4
11	Probe 5	Probe 5
12		Replikate von Probe 5
13	Probe 6	Probe 6
14		Replikate von Probe 6
15	Probe 7	Probe 7
16		Replikate von Probe 7
17	Probe 8	Probe 8
18		Replikate von Probe 8
19	Probe 9	Tumor 9
20		Replikate von Probe 9
21	Probe 10	Tumor 10
22		Replikate von Probe 10
23	Probe 11	Probe 11
24		Replikate von Probe 11
25	Normal (Calibrator)	Normal
26		Replikate von Normal
27	Standard	Standard
28		Replikate von Standard
29	Standard 1:10	Standard 1:10
30		Replikate von Standard 1:10
31	Standard 1:100	Standard 1:100
32		Replikate von Standard 1:100

Referenzgen* = *GAPDH* / Zielgene* = *NKX3.1*; *MYC*; *TOP2B*; *IL12A*; *MDS1*; *hTERT*; *SAMD7*; *TLOC1*; *SKIL*; *SLC2A2*; *PIK3CA*; *SOX2*

3.1.5 Sensitivität

Mit der im Rahmen meiner Doktorarbeit etablierten PCR-Methode gelang die Unterscheidung einer von zwei Genkopien. Der Nachweis wurde am Beispiel des Androgenrezeptorgens (*AR*) auf Chromosom Xq12 an normalen Blutproben unterschiedlichen Geschlechtes durchgeführt (Abb. 23). Dabei wurde der Unterschied in den Genkopienzahlen für den Androgenrezeptor in normaler Leukozyten-DNA von gesunden männlichen (XY) gegenüber weiblichen (XX) Probanden untersucht und der Verlust eines Chromosomes X beim Mann im Verhältnis zum diploiden Chromosomensatz der Frau gegenübergestellt. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-6-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) auf Chromosom 12q verwendet. Als Kontrollgen zum Ausschluss von Aneusomien diente dabei das autosomale Gen Topoisomerase-2-Isoenzym-Beta (*TOP2B*) auf Chromosom 3p. Während nach Untersuchung der weiblichen und männlichen Blutproben für die Gene *GAPDH* und *TOP2B* keine Unterschiede festgestellt wurden (Abb. 23 A, B), konnte für das Androgenrezeptorgen (*AR*) ein mittlerer Unterschied von 1,23 PCR-Zyklen nachgewiesen werden (Abb. 23C). Dabei entspricht ein Unterschied von einem PCR-Zyklus ($\Delta CP=1$) einer Verdopplung des Genprodukts in der weiblichen gegenüber der männlichen Blutprobe.

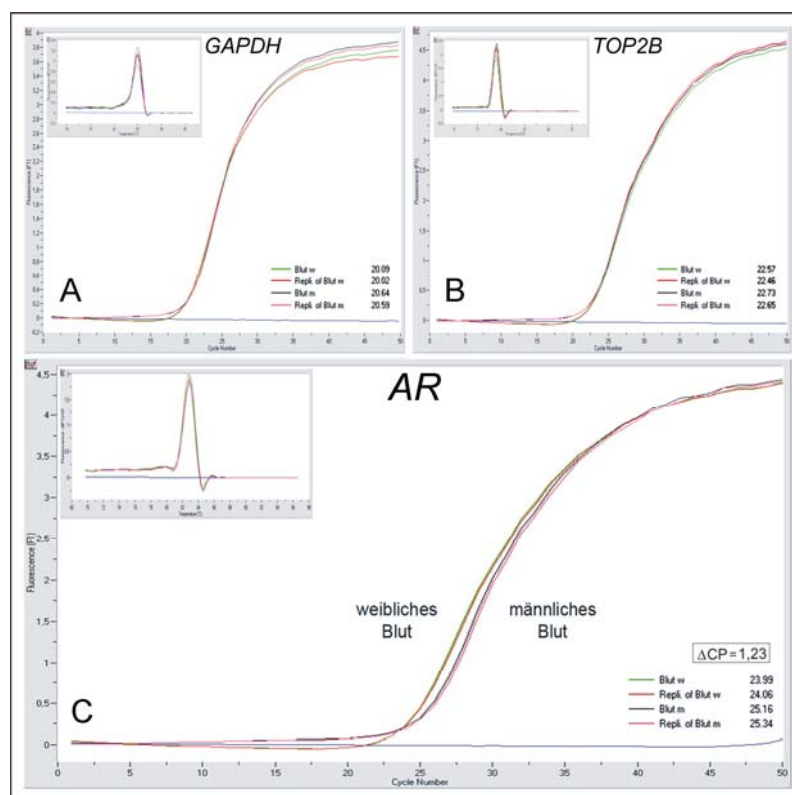


Abb. 23: Nachweis der Sensitivität der *real-time* PCR-Methode am Beispiel der Fluoreszenzkurven der Gene *GAPDH* (A), *TOP2B* (B) und *AR* (C) nach Doppelbestimmung einer männlichen und einer weiblichen Leukozyten-DNA-Probe

Die Bestimmung der Kopienzahlen der Gene *GAPDH*, *TOP2B* und *AR* wurde an Leukozyten-DNA von jeweils 4 gesunden männlichen und weiblichen Individuen durchgeführt (Tab. 14).

Tabelle 14: Darstellung der Kopienzahl der Gene *TOP2B*, *AR* und deren Ratio *AR/TOP2B*

Geschlecht	Probe	Kopienzahl		Ratio
		<i>TOP2B</i>	<i>AR</i>	<i>AR/TOP2B</i>
männlich	B1	2,07	1,00	0,48
	B2	2,00	1,08	0,54
	B3	2,45	1,26	0,51
	B4	1,97	1,40	0,71
Mw		2,12	1,18	0,56
Stw (±)		0,22	0,18	0,10
weiblich	B1	1,87	1,77	0,95
	B2	2,05	2,52	1,23
	B3	1,85	2,44	1,32
	B4	2,32	2,38	1,03
Mw		2,02	2,27	1,13
Stw (±)		0,22	0,34	0,17

Stw: Standardabweichung

Mw: Mittelwert

Die Untersuchungen ergeben einen Mittelwert und Standardabweichung der relativen Genkopienzahl von $1,18 \pm 0,18$ für männliche und $2,27 \pm 0,34$ für weibliche DNA. Für das autosomale Gen *TOP2B* auf Chromosom 3p konnte zwischen männlicher ($2,12 \pm 0,22$) und weiblicher DNA ($2,02 \pm 0,22$) kein Unterschied festgestellt werden. Die Ratio *AR/TOP2B* zeigt eine relative Genkopienzahl von $0,56 \pm 0,10$ Kopien für männliche DNA und $1,13 \pm 0,17$ Kopien für weibliche DNA. Die Kopienzahlen der Gene *TOP2B* und *AR* sowie deren Ratio wurden in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

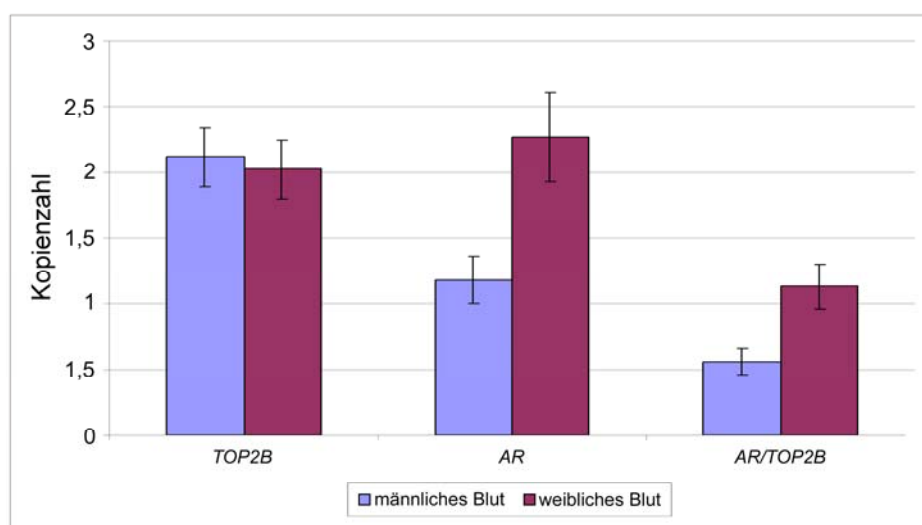


Abb. 24: Mittelwert und Standardabweichung der Genkopienzahlen der Gene *TOP2B*, *AR* sowie der Ratio *AR/TOP2B* in normalen männlichen und weiblichen Blut-Proben

3.1.6 Reproduzierbarkeit

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der *real-time* PCR-Methode wurden Experimente durchgeführt, die erstens die Reproduzierbarkeit der einzelnen Messwerte der Standard-DNA (COLO320DM) und zweitens die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der *real-time* PCR-Methode berücksichtigt haben.

Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Messwerte (CP-Werte) wurde am Beispiel der Gene *GAPDH*, *NKX3.1* und *MYC* durchgeführt. Unterschiede in den Messungen der CP-Werte ergaben sich einmal innerhalb eines PCR-Laufes (Intra-PCR-Lauf-Varianz) sowie zwischen den PCR-Läufen an jeweils unterschiedlichen Tagen (Inter-PCR-Lauf-Varianz). Die Intra- und Inter-PCR-Varianz der LightCycler-Läufe wurde mit DNA der Prostatakarzinomzelllinie COLO320DM und DNA der Blutprobe eines gesunden männlichen Probanden untersucht. Dabei wurde die Intra-PCR-Lauf-Varianz in fünf Wiederholungen innerhalb eines LightCycler-Laufs und die Inter-PCR-Lauf-Varianz in drei experimentellen Läufen bestimmt, die an 3 aufeinanderfolgenden Tagen mit drei unterschiedlichen Mastermixen durchgeführt wurden (Tab. 15).

Tabelle 15: CP-Werte der Standard-DNA (S) und Blut-DNA (B) am Beispiel der Gene *GAPDH*, *MYC* und *NKX3.1* bestimmt in 5-fach Messungen an jeweils 3 unterschiedlichen Tagen

Gen	Tag	Probe	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP Mw	Varianz (intra)	Var Mw	Varianz (inter)	Var Mw
<i>GAPDH</i>	1	S	20,1	20,65	20,67	20,54	20,85	20,56	0,08	0,07	S 0,08 B 0,11	0,09
		B	20,49	20,48	19,99	20,25	19,92	20,23	0,07			
	2	S	20,23	20,48	20,43	20,31	20,74	20,44	0,04			
		B	19,79	19,92	19,92	19,92	20,44	20,00	0,06			
	3	S	20,95	20,64	20,88	20,88	21,13	20,90	0,03			
		B	19,90	20,88	20,17	20,53	20,50	20,40	0,14			
<i>MYC</i>	1	S	15,81	16,35	17,13	16,57	16,34	16,44	0,23	0,09	S 0,11 B 0,09	0,10
		B	23,7	23,03	23,23	23,57	23,34	23,37	0,07			
	2	S	16,27	16,09	16,12	16,03	15,96	16,09	0,01			
		B	23,59	23,54	23,49	23,26	23,44	23,46	0,02			
	3	S	16,63	16,43	16,50	16,11	16,29	16,39	0,04			
		B	24,08	23,3	24,16	23,3	23,65	23,70	0,17			
<i>NKX3.1</i>	1	S	26,55	26,77	26,61	26,65	26,82	26,68	0,01	0,21	S 0,95 B 1,55	1,25
		B	28,34	27,81	27,48	27,49	27,22	27,67	0,19			
	2	S	24,98	25,16	26,49	26,86	25,43	25,78	0,70			
		B	26,11	25,82	25,16	25,32	24,79	25,44	0,28			
	3	S	27,71	27,75	27,79	28,2	27,52	27,79	0,06			
		B	27,91	28,04	28,24	28,01	27,95	28,03	0,02			
Mw									0,12		0,48	

S=COLO320DM / B=Blut

Die Intra-PCR-Lauf-Varianz der CP-Werte der DNA der Tumorzelllinie COLO320DM und der Blut-DNA beträgt über 3 Tage im Mittel für *GAPDH* 0,07 PCR-Zyklen, für *MYC* 0,09 PCR-Zyklen und für *NKX3.1* 0,21 PCR-Zyklen. Die Inter-PCR-Lauf-Varianz der CP-Werte der DNA der Tumorzelllinie COLO320DM und der Blut-DNA beträgt über 3 Tage im Mittel für *GAPDH* 0,10 PCR-Zyklen, für *MYC* 0,09 PCR-Zyklen und für *NKX3.1* 1,25 PCR-Zyklen.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde am Beispiel des Kontrollgens *TOP2B* durchgeführt. Dabei wurden Mittelwert (Mw) und Standardabweichung (1xStw) der Genkopienzahl der jeweils untersuchten Proben (Zelllinien, Tumorgewebe) zweier Experimente berechnet und tabellarisch dargestellt (Tab. 16). Die Standardabweichung vom Mittelwert der berechneten Genkopienzahlen zweier Experimente beträgt für die untersuchten Zelllinien und Tumorproben zwischen 0,01-0,56 Kopien.

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichung der Kopienzahlen zweier Experimente des Kontrollgens *TOP2B* in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien und Tumorgewebeproben

Typ	Gen	<i>TOP2B</i>			
	Proben	Exp 1	Exp 2	Mw	±Stw
Zelllinien	PC3-13	2,73	2,07	2,40	0,47
	PC3-16	1,96	2,31	2,14	0,25
	PC3-24	2,57	2,53	2,55	0,03
	DU145	2,35	1,76	2,06	0,42
	DU145MN1	2,12	1,63	1,88	0,35
Tumor	P 47	1,79	2,37	2,08	0,41
	P 51	1,66	2,05	1,86	0,28
	P 76	1,89	1,87	1,88	0,01
	P 91	1,81	1,66	1,74	0,11
	P 99	1,84	2,04	1,94	0,14
	P 109	2,17	2,43	2,30	0,18
	P 129	1,98	2,06	2,02	0,06
	P 133	1,84	2,40	2,12	0,40
	P 139	1,89	2,54	2,22	0,46
	P 143	2,07	2,50	2,29	0,30
	P 163	2,10	2,32	2,21	0,16
	P 165	2,16	2,31	2,24	0,11
	P 167	1,89	1,97	1,93	0,06
	P 169	1,83	2,31	2,07	0,34
	P 187	2,40	2,98	2,69	0,41
	P 201	2,81	2,32	2,57	0,35
	P 205	2,14	2,86	2,50	0,51
	P 207	2,20	2,31	2,26	0,08
	P 209	3,22	2,43	2,83	0,56
	P 211	2,43	2,69	2,56	0,18
P 213	2,10	2,77	2,44	0,47	
P 219	2,03	2,15	2,09	0,08	

3.1.7 PCR-Effizienz und Standardkurven

Die PCR-Effizienz (Kapitel 2.2.6.6) wurde aus PCR-Lauf-externe (Triplikate/Stufe) und PCR-Lauf-interne Standardkurven (Duplikate/Stufe) errechnet, die aus DNA der Zelllinie COLO320DM bzw. DU145MN1 für jedes Gen generiert wurde (Abb. 25). Während PCR-Lauf-externe Standardkurven (8 Stufen / 1:2 / 50-0,39 ng) einmal hergestellt wurden, um die Primer der einzelnen Gene über einen großen dynamischen Bereich zu untersuchen (Abb. 25A), wurden PCR-Lauf-interne Standardkurven (3 Stufen / 1:10 / 50-0,5 ng) generiert, um die PCR-Effizienz der untersuchten Gene in jedem PCR-Lauf zu bestimmen (Abb. 25B). Die Berechnung der PCR-Effizienz wurde entsprechend der Gleichung $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ (Rasmussen et al. 2001) durchgeführt. Am Beispiel der Gene *GAPDH*, *TOP2B* und *TLOC1* konnten ähnliche PCR-Effizienzen zwischen 1,93 und 2,02 bestimmt werden.

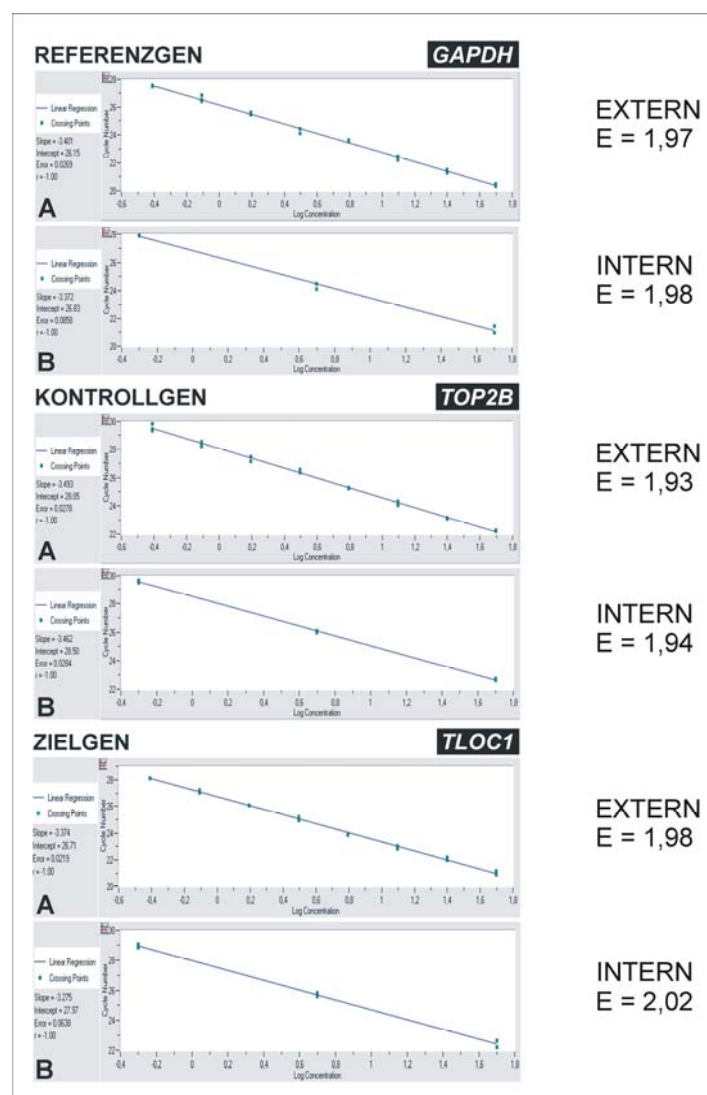


Abb. 25: PCR-Lauf-externe Standardkurven (A) und PCR-Lauf-interne Standardkurven (B) am Beispiel der Gene *GAPDH*, *TOP2B* und *TLOC1* generiert aus DNA der Prostatakarzinomzelllinie DU145MN1

3.1.8 Bestimmung der Grenzwerte

Um Genkopienzahl-Veränderungen in Prostatakarzinomzelllinien und nativen Prostatakarzinomproben zu bestimmen, wurden *real-time* PCR-Untersuchungen an normalen Leukozyten-DNA-Proben gesunder Probanden durchgeführt und Grenzwerte zur Festlegung von *cutoff*-Werten bestimmt.

Dabei wurde an 8 männlichen Leukozyten-DNA-Proben die Genkopienzahlen der Gene untersucht, die Mittelwerte (Mw) und die 2-fache Standardabweichung (2xStw) der Genkopienzahlen sowie deren Verhältnis (Ratio) zu *MYC* errechnet und die Grenzwerte für die jeweiligen Gene und dessen Ratio bestimmt (Kapitel 6.1).

Eine Übersicht der Daten zur Bestimmung der Grenzwerte der untersuchten Gene gibt Tabelle 17.

Tabelle 17: Grenzwerte der untersuchten Gene

Gene	Genkopienzahlen (Mw ± 2xSD)	Grenzen (cutoff-Werte)
<i>TOP2B</i>	2,06 ± 0,34	1,72 – 2,40
<i>IL12A</i>	2,16 ± 0,52	1,64 – 2,68
<i>MDS1</i>	2,19 ± 0,38	1,81 – 2,57
<i>hTERC</i>	1,88 ± 0,54	1,34 – 2,42
<i>SAMD7</i>	1,94 ± 0,42	1,52 – 2,36
<i>TLOC1</i>	2,00 ± 0,60	1,40 – 2,60
<i>SKIL</i>	2,50 ± 0,48	2,02 – 2,98
<i>SLC2A2</i>	1,92 ± 0,24	1,68 – 2,16
<i>PIK3CA</i>	2,08 ± 0,28	1,80 – 2,36
<i>SOX2</i>	1,88 ± 0,64	1,24 – 2,52
<i>NKX3.1</i>	2,10 ± 0,42	1,67 – 2,52
<i>MYC</i>	1,76 ± 0,27	1,49 – 2,03
<i>NKX3.1/MYC</i>	1,19 ± 0,21	0,98 – 1,41

3.2 *Real-time* RT-PCR-Methode zur Untersuchung der Genexpression

3.2.1 Auswahl und Design der Primer

Auswahl, Design und Synthese der Primer zur Untersuchung der Genexpression wurde durch die Firma TIBMOL-BIOL (Berlin) durchgeführt. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass sie jeweils am 3`-Ende der zu untersuchenden Gene Exon-Exon übergreifend liegen und nur RNA amplifizieren. Eine Coamplifikation von unerwünschten DNA-Sequenzen (Introns) konnte dadurch ausgeschlossen werden. Durch die Lokalisation der Primer am 3`-Ende des Gens konnte nach einer kontinuierlichen cDNA-Synthese mit Oligo_{dT}₁₂₋₁₈ Primern die Vollständigkeit des Genabschnitts gewährleistet werden.

Zur Durchführung einer calibrator-normalisierten Methode mit der *RelQuant*-Software (Roche) war es notwendig, Primer mit der gleichen Schmelztemperatur (60°C) zu designen, da Referenzgen und Zielgen zusammen in einem PCR-Lauf gemessen werden mussten. Aus jeweils 4 vordesignierten Primersequenzen wurden nach den Optimierungsversuchen die jeweils zwei am besten geeigneten Primersequenzen ausgewählt und zur weiteren Untersuchung verwendet.

3.2.2 PCR-Optimierung

Die Optimierung der PCR-Bedingungen zur Durchführung einer *real-time* PCR-Reaktion wurde entsprechend der Anleitung (Technical Note No. LC 9/2000, Roche) an unterschiedlichen Parametern durchgeführt. Neben der Primer-konzentration (0,5 µM) und der Primer-Annealing-Temperatur (60°C) wurde die optimale Magnesiumchlorid-Konzentration (MgCl₂) der Primer bestimmt. Die Optimierung der Magnesiumchlorid-Konzentration wurde entsprechend der Anleitung des *QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Kits* (Qiagen) mit einer Magnesiumchlorid-Reihe (2-5 mM MgCl₂) durchgeführt.

Versuche zur Auswahl eines geeigneten Referenzgens wurden an den Haushaltsgenen Beta-2-Mikroglobulin (*B2M*), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*G6PDH*) und Phosphobilinogen-Deaminase (*PBGD*) entsprechend den Bestimmungen zur Auswahl von Haushaltsgenen (Technical Note No. LC 15/2002, Roche) durchgeführt (Abb. 26).

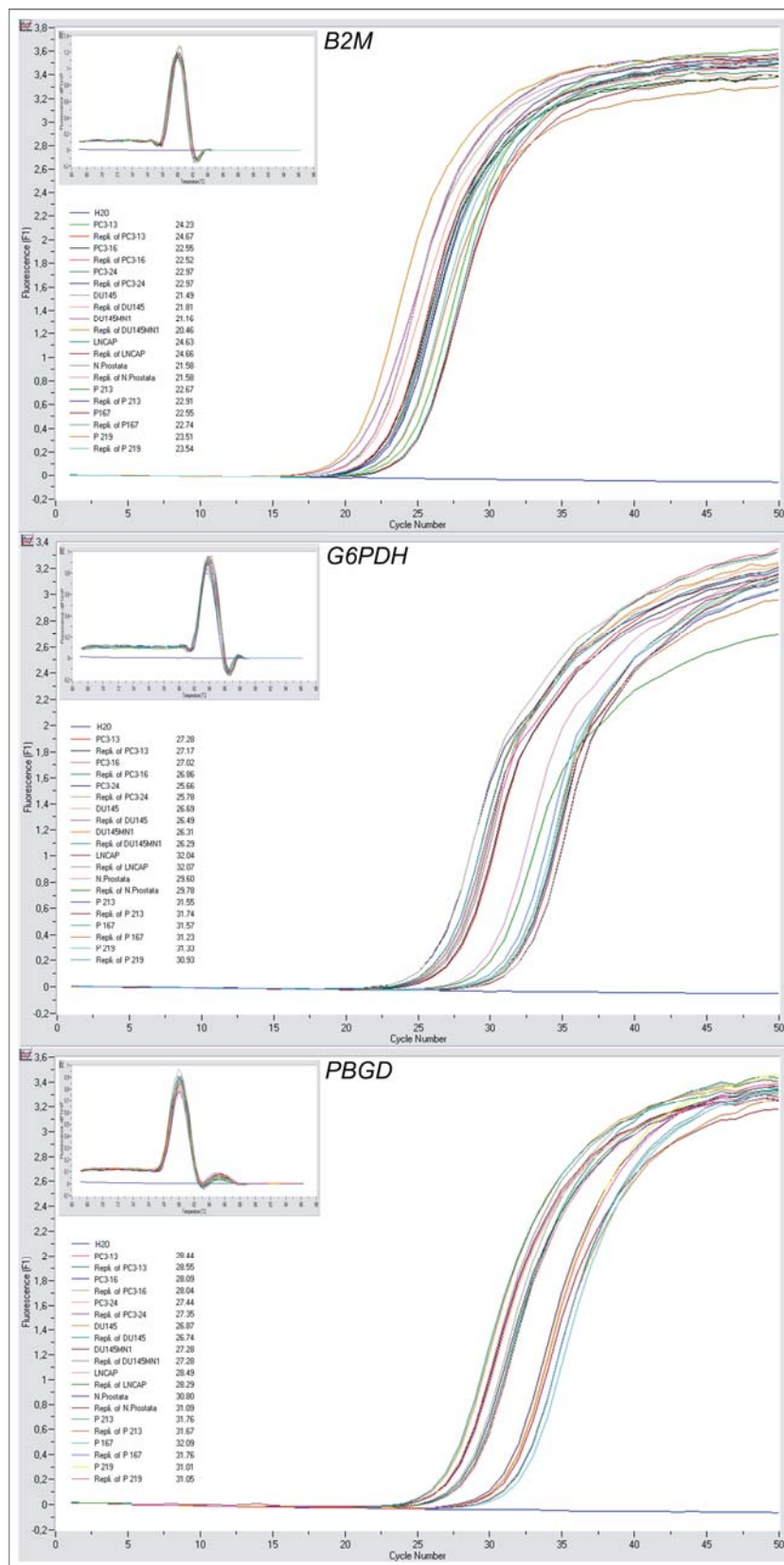


Abb. 26: Fluoreszenz- und Schmelzkurven der Gene *B2M*, *G6PDH* und *PBGD* zur Bestimmung eines Referenzgens für die *real-time* PCR-Untersuchung der Genexpression auf Chromosom 3q25-q26.

Die Versuche wurden an den Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145, DU145MN1 und LNCaP sowie an normalem Prostatagewebe und drei Prostatakarzinomproben unterschiedlichen Tumorstadiums (pT2-pT4) durchgeführt.

Die Auswahl des geeignetsten Haushaltsgens richtete sich dabei nach der Expressionshöhe sowie dem Mittelwert und der Standardabweichung (1xStw) der Messwerte (CP-Werte) aus allen untersuchten Proben. Das Gen mit dem niedrigsten CP-Wert und der kleinsten Standardabweichung innerhalb der untersuchten Proben wurde als Referenzgen für die weiteren Expressionsuntersuchungen herangezogen. Der Mittelwert der Doppelbestimmungen der Messwerte (CP-Mittelwert) der untersuchten Gene zur Bestimmung der Expressionshöhe und Standardabweichung wurde in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Darstellung der Messwerte (CP-Mittelwert) der Haushaltsgene *B2M*, *G6PDH* und *PBGD*

Proben	Gene		
	<i>B2M</i>	<i>G6PDH</i>	<i>PBGD</i>
PC3-13	24,45	27,23	28,50
PC3-16	22,54	26,94	28,07
PC3-24	22,97	25,72	27,40
DU145	21,65	26,59	26,81
DU145MN1	20,81	26,30	27,28
LNCaP	24,65	32,06	28,39
Norm.Prostata	21,58	29,69	30,95
P 213 (pT 2)	22,79	31,65	31,72
P 167 (pT 3)	22,65	31,40	31,93
P 219 (pT 4)	23,53	31,13	31,03
Mw	22,76	28,87	29,20
Stw(1x)	±1,23	±2,54	±1,98

Anhand dieser Untersuchungen konnte das Haushaltsgen *B2M* mit den insgesamt niedrigeren CP-Werten (20,81-24,65) als optimales Haushaltsgen bestimmt werden. Die Prostatakarzinomzelllinie DU145MN1 wurde mit einem CP-Wert von 20,81 als optimale Zelllinie zur Erstellung der Standardkurven (Kapitel 3.2.5) gewählt.

3.2.3 PCR-Bedingungen

Die Bestimmung der Expression der Gene zur Charakterisierung der Amplifikations-einheit 3q25-q26 wurde mit dem *QuantiTect-SYBR-Green-I-Kit* (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden in Duplikaten von jeweils 20 µl Reaktionsvolumen mit 10 µl *QuantiTect-SYBR-Green-I-PCR-Mix* (2x), 2-5 mM MgCl₂, 0,5 µM Primer und 2 µl cDNA (1:20) durchgeführt. Die Calibrator-RNA wurde nach reverser Transkription entsprechend 1:50 verdünnt. Die *real-time* PCR-Bedingungen sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: *Real-time* PCR-Bedingungen zur Bestimmung der Genexpression

Schritte		Temp (°C)	Zeit (min/sek)	Zyklen
Denaturierung		95	15 min	40-50
PCR	Denaturierung	94	15 sek	
	Annealing	60*	20 sek	
	Synthese	72	15 sek	
Schmelzkurvenanalyse (kont. Fluoreszenzmessung)		70-99	15 sek 0,1°C/sek	

60* = Annealingtemperatur (°C) der Gene *B2M*, *G6PDH*, *PBGD*, *hTERC*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA*

3.2.4 Beladungsschema

Die Beladung der Proben eines *real-time* RT-PCR-Experiments erfolgte entsprechend Tabelle 20. Da die Kapazität für die Beladung der Proben im LightCycler-Gerät 1.0 auf 32 Kapillaren/Lauf beschränkt ist und jeweils Duplikate von den jeweiligen Kontrollen, Calibrator und Proben durchgeführt wurden, konnten pro PCR-Lauf und Gen insgesamt 6 Proben untersucht werden. Referenzgen und Zielgen wurden im gleichen PCR-Lauf an den jeweiligen optimalen PCR-Bedingungen (Kapitel 3.2.3) untersucht.

Tabelle 20: Beladungsschema zur Durchführung eines *real-time* RT-PCR-Experiments

Nr.	Probe	PCR-Lauf
1	Kontrolle (-)	Kontrolle Zielgen
2		Replikat von Kontrolle Zielgen
3		Kontrolle Referenzgen
4		Replikat von Kontrolle Referenzgen
5	Calibrator	Calibrator Zielgen
6		Replikat von Calibrator Zielgen
7		Calibrator Referenzgen
8		Replikat von Calibrator Referenzgen
9	Probe 1	Probe 1 Zielgen
10		Replikat von Probe 1 Zielgen
11		Probe 1 Referenzgen
12		Replikat von Probe 1 Referenzgen
13	Probe 2	Probe 2 Zielgen
14		Replikat von Probe 2 Zielgen
15		Probe 2 Referenzgen
16		Replikat von Probe 2 Referenzgen
17	Probe 3	Probe 3 Zielgen
18		Replikat von Probe 3 Zielgen
19		Probe 3 Referenzgen
20		Replikat von Probe 3 Referenzgen
21	Probe 4	Tumor 4 Zielgen
22		Replikat von Probe 4 Zielgen
23		Tumor 4 Referenzgen
24		Replikat von Probe 4 Referenzgen
25	Probe 5	Probe 5 Zielgen
26		Replikat von Probe 5 Zielgen
27		Probe 5 Referenzgen
28		Replikat von Probe 5 Referenzgen
29	Probe 6	Probe 6 Zielgen
30		Replikat von Probe 6 Zielgen
31		Probe 6 Referenzgen
32		Replikat von Probe 6 Referenzgen

Referenzgen = *B2M*

Zielgen = *hTERC, SAMD7, TLOC1, SKIL, SLC2A2, PIK3CA*

3.2.5 PCR-Effizienz, Standardkurven und Coefficient-File

Die PCR-Effizienz (Kapitel 2.2.6.6) zur Berechnung der *real-time* RT-PCR-Ergebnisse wurde aus PCR-Lauf-externen Standardkurven (Triplikate/Stufe) bestimmt, die aus DNA der Prostatakarzinomzelllinie DU145MN1 für jedes einzelne Gen generiert wurde. Die PCR-Lauf-externen Standardkurven wurden für das Referenzgen (*B2M*) und die jeweiligen Zielgene (*hTERC*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA*) aus 3-4 Verdünnungsstufen (1:10) hergestellt.

Die Auswertung der *real-time* RT-PCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe der Software RelQuant 1.0 (Roche) durchgeführt, nachdem die Daten (CP-Werte) der einzelnen Experimente und Standardkurven für jedes Gen in das Programm importiert (LCDA-Datei) und in Form einer Koeffizienten-Datei abgespeichert wurden (Abb. 27).

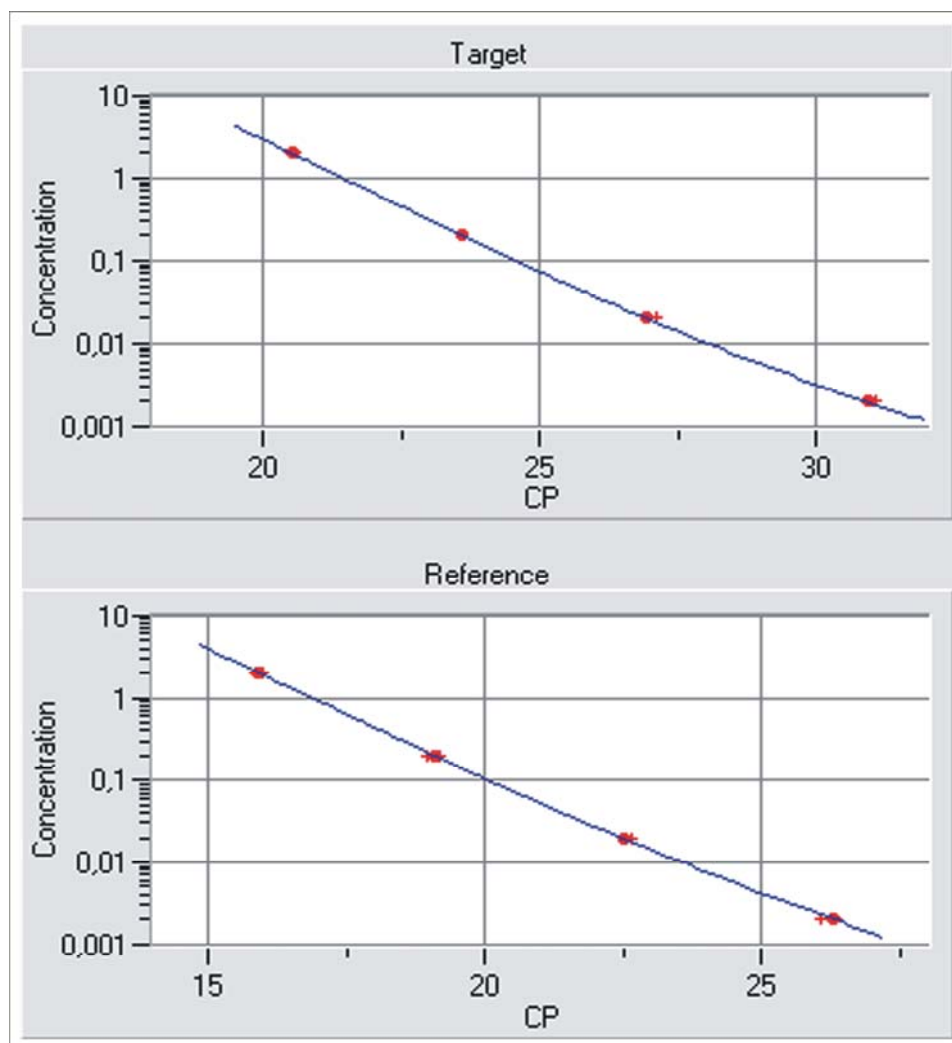


Abb. 27: Standardkurven der Gene *TLOC1* (Target) und *B2M* (Reference)

3.2.6 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zur Bestimmung der Genexpression wurde am Beispiel des Zielgens *TLOC1* an den Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145, DU145MN1 und LNCaP sowie an nativen Prostatakarzinomproben dargestellt. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden der Mittelwert (Mw) und die Standardabweichung (1xStw) der calibrator-normalisierten Ratio (Expression/Calibrator) der untersuchten Proben (Zelllinien und Tumorgewebe) zweier Experimente berechnet (Tab. 21).

Tabelle 21: Darstellung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der *TLOC1*-Expression am Beispiel der Mittelwerte und Standardabweichung zweier *real-time* PCR-Experimente

Typ	Proben	<i>TLOC-Expression/Calibrator</i>			
		Exp 1	Exp 2	Mw	1xStw
Zelllinien	PC3-13	4,34	4,48	4,41	0,10
	PC3-16	1,88	1,70	1,79	0,13
	PC3-24	3,11	3,07	3,09	0,03
	DU145	2,39	2,33	2,36	0,04
	DU145MN1	1,58	0,91	1,25	0,47
Tumor	P 201	1,23	1,38	1,31	0,11
	P 209	3,34	4,05	3,70	0,50
	P213	0,86	0,89	0,88	0,02
	P 99	1,60	1,92	1,76	0,23
	P 129	1,04	1,47	1,26	0,30
	P 133	1,47	1,58	1,53	0,08
	P 139	1,50	1,56	1,53	0,04
	P 163	0,79	0,84	0,82	0,04
	P 167	0,80	0,88	0,84	0,06
	P 169	0,77	0,91	0,84	0,10
	P 187	1,22	0,98	1,10	0,17
	P 205	1,21	1,28	1,25	0,05
P 219	1,53	2,17	1,85	0,45	

Für *TLOC1* beträgt die Standardabweichung vom Mittelwert der berechneten Ratio zweier Experimente über die jeweils untersuchten Prostatakarzinomzelllinien und Prostatakarzinomproben zwischen 0,02-0,50-fache Genexpression gegenüber dem Calibrator.

3.3 Southern-Blot zur Untersuchung einer *MYC*-Amplifikation

Southernblot-Untersuchungen wurden durchgeführt, um eine Tumorzelllinie mit einer high-level *MYC*-Amplifikation zu finden, die für die quantitative *real-time* PCR-Untersuchungen zur Bestimmung der *MYC*-Genkopienzahl als Standard zur Erstellung von Standardkurven dienen sollte.

Der Nachweis der *MYC*-Amplifikation erfolgte im Southernblot nach Hybridisierung einer *MYC*- und *FraX*-spezifischen Gensonde an genomischer DNA der Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU-145, DU145MN1 sowie der Colonkarzinomzelllinie COLO320DM (Kapitel 2.2.4). Die *FraX*-Sonde diente dabei der Normalisierung der *MYC*-Amplifikation.

Die Auswertung der Daten erfolgte semiquantitativ mit dem Densitometer (Personal Dynamics, Roche). Die Intensitäten der einzelnen Banden wurden bestimmt, nachdem der Hintergrund abgezogen wurde. Die Normalisierung der einzelnen *MYC*-Banden erfolgte an den jeweiligen *FraX*-Banden durch Bildung der Ratio *MYC/FraX*.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Gene *MYC* und *FraX* sind in der Abbildung 28 dargestellt. Für die untersuchten Prostatakarzinomzelllinien konnte eine Ratio der Gene *MYC/FraX* zwischen 1,06 für PC3-24 und 5,14 für COLO320DM nachgewiesen werden. Die Prostatakarzinomzelllinie COLO320DM wurde als Standard für die *real-time* PCR-Untersuchung ausgesucht, weil sie unter den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien die höchste *MYC*-Amplifikation zeigte.

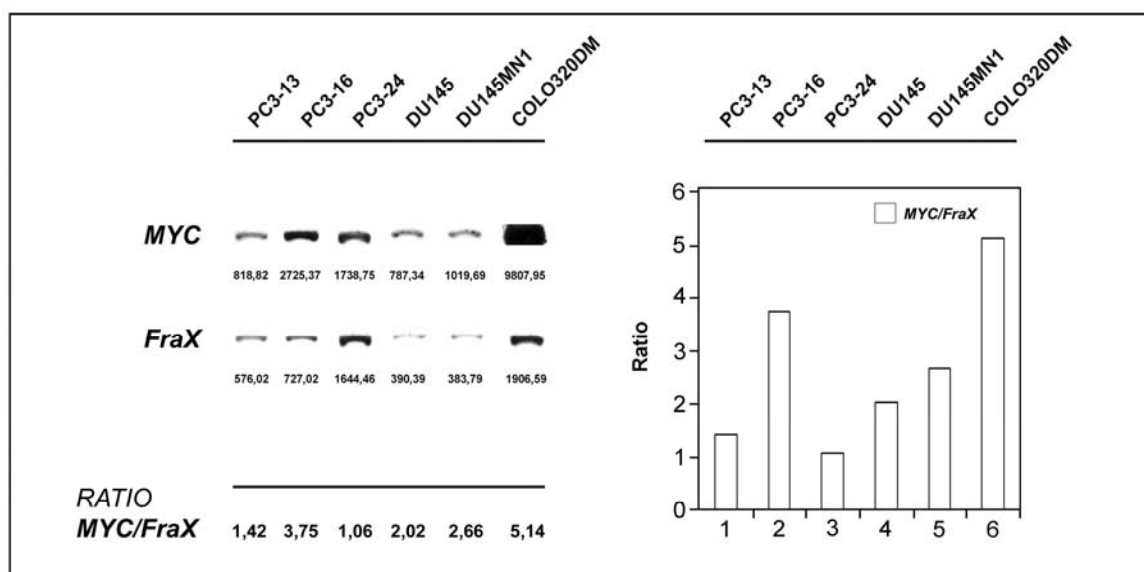


Abb. 28: Southernblot-Untersuchung der Gene *MYC* und *FraX* an Prostatakarzinom- (PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145, DU145MN1) und Colonkarzinom- (COLO320DM) Zelllinien mit densitometrischer Auswertung der Intensitäten der DNA-Banden und Darstellung der Ratio *MYC/FraX*.

3.4 *Real-time* PCR zur Untersuchung einer MYC-Amplifikation

Die *real-time* PCR-Untersuchung der *MYC*-Kopienzahl wurde an den Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145 und DU145MN1 durchgeführt. Die Ergebnisse der *real-time* PCR-Untersuchung wurden mit den Ergebnissen der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) verglichen, die entsprechend den Bedingungen von Lensch und Mitarbeiter (2002) mit einer *MYC*-spezifischen Gen-Sonde durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der beiden Methoden sind in Tabelle 22 und Abbildung 29 dargestellt.

Tabelle 22: Vergleich der FISH-Untersuchungen mit den Ergebnissen der *real-time* PCR

Probe	<i>MYC</i>	
	FISH (Signale)	<i>Real-time</i> PCR (Genkopien)
PC3-13	4,2	4,4
PC3-16	Cluster*	24,0
PC3-24	8,8	4,8
DU145	3,9	3,8
DU145MN1	4,0	3,5

Cluster* = Gruppe an überlagerten FISH-Signalen

Mit Hilfe der *real-time* PCR-Methode konnten in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien eine *MYC*-Kopienzahl zwischen 3,5 – 24 Genkopien nachgewiesen werden. FISH-Untersuchungen haben für die Zelllinien PC3-13, PC3-24, DU145 und DU145MN1 3,9-8,8 Signale ergeben, wobei in der Prostatakarzinomzelllinie PC3-16 ein Cluster an *MYC*-Signalen nachgewiesen werden konnte (Abb. 29). Bis auf die Prostatakarzinomzelllinie PC3-24 konnten mit der *real-time* PCR-Methode weitgehend übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Die Ergebnisse der FISH-Untersuchung durch Lensch und Mitarbeiter (2002) konnten bestätigt und das Cluster an *MYC*-Signalen in der Prostatakarzinomzelllinie PC3-16 auf 24 Genkopien bestimmt werden.

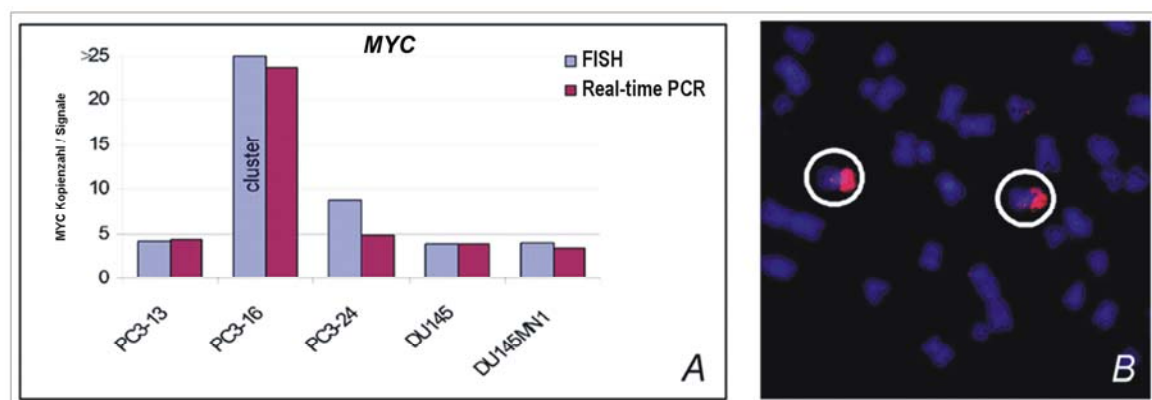


Abb. 29: Vergleich der *real-time* PCR-Ergebnisse mit den FISH-Ergebnissen (A) und Darstellung der *MYC*-Signale (Cluster) am Beispiel einer Metaphase der Zelllinie PC3-16 (B); Quelle: Lensch et al. 2002

3.5 *Real-time* PCR-Untersuchungen der Gene *NKX3.1* und *MYC*

Untersuchungen zur Bestimmung der Kopienzahlen der Gene *NKX3.1* und *MYC* sowie deren Ratio *NKX3.1/MYC* wurden mit Hilfe der *real-time* PCR-Methode (Kapitel 3.1) an insgesamt 63 nativen Prostatakarzinomproben durchgeführt.

Die Ergebnisse der untersuchten Prostatakarzinomproben sind zusammen mit histopathologischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) und klinischen (DRU, PSA) Parametern tabellarisch dargestellt (Tab. 23). Die Kopiezahlen der Gene *NKX3.1* und *MYC* sowie deren Ratio *NKX3.1/MYC* wurden graphisch dargestellt (Abb. 30). Die Einteilung der Tumorproben erfolgte je nach Parameter in verschiedenen Gruppen.

Entsprechend der histopathologischen Einteilung der Prostatakarzinome nach dem Stadium der Tumorausbreitung (*staging*) wurden 22 (34,9%) Tumore als pT2, 38 (60,3%) Tumore als pT3 und 3 (4,8%) Tumore als pT4 eingestuft. Ein Tumor, der als pT4 eingestuft wurde, stammte aus einer Lymphknotenmetastase.

Entsprechend der histologischen Einteilung der Prostatakarzinome nach dem Grad der Differenzierung (*grading*) wurden 7 (11,1%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme <7, 27 (42,9%) Tumorproben gleich 7 und 19 (30,2%) Tumorproben einer Gleasonsumme >7 eingestuft.

Entsprechend dem klinischen Befund des prostata-spezifischen Antigens (PSA) konnten 57 (90,5%) Tumorproben mit einem PSA-Wert ≥ 4 und 6 (9,5%) Tumorproben mit einem PSA-Wert <4 eingestuft werden.

Entsprechend dem klinischen Befund der digital-rektalen Untersuchung (DRU) konnten 42 (66,7%) Tumorproben mit einem positiven DRU-Befund und 20 (31,7%) Tumorproben mit einem negativen DRU-Befund eingestuft werden.

Tabelle 23: Histopathologische, klinische und *real-time* PCR-Daten der untersuchten Prostatatumoren

Nr.	Proben	Tumor Stadium	Gleason	Gleason Summe	DRU	PSA	Genkopien		Ratio
		pT2 / pT3-4	1+2	n = <7 v = ≥7	neg = 0 pos = 1	n = <4 v = ≥4	NKX3.1 1,67-2,52	MYC 1,49-2,03	NKX/ MYC 0,98-1,41
1	P8	cT4	5+5	10	1	57,3	1,05	2,35	0,45
2	P10	3c	3+4	7	1	18,7	0,94	2,83	0,33
3	P14	2c	3+4	7	1	21,4	1,69	1,83	0,93
4	P26	3b	4+3	7	1	13,3	1,38	2,98	0,46
5	P28	3a	4+3	7	1	19,3	2,21	3,43	0,65
6	P36	3c	4+3	7	1	32,0	0,84	2,04	0,41
7	P42	3c	5+3	8	1	0,6	2,06	2,19	0,94
8	P43	3a	4+3	7	0	9,3	1,80	2,21	0,81
9	P44	2c	3+4	7	1	27,2	2,16	1,64	1,32
10	P47	3c	3+4	7	1	10,5	1,70	1,92	0,88
11	P49	3a	4+3	7	1	8,8	1,00	3,28	0,31
12	P51	2c	3+4	7	0	8,1	1,75	2,04	0,86
13	P52	3c	5+4	9	1	96,5	1,01	2,33	0,43
14	P65	3b	4+3	7	0	17,1	1,51	2,08	0,72
15	P74	3a	3+2	5	1	10,3	1,39	3,32	0,42
16	P80	3a	3+5	8	1	5,1	0,79	1,49	0,53
17	P85	3a	2+3	5	0	7,9	1,00	0,64	1,56
18	P87	3a	3+5	8	1	30,0	2,26	1,67	1,35
19	P91	3b	4+5	9	1	22,4	1,91	2,04	0,94
20	P97	3a	3+4	7	1	8,3	1,00	2,12	0,47
21	P99	2b	3+2	5	1	10,6	1,66	2,10	0,79
22	P107	3a	3+4	7	0	24,5	1,01	1,76	0,57
23	P109	3a	4+5	9	1	15,3	1,23	1,87	0,66
24	P117	3b	3+2	5	0	11,3	3,38	2,25	1,50
25	P119	3b	4+5	9	0	38,0	1,19	1,72	0,69
26	P123	2a	2+3	5	0	8,2	1,06	0,91	1,16
27	P133	2b	4+3	7	1	11,5	1,76	2,18	0,81
28	P135	2a	2+3	5	1	0,2	1,26	1,14	1,11
29	P137	2b	3+5	8	1	9,7	2,78	2,18	1,27
30	P139	3b	4+5	9	1	0,3	1,25	1,68	0,75
31	P141	2b	3+1	4	1	12,5	1,65	1,87	0,88
32	P143	3b	3+5	8	0	12,4	1,48	1,92	0,77
33	P145	4	4+3	7	0	39,1	1,60	1,59	1,01
34	P147	2b	3+2	5	1	4,9	2,82	2,57	1,10
35	P153	3a	3+2	5	1	11,8	1,89	1,73	1,09
36	P155	3a	2+3	5	1	13,8	1,51	1,76	0,86
37	P161	2b	3+2	5	0	9,9	1,51	1,65	0,92
38	P163	3a	3+2	5	0	7,8	0,93	2,70	0,34
39	P165	3a	4+3	7	1	9,8	1,15	2,52	0,46
40	P167	3a	4+5	9	1	38,4	2,58	3,35	0,77
41	P169	3a	3+4	7	1	12,6	0,96	2,12	0,45
42	P171	2b	3+2	5	1	23,9	1,68	1,55	1,08
43	P173	2b	3+4	7	-	12,9	1,98	1,62	1,22
44	P175	2b	5+3	8	1	13,8	1,67	1,47	1,14
45	P177	3c	5+4	9	1	0,1	1,40	2,68	0,52
46	P183	3a	4+2	6	0	21,0	1,64	2,26	0,72
47	P185	2b	3+2	5	0	6,2	2,26	2,09	1,08
48	P193	2b	3+5	8	1	10,2	2,05	2,25	0,91
49	P197	3b	5+3	8	1	7,2	2,32	2,25	1,03
50	P201	3a	4+4	8	0	10,7	1,98	2,45	0,81
51	P203	2a	3+4	7	1	19,0	2,93	2,43	1,21
52	P205	3a	4+3	7	0	17,0	2,63	2,12	1,24
53	P209	3a	4+3	7	1	1,2	1,54	2,61	0,59
54	P211	3b	5+4	9	1	9,3	2,97	2,95	1,01
55	P213	2a	4+3	7	1	4,4	1,24	2,08	0,60
56	P219	4	4+3	7	1	15,5	1,64	1,99	0,82
57	P223	2b	3+4	7	0	3,4	2,48	2,84	0,87
58	P225	3b	3+3	6	0	10,7	1,04	1,51	0,69
59	P230	2a	3+4	7	0	12,9	2,60	3,91	0,67
60	P236	3a	3+4	7	1	5,0	2,95	2,16	1,37
61	P238	2a	3+3	6	0	4,1	1,87	2,01	0,93
62	P243	2a	5+3	8	1	0,05	2,33	2,65	0,88
63	P247	3c	4+3	7	1	40,5	2,69	2,64	1,02

• Verlust / • Gewinn

n = normal

v = verändert

neg = negativ

pos = positiv

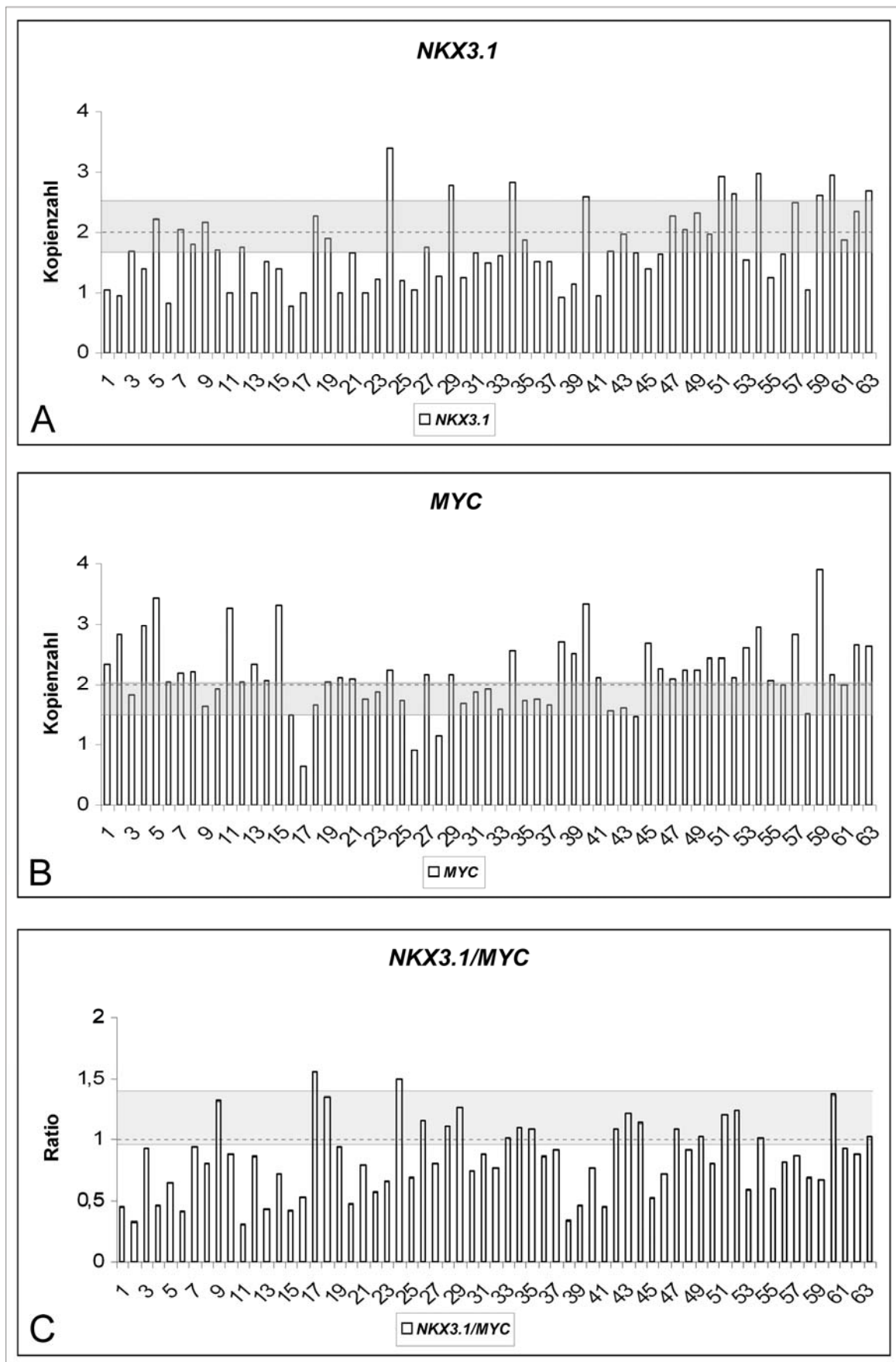


Abb. 30: Kopienzahlen der Gene *NKX3.1* (A), *MYC* (B) und der Ratio *NKX3.1/MYC* (C) nach *real-time* PCR-Untersuchung der Prostatakarzinomproben und Bestimmung der Grenzwerte. Die graue Zone stellt den normalen Grenzbereich (*cutoff*) dar.

Nach Bestimmung der Grenzwerte (Kapitel 3.1.8) wurden in den untersuchten Prostatakarzinomproben die Kopienzahlen der Gene *NKX3.1* und *MYC* sowie deren Ratio *NKX3.1/MYC* auf Gewinne und Verluste hin untersucht und tabellarisch (Tab. 24) sowie graphisch (Abb. 31) dargestellt.

Tabelle 24: Anzahl der Genkopienzahlveränderungen der Gene *NKX3.1*, *MYC* und Ratio *NKX3.1/MYC*

Gen/Ratio	<i>NKX3.1</i>			<i>MYC</i>			<i>NKX3.1/MYC</i>		
	↔	↑	↓	↔	↑	↓	↔	↑ [*]	↓ [#]
Proben n = 63	42 66,7%	10 15,9%	32 50,8%	43 68,3%	39 61,9%	4 6,4%	45 71,4%	2 3,2%	43 68,3%
Gen/Ratio:	↔ = verändert			↑ = gewonnen / erhöht [*]			↓ = verloren / vermindert [#]		

Das Gen *NKX3.1* war in 42 (66,7%) der untersuchten Prostatakarzinomproben verändert, wobei Gewinne in 10 (15,9%) Fällen und Verluste in 32 (50,8%) Fällen nachgewiesen werden konnten. Das *MYC* Gen war in 43 (68,3%) Prostatakarzinomproben verändert. Ein Gewinn von *MYC* konnte in 39 (61,9%) Fällen und ein Verlust in 4 (6,4%) Fällen nachgewiesen werden.

Für die Ratio *NKX3.1/MYC* konnten Veränderungen in 45 (71,4%) der untersuchten Prostatakarzinomproben nachgewiesen werden. Eine verminderte Ratio *NKX3.1/MYC* konnte in 43 (68,3%) Fällen und eine erhöhte Ratio in 2 (3,2%) Fällen festgestellt werden. Ein gleichzeitiger *NKX3.1*-Verlust und *MYC*-Gewinn konnte in 17 (27%) Fällen nachgewiesen werden (Tab. 23, farbig hinterlegt).

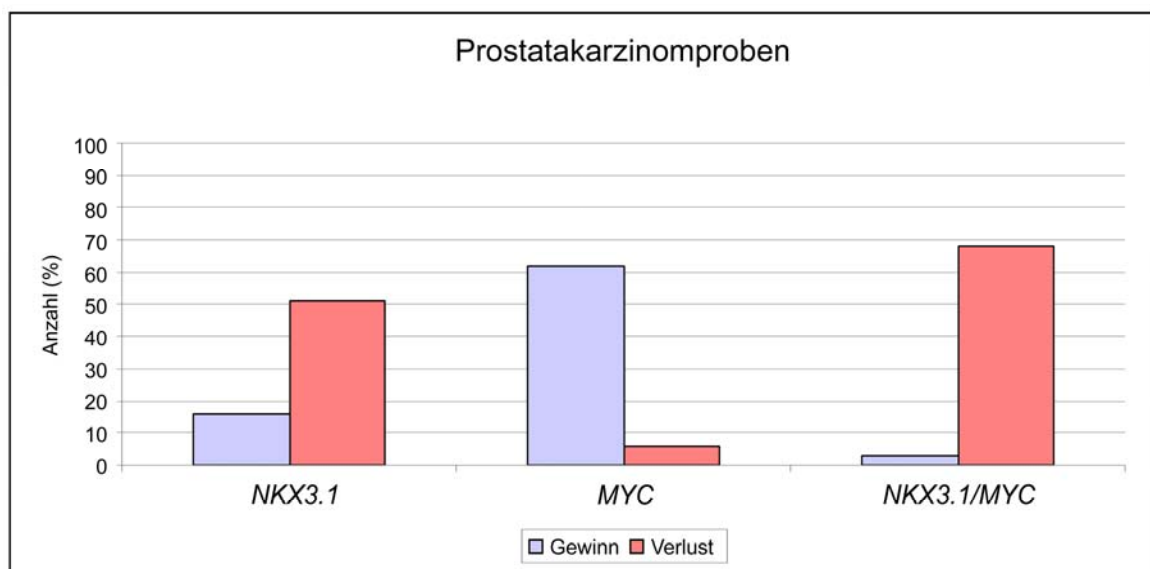


Abb. 31: Anzahl der untersuchten Prostatakarzinomproben (%) mit Kopienzahlveränderungen der Gene *NKX3.1* und *MYC* sowie der Ratio *NKX3.1/MYC*.

3.5.1 Korrelation der Daten mit klinischen Parametern

Die Korrelation der *real-time* PCR-Daten mit histopathologischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) und klinischen (DRU, PSA) Parametern (Tab. 25) wurde nach Bestimmung der Genkopienzahlveränderungen der Gene *NKX3.1*, *MYC* und deren Ratio *NKX3.1/MYC* für die untersuchten Prostatakarzinomproben durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Vergleich der *real-time* PCR-Ergebnisse mit histopathologischen und klinischen Parametern

Gen		<i>NKX3.1</i>	<i>MYC</i>	<i>NKX3.1/MYC</i>
Proben n = 63		↓	↑	↓ [#]
		32 50,8%	39 61,9%	43 68,3%
Tumorstadium	pT2	6 9,5%	12 19%	12 19%
	pT3/4	26 41,3%	27 42,9%	31 49,3%
Malignitätsgrad	<7	11 17,5%	7 11,1%	9 14,3%
	≥7	21 33,3%	32 50,8%	34 54%
DRU	-	11 17,5%	11 17,5%	14 22,2%
	+	21 33,3%	28 44,5%	29 46%
PSA	<4	4 6,3%	5 7,9%	6 9,5%
	≥4	28 44,5%	34 54%	37 58,7%

Gen:

↑ = gewonnen

↓ = verloren / vermindert[#]

3.5.2 Untersuchung der Tumorproben mit *NKX3.1*-Verlust

Nach Vergleich der Genkopienzahlen mit histopathologischen und klinischen Parametern konnte für das Tumorstadium (*staging*) ein Verlust von *NKX3.1* in 6 (9,5%) Tumoren mit einem pT2-Stadium und 26 (41,3%) Tumoren mit einem pT3/4-Stadium nachgewiesen werden (Abb. 32).

Für den Malignitätsgrad (*grading*) konnte ein Verlust von *NKX3.1* in 11 (17,5%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme <7 und 21 (33,3%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme ≥ 7 nachgewiesen werden (Abb. 32).

Nach Vergleich der Genkopienzahlen mit klinischen Parametern konnte für die digitale rektale Untersuchung (DRU) ein Verlust von *NKX3.1* in 11 (17,5%) DRU-negativen und 21 (33,3%) DRU-positiven Fällen nachgewiesen werden (Abb. 32).

Für das prostataspezifische Antigen (PSA) konnte ein Verlust von *NKX3.1* in 4 (6,3%) Tumorproben mit einem PSA-Wert <4 und in 28 (44,5%) Tumorproben mit einem PSA-Wert ≥ 4 nachgewiesen werden (Abb. 32).

Die statistische Auswertung der Prostatakarzinomproben mit einem *NKX3.1*-Verlust ergab zu den untersuchten Parametern folgende Werte:

Tumorstadium ($p=0,03$; pT2 gegen pT3/4), Malignitätsgrad ($p=0,62$; Gleasongrad <7 gegen ≥ 7), DRU-Befund ($p=0,97$; positiv gegen negativ) und PSA-Wert ($p=0,95$; <4 gegen ≥ 4).

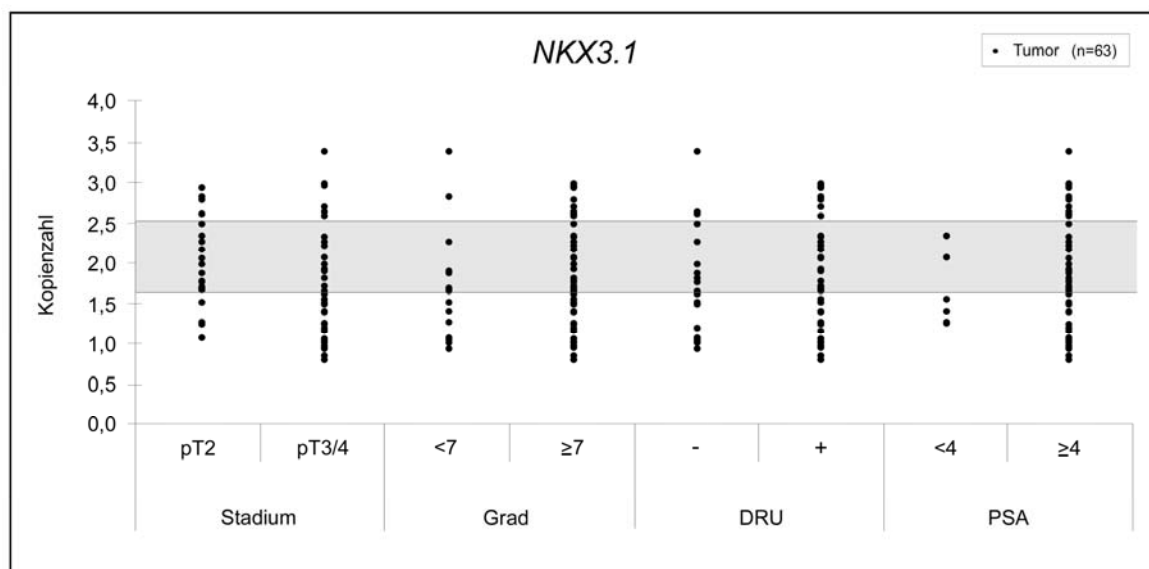


Abb. 32: Darstellung der Prostatakarzinomproben mit *NKX3.1*-Verlust im Vergleich zu histopathologischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) und klinischen (DRU-Befund, PSA-Wert) Parametern. Die graue Zone stellt den normalen Grenzbereich (*cutoff*) dar.

3.5.3 Untersuchung der Tumorproben mit *MYC*-Gewinn

Nach Vergleich der Genkopienzahl mit histopatologischen und klinischen Parametern konnte für das Tumorstadium (*staging*) ein Gewinn von *MYC* in 12 (19%) Tumoren mit einem pT2-Stadium und 27 (42,9%) Tumoren mit einem pT3/4-Stadium nachgewiesen werden (Abb. 33).

Für den Malignitätsgrad (*grading*) konnte ein Gewinn von *MYC* in 7 (11,1%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme <7 und 32 (50,8%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme ≥ 7 nachgewiesen werden (Abb. 33).

Nach Vergleich der Genkopienzahl mit klinischen Parametern konnte für die digitale rektale Untersuchung (DRU) ein Gewinn von *MYC* in 11 (17,5%) DRU-negativen und 28 (44,5%) DRU-positiven Fällen nachgewiesen werden (Abb. 33).

Für das prostataspezifische Antigen (PSA) konnte ein Gewinn von *MYC* in 5 (7,9%) Tumorproben mit einem PSA-Wert <4 und in 34 (54%) Tumorproben mit einem PSA-Wert ≥ 4 nachgewiesen werden (Abb. 33).

Die statistische Auswertung der Prostatakarzinomproben mit einem *MYC*-Gewinn ergab zu den untersuchten Parametern folgende Werte:

Tumorstadium ($p=0,15$; pT2 gegen pT3/4), Malignitätsgrad ($p=0,03$; Gleasongrad <7 gegen ≥ 7), DRU-Befund ($p=0,15$; positiv gegen negativ) und PSA-Wert ($p=0,38$; <4 gegen ≥ 4).

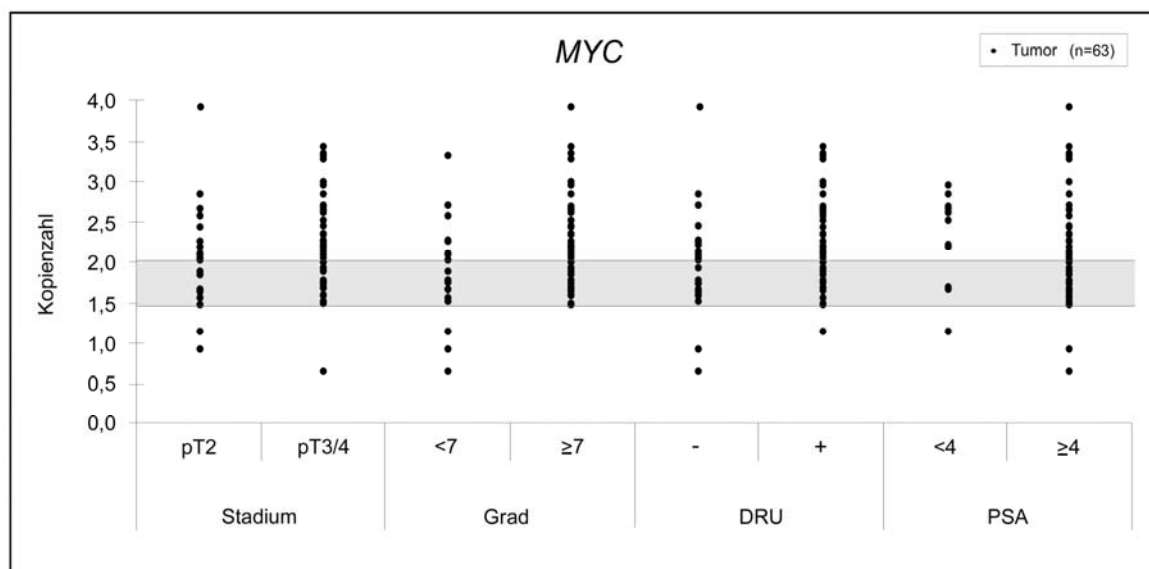


Abb. 33: Darstellung der Prostatakarzinomproben mit *MYC*-Gewinn im Vergleich zu histopathologischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) und klinischen (DRU-Befund, PSA-Wert) Parametern. Die graue Zone stellt den normalen Grenzbereich (*cutoff*) dar.

3.5.4 Untersuchung der Ratio *NKX3.1/MYC*

Nach Vergleich der Ratio der Genkopienzahlen *NKX3.1/MYC* mit histopathologischen Parametern konnte für das Tumorstadium (*staging*) eine verminderte Ratio in 12 (19%) Tumoren mit einem pT2-Stadium und 31 (49,3%) Tumoren mit einem pT3/4-Stadium nachgewiesen werden (Abb. 34).

Für den Malignitätsgrad (*grading*) konnte eine verminderte Ratio in 9 (14,3%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme <7 und 34 (54%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme ≥ 7 nachgewiesen werden (Abb. 34).

Nach Vergleich der Ratio der Genkopienzahlen *NKX3.1/MYC* mit klinischen Parametern konnte für die digitale rektale Untersuchung (DRU) eine verminderte Ratio in 14 (22,2%) DRU-negativen und 29 (46%) DRU-positiven Fällen nachgewiesen werden (Abb. 34).

Für das prostataspezifische Antigen (PSA) konnte eine verminderte Ratio in 6 (9,5%) Tumorproben mit einem PSA-Wert <4 und in 37 (58,7%) Tumorproben mit einem PSA-Wert ≥ 4 nachgewiesen werden (Abb. 34).

Der Vergleich der Ratio *NKX3.1/MYC* der Prostatakarzinomproben mit histopathologischen und klinischen Parametern ergab folgende statistische Werte:

Tumorstadium ($p=0,002$; pT2 gegen pT3/4), Malignitätsgrad ($p=0,09$; Gleasongrad <7 gegen ≥ 7), DRU-Befund ($p=0,35$; positiv gegen negativ) und PSA-Wert ($p=0,87$; <4 gegen ≥ 4).

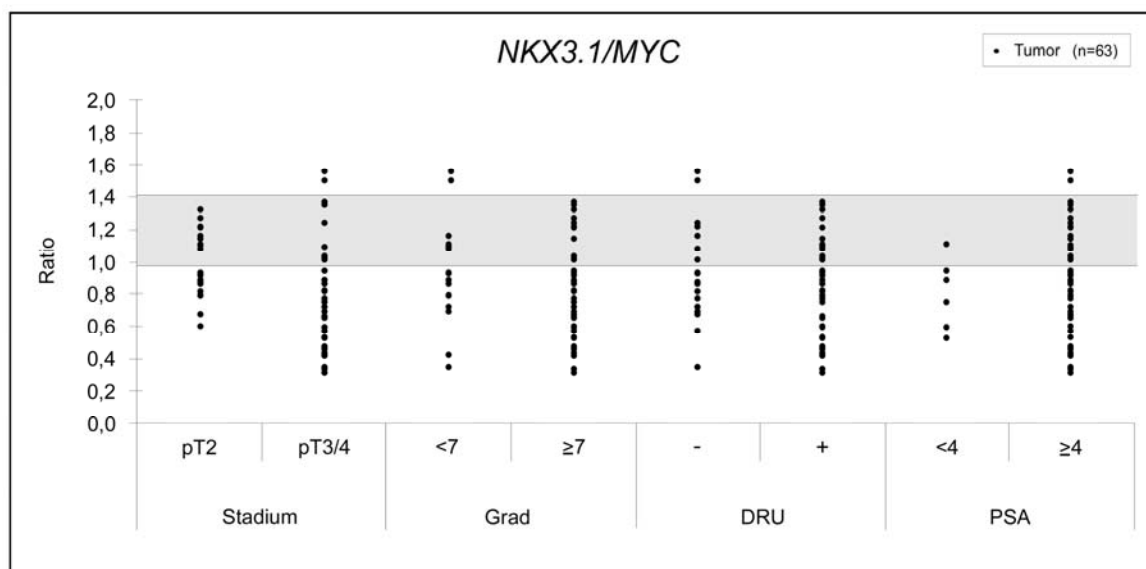


Abb. 34: Vergleich der Ratio *NKX3.1/MYC* der Prostatakarzinomproben mit histopathologischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) und klinischen (DRU-Befund, PSA-Wert) Parametern. Die graue Zone stellt den normalen Grenzbereich (*cutoff*) dar.

Nach der statistischen Auswertung der Daten (Kapitel 2.2.9) konnte eine signifikante Korrelation der *real-time* PCR-Ergebnisse mit histopathologischen, klinischen und molekulargenetischen Parametern für den Verlust von *NKX3.1*, den Gewinn von *MYC* und der Ratio *NKX3.1/MYC* nachgewiesen werden.

Dabei konnte der Verlust von *NKX3.1* mit dem Tumorstadium ($p=0,03$ für pT2 gegen pT3/4), der Gewinn von *MYC* mit dem Malignitätsgrad ($p=0,03$ für Gleason-Summe <7 gegen ≥ 7) und die Ratio *NKX3.1/MYC* mit dem Tumorstadium ($p=0,002$ für pT2 gegen pT3/4) korreliert werden (Kapitel 3.5.2 – 3.5.4).

Die höchste Korrelation konnte für die Ratio *NKX3.1/MYC* und dem Tumorstadium ($p=0,002$ für pT2 gegen pT3/4) nachgewiesen werden, wobei organbegrenzte Tumoren (pT2) von organüberschreitende Tumoren (pT3/4) signifikant unterschieden werden konnten (Abb. 35).

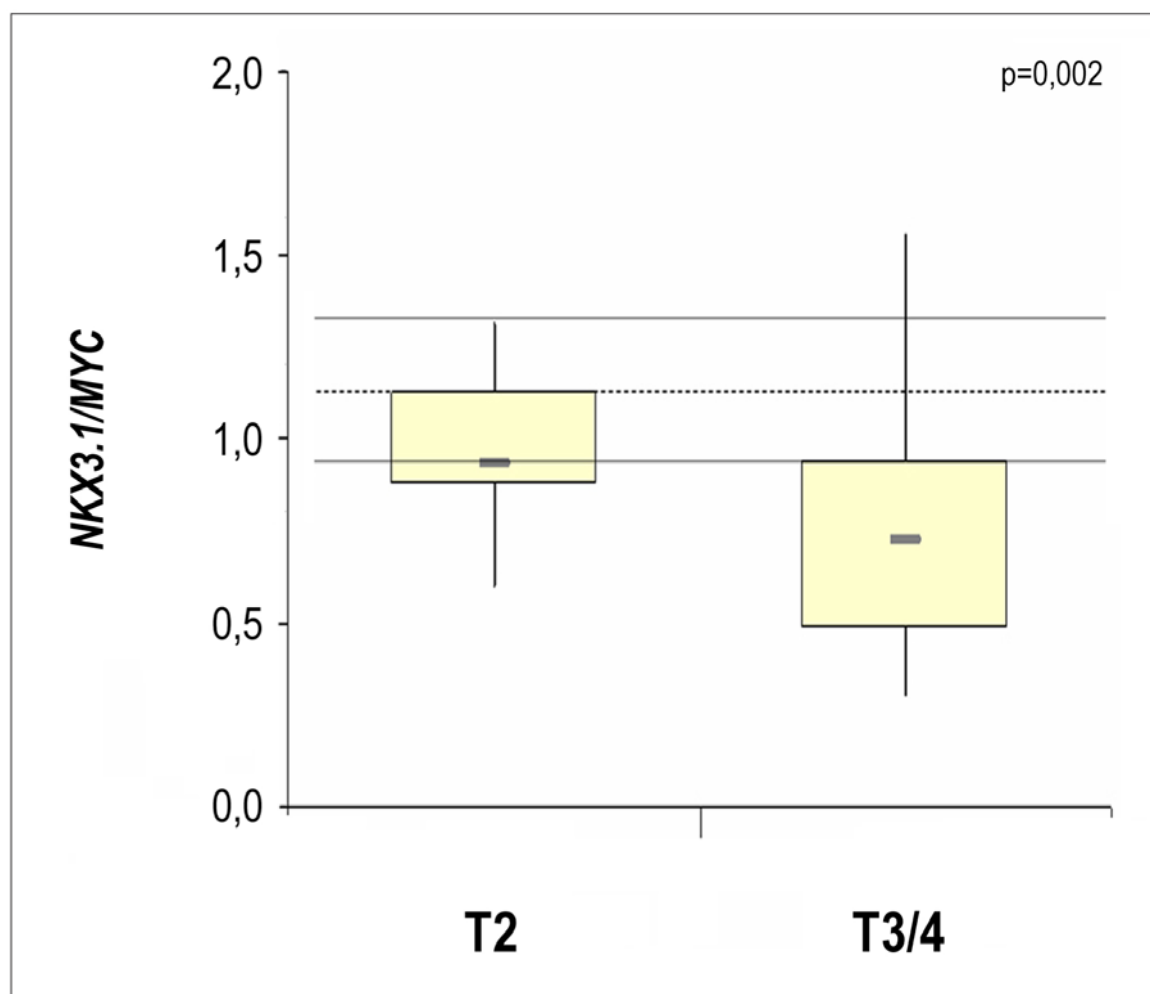


Abb. 35: Beziehung der Ratio *NKX3.1/MYC* zum Tumorstadium: Box-Plot-Darstellung der Ratio der Genkopienzahlen *NKX3.1/MYC* bestimmt durch die quantitative *real-time* PCR für die Prostatakarzinomstadien pT2 (links) und pT3/pT4 (rechts). Der Mittelwert $\pm 2 \times$ Standardabweichung stellt den normalen Grenzbereich (*cutoff*) dar und wurde durch horizontalen Linien gekennzeichnet. Quelle: Kindich et al. 2006

3.6 Charakterisierung der Amplifikationsregion 3q25-q26

Die Charakterisierung der Amplifikationsregion 3q25-q26 erfolgte molekulargenetisch mit der Hilfe der quantitativen *real-time* PCR-Methode, nachdem durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) eine Grob- und Feinkartierung der Region durchgeführt wurde.

Mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR und RT-PCR wurden ausgewählte Gene auf Amplifikation (DNA) und Überexpression (RNA) untersucht. Westernblot-Analysen wurden zum Nachweis einer Proteinüberexpression an ausgewählten Kandidatengenen durchgeführt, bei denen eine erhöhte Genkopienzahl und RNA-Überexpression nachgewiesen werden konnte.

Die Charakterisierung der Amplifikationseinheit beschränkt sich auf die chromosomale Region 3q25.33-q26.3 zwischen den Genen *IL12A* (161,18 Mb) und *SOX2* (182,91 Mb) und umfasst mit insgesamt 106 Genen einen Bereich von 21,73 Mb. Die zytogenetische Zuordnung und Lokalisation der Gene innerhalb der Region wurde entsprechend der Internet-Datenbank NCBI graphisch (Abb. 36) und tabellarisch (Tab. 26) dargestellt.

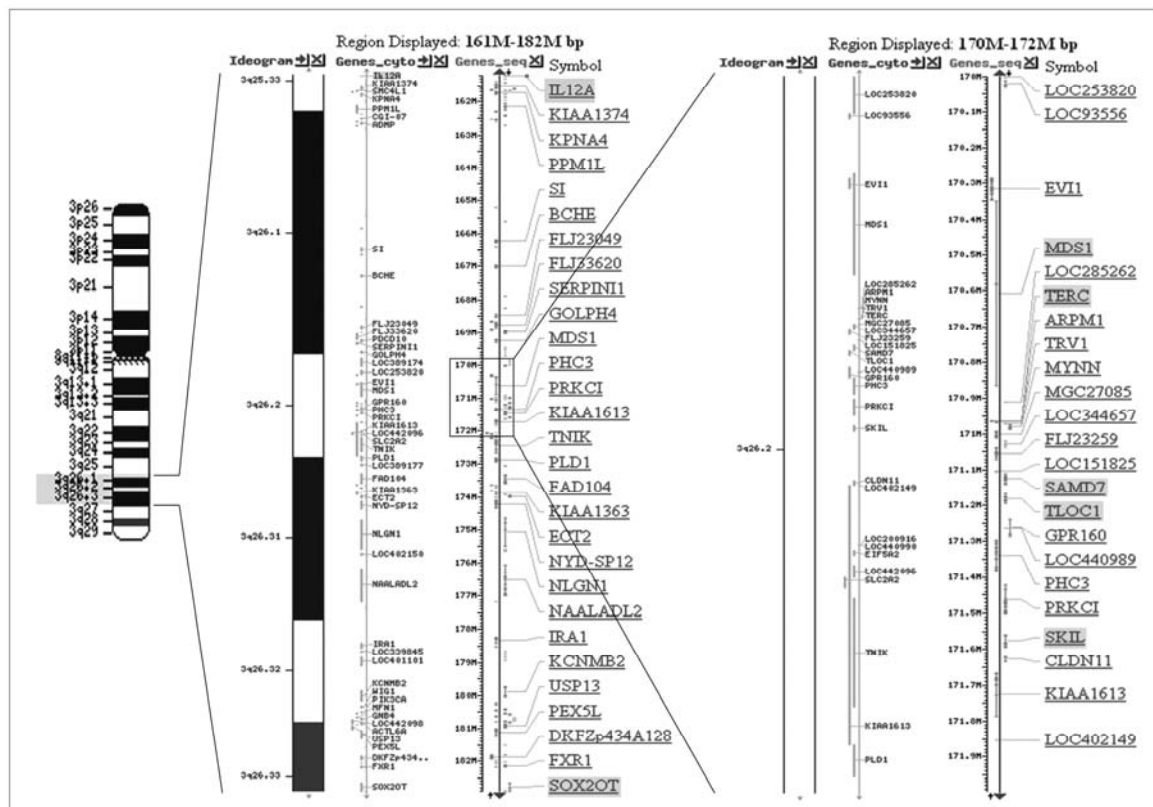


Abb. 36: Darstellung von Chromosom 3 (A) und Ideogramme der chromosomalen Regionen 3q25.33-26 (B) und 3q26.2 (C); mit den dazugehörigen Genen; Quelle: NCBI Map Viewer Version 35.1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>

Tabelle 26: Lokalisation und Funktion der untersuchten Gene innerhalb der Region 3q25-q26

Name	Bezeichnung	Gene ID	Chromosom	Lokalisation (Mb)	Funktion
Interleukin 12A	<i>IL12A</i>	3592	3p12-q13.2	161,19-161,20	T-/ NK-Zell stimulierender Faktor
Myelodysplasia syndrome 1	<i>MDS1</i>	4197	3q26	170,27-170,55	Transkriptions Faktor
Human telomerase RNA component	<i>hTERC</i>	7012	3q21-q28	170,96	RNA Komponente der Telomerase
Steril alfa motif domain containing 7	<i>SAMD7</i>	344658	3q26.2	171,11-171,14	unbekannt
Translocation protein 1	<i>TLOC1</i>	7095	3q26.2	171,17-171,20	Translokation von Proteinen
SKIL (SKI-like)	<i>SKIL</i>	6498	3q26.2	171,56-171,59	Zellregulation / Differenzierung
Solute carrier family 2 member 2	<i>SLC2A2</i>	6514	3q26.1-26.2	172,20-172,23	Glucose Transport
Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha polypeptide	<i>PIK3CA</i>	5290	3q26.3	180,40-180,43	Aktivierung der Tyrosin Kinase
SRY (sex determining region Y)- box 2	<i>SOX2</i>	6657	3q26.3-q27	182,91	Hemmung neuronaler Differenzierung

Quelle: NCBI Entrez Gene

3.6.1 BAC-FISH-Untersuchungen zur Kartierung des Amplikons

Bevor die Kopienzahl und Expression putativer Zielgene innerhalb der Region 3q25-q26 mit Hilfe der *real-time* PCR untersucht werden konnte, wurden durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen zur Kartierung des Amplikons durchgeführt.

Die Grob- und Feinkartierung der Amplifikationsregion wurde an den Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, DU145 und DU145MN1 mit Hilfe der FISH unter Verwendung von 22 BAC-Klonen (bacterial artificial chromosomes) durchgeführt, die spezifisch für bestimmte Bereiche innerhalb der Region 3q25-q26 sind (Abb. 37).

Die Fein-Kartierung der Region wurde mit 7 überlappenden BAC-Klonen (RP11-627P8, RP11-82C9, RP11-816J6, RP11-362K14, RP11-379K17, RP11-81O18, RP-543D10) durchgeführt. Die Region mit der höchsten Anzahl an BAC-Signalen konnte für die Prostatakarzinomzelllinien DU145 und DU145MN1 zwischen den BAC-Klonen RP11-816J6 und RP11-543D10 (3q26.2) auf einen Bereich von 700 kb eingegrenzt werden.

Während PC3 nur eine leichte Zunahme über das Ploidie-Niveau zeigte, konnten für die Prostatakarzinomzelllinien DU145 und DU145MN1 zwischen 6,5 – 9,5 Signale nachgewiesen werden. Der Bereich zwischen den BAC-Klonen RP11-82C9 und RP11-816J6 ergibt eine 500 kb Region, die entsprechend der Ensembl Datenbank: <http://www.ensembl.org> keine Gene enthält.

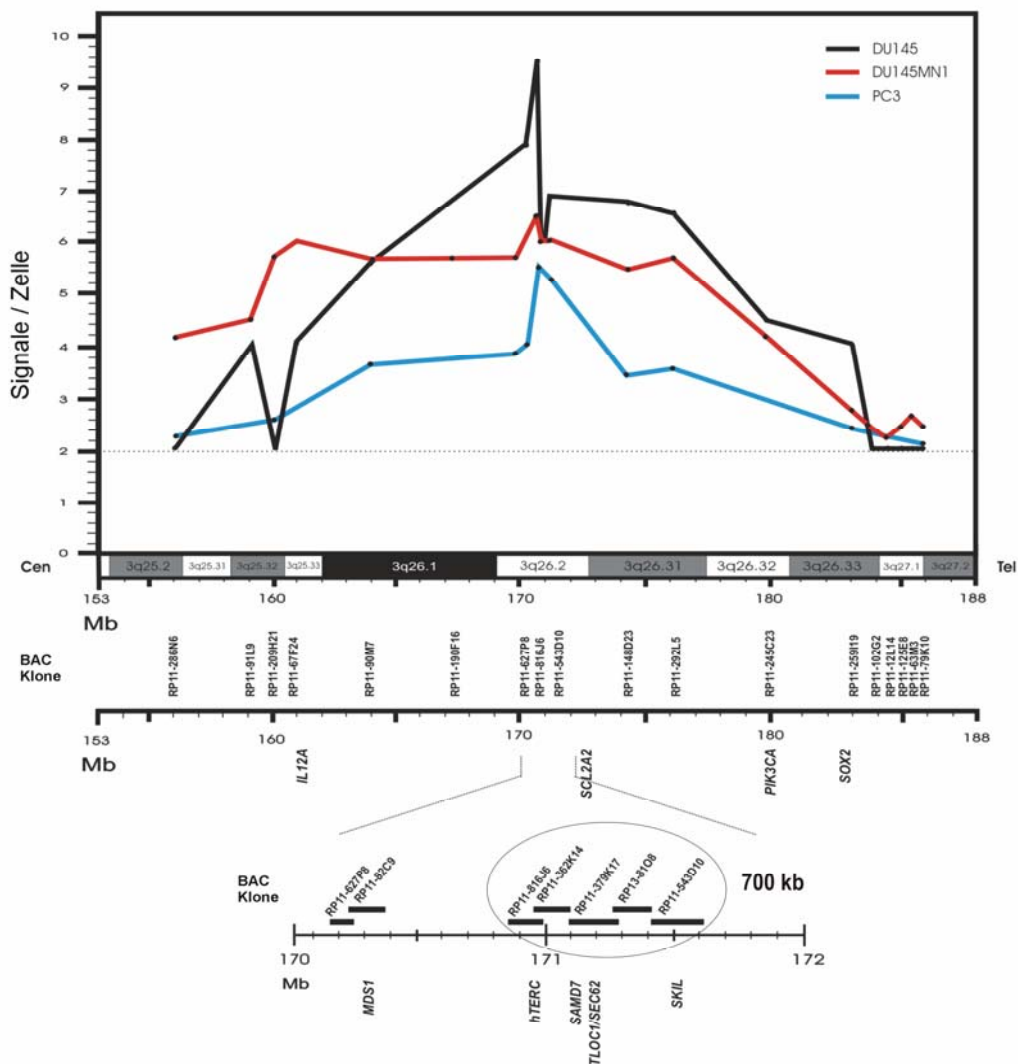


Abb. 37: Grob- und Feinkartierung der Amplifikationsregion 3q25-q26 an den Prostatakarzinomzelllinien DU145, DU145MN1 und PC3 mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und 22 BAC-Klone. Der Bereich mit der höchsten Anzahl an BAC-Signalen konnte zwischen den BAC-Klonen RP11-816J6 und RP11-543D10 einer Region auf 3q26.2 mit einer Größe von 700 kb zugewiesen werden.

3.6.2 *Real-time* PCR zur Untersuchung der Genkopienzahl

Die Untersuchung der Gene innerhalb der Amplifikationsregion 3q25-q26 wurde mit Hilfe der *real-time* PCR-Methode durchgeführt, die zur Bestimmung von Genkopienzahlveränderungen am Beispiel der Gene *NKX3.1* und *MYC* auf Chromosom 8 etabliert und validiert wurde (Kapitel 3.1).

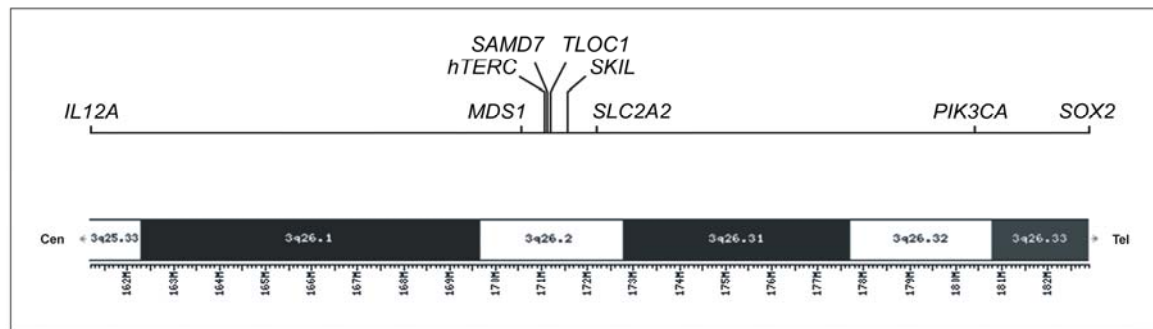


Abb. 38: Chromosomale Region 3q25-q26 mit den auf Amplifikation untersuchten Genen

Quantitative *real-time* PCR-Untersuchungen wurden an insgesamt 9 Genen (*IL12A*, *MDS1*, *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA*, *SOX2*) durchgeführt, die sich alle innerhalb der Amplifikationsregion 3q25-q26 befinden (Abb. 38).

Die Auswahl der Zielgene erfolgte aufgrund der Funktion der Gene in der Karzinogenese anderer Tumore (Prostata, Ösophagus, Lunge, Eierstock, Brust, Magen): *IL12A* (Sattler et al. 2000), *SKIL* (Imoto et al. 2001), *SLC2A2* (Brass et al. 1997), *PIK3CA* (Campbell et al. 2004), und *SOX2* (Li et al. 2004) sowie der Lokalisation der Gene innerhalb der minimal amplifizierten Region 3q26.2 (*MDS1*, *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*).

Untersuchungen der Gene *IL12A*, *MDS1*, *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA* und *SOX2* wurden an Prostatakarzinomzelllinien (Tab. 27 und Abb. 39) und primären Prostatakarzinomproben (Tab. 28 und Abb. 40) durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden tabellarisch (Tab. 29) und graphisch (Abb. 41) dargestellt.

Die statistische Auswertung der *real-time* PCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe der Software SPSS Version 10.0 (SPSS, Chicago Inc.) und verschiedenen statistischen Tests durchgeführt (Kapitel 2.3).

3.6.2.1 Untersuchung von Prostatakarzinomzelllinien und Tumorgewebeproben

Die Untersuchung der Kopienzahlen der Gene *IL12A*, *MDS1*, *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA* und *SOX2* wurden an den Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145 und DU145MN1, die Kopienzahlen der Gene *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* an 22 native Prostatakarzinomproben durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind tabellarisch (Tab. 27 und Tab. 28) und graphisch (Abb. 39 und Abb. 40) dargestellt.

Tabelle 27: Real-time PCR-Ergebnisse der Genkopienzahlen in Prostatakarzinomzelllinien

Nr.	Zelllinie	Genkopienzahlen									• Gewinne
		<i>IL12A</i>	<i>MDS1</i>	<i>hTERT</i>	<i>SAMD7</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SOX2</i>	
1	PC3-13	2,41	2,15	2,79	2,30	2,32	1,51	1,56	1,56	1,66	
2	PC3-16	1,91	2,20	4,08	3,50	4,07	2,94	2,36	1,18	1,36	
3	PC3-24	1,84	4,01	3,51	4,01	4,82	3,65	6,18	2,97	3,22	
4	DU145	5,78	3,90	3,17	3,35	3,37	3,28	3,94	2,77	2,96	
5	DU145MN1	2,95	2,52	3,91	3,67	3,68	2,44	2,60	2,25	1,85	
Grenzen		2,68	2,57	2,42	2,36	2,60	2,98	2,16	2,36	2,52	
		1,64	1,81	1,34	1,52	1,40	2,02	1,68	1,80	1,24	
Anzahl		2	2	5	4	4	2	4	2	2	
Gewinne (%)		40	40	100	80	80	40	80	40	40	

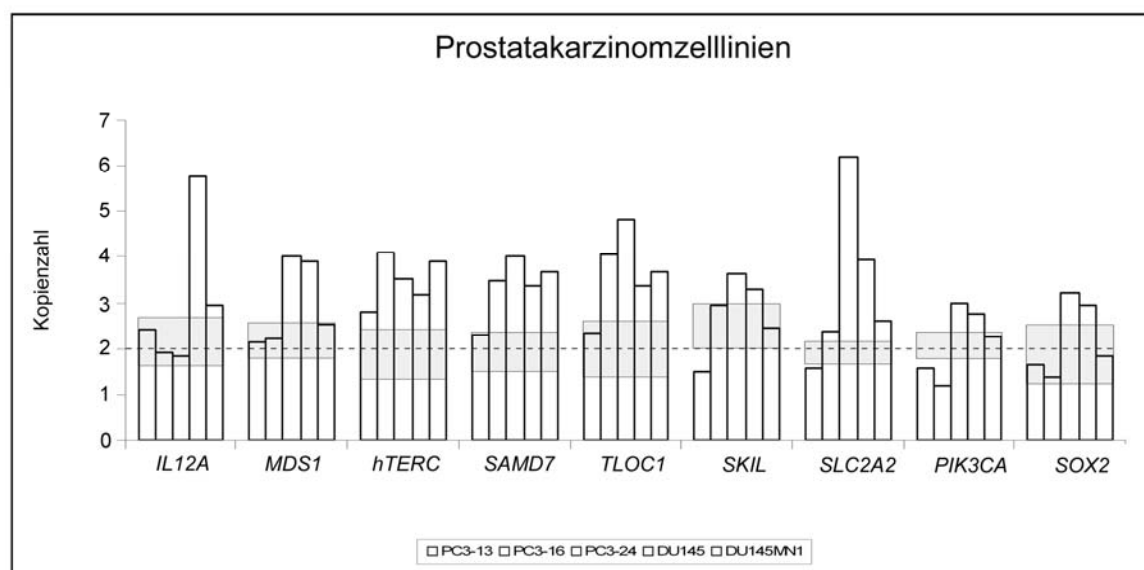
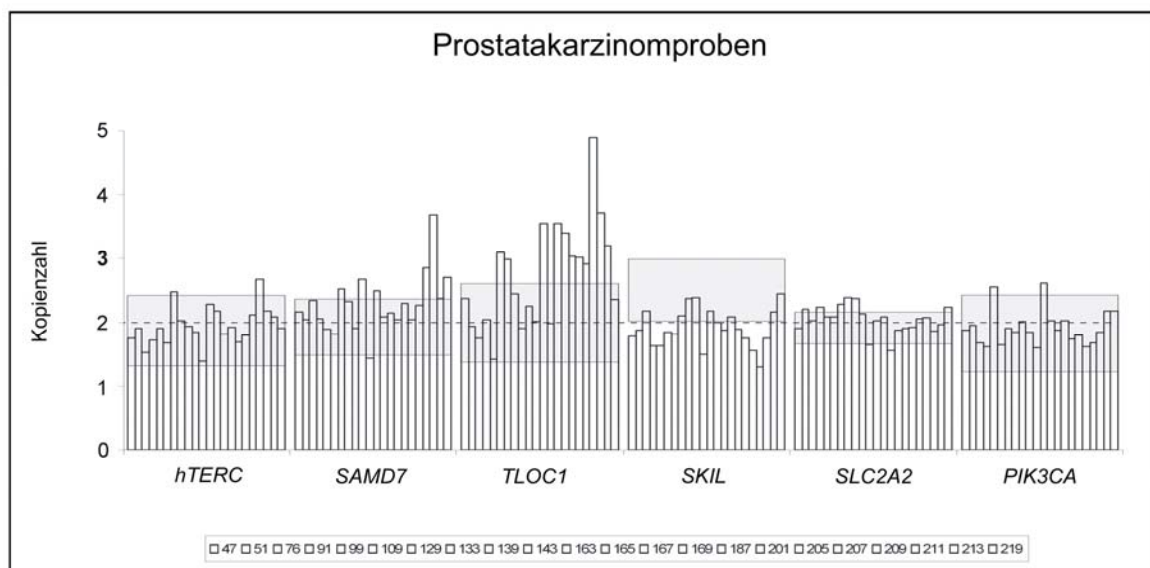


Abb. 39: Kopienzahlen der Gene *IL12A*, *MDS1*, *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA* und *SOX2* in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien (PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145 und DU145MN1). Die graue Zone stellt den normalen Grenzbereich (*cut-off*) dar.

Tabelle 28: Real-time PCR-Ergebnisse der Genkopienzahlen in Prostatakarzinomproben

Nr.	Proben	Genkopienzahl					• Gewinn
		<i>hTERT</i>	<i>SAMD7</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>
1	P47	1,76	2,16	2,37	1,78	1,90	1,88
2	P51	1,91	2,04	1,93	1,87	2,20	1,95
3	P76	1,53	2,34	1,76	2,17	2,03	1,68
4	P91	1,72	2,05	2,04	1,63	2,24	1,62
5	P99	1,90	1,89	1,42	1,64	2,09	2,55
6	P109	1,68	1,81	3,10	1,85	2,08	1,65
7	P129	2,47	2,53	2,99	1,82	2,28	1,90
8	P133	2,03	2,33	2,45	2,10	2,39	1,85
9	P139	1,93	1,91	1,90	2,37	2,37	2,01
10	P143	1,84	2,68	2,25	2,38	2,13	1,84
11	P163	1,40	1,44	2,01	1,50	1,65	1,61
12	P165	2,28	2,50	3,55	2,18	2,03	2,61
13	P167	2,18	2,09	1,98	1,99	2,09	2,03
14	P169	1,81	2,14	3,55	1,87	1,56	1,88
15	P187	1,92	2,04	3,39	2,08	1,87	2,03
16	P201	1,69	2,30	3,03	1,89	1,91	1,74
17	P205	1,80	2,04	3,02	1,76	1,92	1,80
18	P207	2,11	2,26	2,91	1,56	2,06	1,62
19	P209	2,67	2,86	4,89	1,30	2,07	1,68
20	P211	2,17	3,68	3,71	1,76	1,86	1,85
21	P213	2,09	2,37	3,20	2,16	1,96	2,18
22	P219	1,91	2,71	2,36	2,44	2,24	2,18
Grenzen		2,42	2,36	2,60	2,98	2,16	2,36
		1,34	1,52	1,40	2,02	1,68	2,18
Anzahl		2	7	11	0	6	2
Gewinne (%)		9,1	31,8	50	0	27,3	9,1

Abb. 40: Kopienzahlen der Gene *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* in den untersuchten Prostatakarzinomproben. Die graue Zone stellt den normalen Grenzbereich (*cutoff*) dar.

Nach Bestimmung der Grenzwerte (Kapitel 3.1.8) wurden in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien und nativen Prostatakarzinomproben die Kopienzahlen der Gene *IL12A*, *MDS1*, *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA* und *SOX2* auf Gewinne untersucht und tabellarisch (Tab. 29) sowie graphisch (Abb. 41) dargestellt.

Tabelle 29: Anzahl der Genkopienzahlgewinne in Prostatakarzinomzelllinien und Prostatakarzinomproben

Gen	<i>IL12A</i>	<i>MDS1</i>	<i>hTERT</i>	<i>SAMD7</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SOX2</i>
Zelllinien n = 5	2 40%	2 40%	5 100%	4 80%	4 80%	2 40%	4 80%	2 40%	2 40%
Tumor n = 22	-	-	2 9,1%	7 31,8%	11 50%	0 0%	6 27,3%	2 9,1%	-

Dabei konnte für alle Gene ein Genkopienzahlgewinn in mindestens zwei der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Eine erhöhte Genkopienzahl konnte für die Gene *IL12A*, *MDS1*, *SKIL*, *PIK3CA* und *SOX2* in 2 (40%) Zelllinien, *SAMD7*, *TLOC1* und *SLC2A2* in 4 (80%) Zelllinien und *hTERT* in 5 (100%) Zelllinien nachgewiesen werden (Tab. 29). Nach Eingrenzung der Amplifikationsregion konnten in den untersuchten Prostatakarzinomproben eine erhöhte Genkopienzahl für die Gene *hTERT* und *PIK3CA* in 2 (9,1%), *SLC2A2* in 6 (27,3%), *SAMD7* in 7 (31,8%) und *TLOC1* in 11 (50%) Tumoren nachgewiesen werden. Für das Gen *SKIL* konnte in den untersuchten Prostatakarzinomproben keine erhöhte Genkopienzahl nachgewiesen werden (Tab. 29).

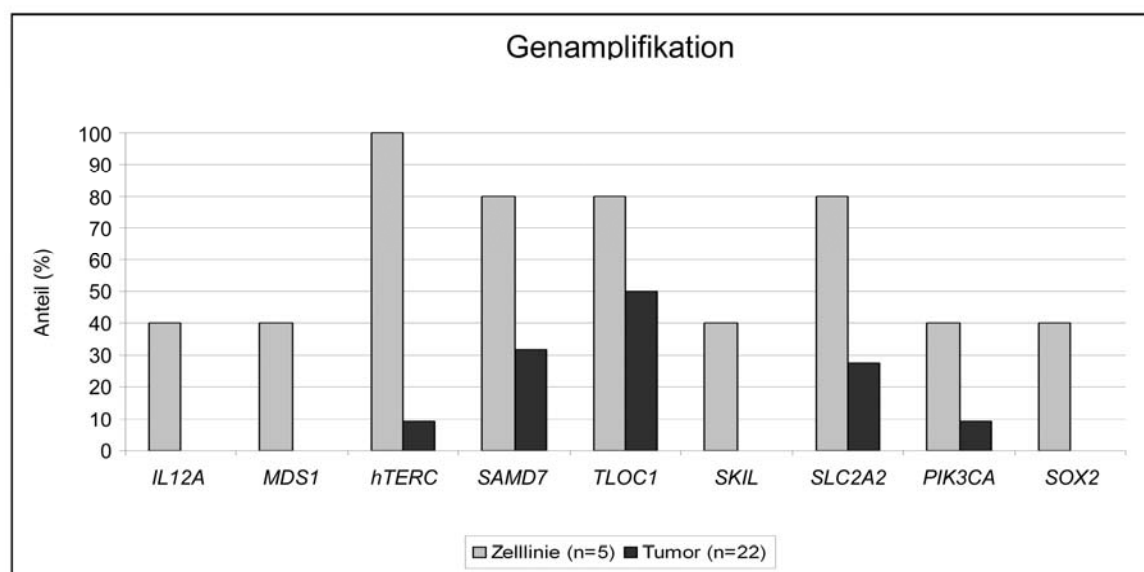


Abb. 41: Anzahl der untersuchten Prostatakarzinomzelllinien und Prostatakarzinomproben mit erhöhter Kopienzahl der Gene *IL12A*, *MDS1*, *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA* und *SOX2*.

3.6.2.2 Korrelation der Tumorproben mit klinischen Parametern

Nach der *real-time* PCR-Bestimmung der Kopienzahlen der Gene *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SLC2A2* und *PIK3CA* wurden die Prostatakarzinome bezüglich eines Zusammenhanges zwischen Amplifikationsergebnissen und klinischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) oder histopathologischen (DRU, PSA) Merkmalen untersucht (Tab. 30). Die statistische Auswertung der Daten wurde für das Gen *TLOC1* durchgeführt, da es mit 50% unter den untersuchten Prostatakarzinomen die höchste Amplifikationsrate zeigte.

Tabelle 30: Vergleich der *real-time* PCR-Ergebnisse mit klinischen- und molekulargenetischen Parametern

Gen		<i>hTERT</i>	<i>SAMD7</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>
Anzahl Proben (%) n = 22		↑ 2 9,1%	↑ 7 31,8%	↑ 11 50%	↑ 0 0%	↑ 6 27,3%	↑ 2 9,1%
Tumorstadium	pT2	1 4,5%	2 9,1%	3 13,6%	0 0%	3 13,6%	1 4,5%
	pT3/4	1 4,5%	5 22,7%	8 36,4%	0 0%	3 13,6%	1 4,5%
Malignitätsgrad	<7	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%	1 4,5%
	≥7	2 9,1%	7 31,8%	11 50%	0 0%	6 27,3%	1 4,5%
DRU	-	0 0%	1 4,5%	3 13,6%	0 0%	1 4,5%	0 0%
	+	2 9,1%	6 27,3%	8 36,4%	0 0%	5 22,7%	2 9,1%
PSA	<4	2 9,1%	2 9,1%	3 13,6%	0 0%	2 9,1%	0 0%
	≥4	0 0%	5 22,7%	8 36,4%	0 0%	4 18,2%	2 9,1%

Gen:

↑ = gewonnen

3.6.2.3 Untersuchung der Tumorproben mit erhöhter *TLOCI*-Genkopienzahl

Nach Vergleich der Genkopienzahl mit histopathologischen Parametern konnte für das Tumorstadium (*staging*) ein Gewinn von *TLOCI* in 3 (13,6%) Tumoren mit einem pT2 Stadium und 8 (36,4%) Tumoren mit einem pT3/4 Stadium nachgewiesen werden. Für den Malignitätsgrad (*grading*) konnte ein Gewinn von *TLOCI* in 0 (0%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme <7 und 11 (50%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme ≥ 7 nachgewiesen werden (Abb. 42).

Nach Vergleich der Genkopienzahl mit klinischen Parametern konnte für die digitale rektale Untersuchung (DRU) ein Gewinn von *TLOCI* in 3 (13,6%) DRU-negativen und 8 (36,4%) DRU-positiven Fällen nachgewiesen werden. Für das prostataspezifische Antigen (PSA) konnte ein Gewinn von *TLOCI* in 3 (13,6%) Tumorproben mit einem PSA-Wert <4 und in 8 (36,4%) Tumorproben mit einem PSA-Wert ≥ 4 nachgewiesen werden (Abb. 42).

Die statistische Auswertung der Prostatakarzinomproben mit einem *TLOCI*-Gewinn ergab zu den untersuchten klinischen Parametern folgende Werte: Tumorstadium ($p=0,68$; pT2 gegen pT3/4), Malignitätsgrad ($p=0,03$; Gleasongrad <7 gegen ≥ 7), DRU-Befund ($p=0,65$; positiv gegen negativ) und PSA-Wert ($p=0,06$; <4 gegen ≥ 4).

Einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten *TLOCI*-Genkopienzahl und histopathologischen Parametern (Gleasonsumme, Tumorstadium) konnte nicht gefunden werden.

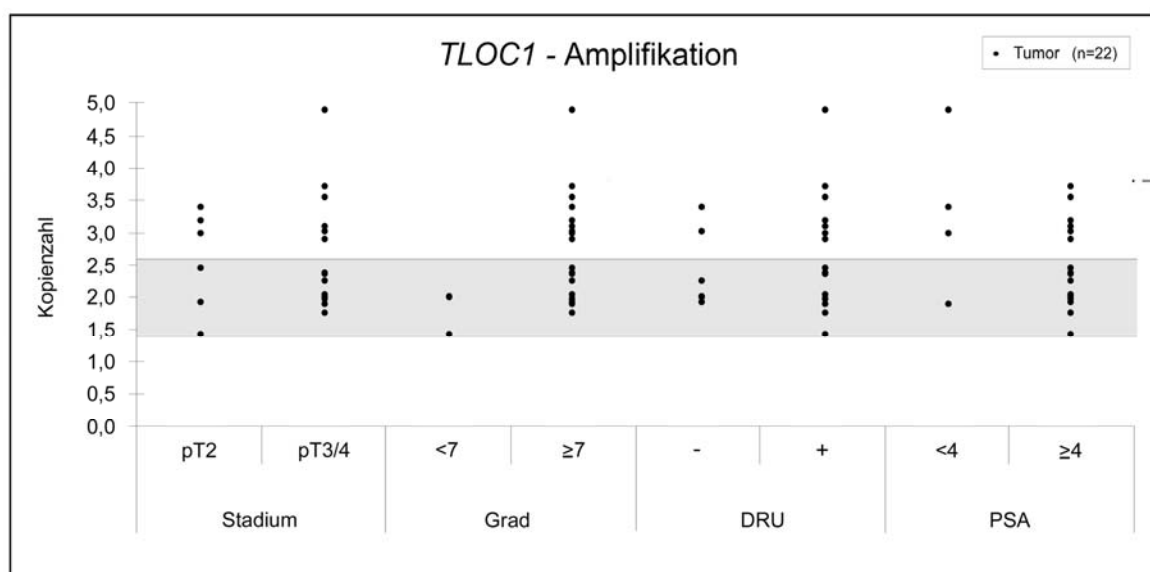


Abb. 42: Darstellung der Prostatakarzinomproben mit erhöhter *TLOCI*-Genkopienzahl im Vergleich zu histopathologischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) und klinischen (DRU-Befund, PSA-Wert) Parametern. Die graue Zone stellt den normalen Grenzbereich (*cutoff*) dar.

Betrachtet man den klinischen Outcome aller 22 untersuchten Patienten mit einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 26 Monaten (5-82 Monate), so zeigten 7 Patienten (6 Patienten mit pT3-Tumor, 1 Patient mit pT2-Tumor) eine Progression und 15 Patienten (10 Patienten mit pT3-Tumor, 5 Patienten mit pT2-Tumor) mit einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 34 Monaten (15-82 Monaten) keine Progression (Abb. 43). Überraschenderweise konnte dabei eine erhöhte *TLOC1*-Genkopienzahl in der Gruppe von Patienten nachgewiesen werden, die keine Progression ($p=0,024$) zeigten (Abb. 43A).

Trägt man die beiden Patientengruppen (Nicht-Progressoren bzw. Progressoren) gegen die Zeit (Monate) auf, so konnte in der Kaplan-Meier-Analyse eine längere progressionsfreie Zeit für die Patientengruppe mit einer erhöhten *TLOC1*-Genkopienzahl ($p=0,051$) beobachtet werden (Abb. 43B).

Diese Befunde lassen vermuten, dass eine erhöhte *TLOC1*-Genkopienzahl einen möglicherweise protektiven Schutz vor einer Progression des Prostatakarzinoms haben könnte. Aufgrund der geringen Fallzahl von 22 Prostatakarzinompatienten müssen weitere Untersuchungen an einer höheren Fallzahl durchgeführt werden um diese Befunde zu stützen.

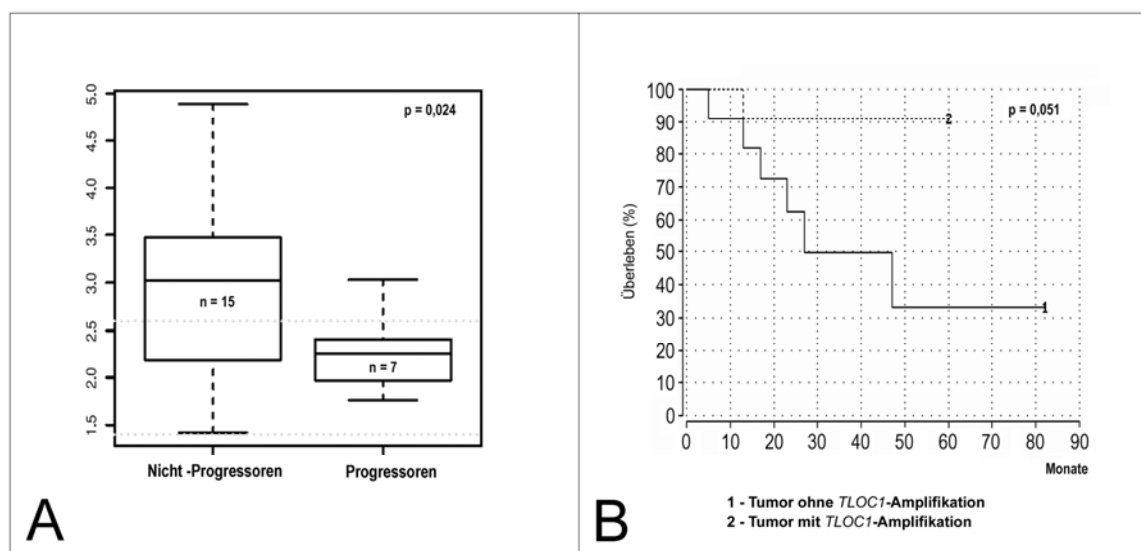


Abb. 43: Abbildung A: Der Boxplot zeigt die Beziehung zwischen der *TLOC1*-Genkopienzahl und der Tumorprogression nach radikaler Prostatektomie von 22 Prostatakarzinompatienten (7 mit Progression, 15 ohne Progression, $p=0,024$). Die gestrichelte Linie markiert den Grenzbereich (*cutoff*) für eine signifikante Abweichungen der *TLOC1*-Genkopienzahl von normal. Abbildung B: Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt die Überlebenshäufigkeit (%) der beiden Patientengruppen (Nicht-Progressoren bzw. Progressoren) nach radikaler Prostatektomie im Vergleich. Prostatakarzinompatienten mit einer *TLOC1*-Amplifikation zeigten dabei eine längere progressionsfreie Zeit nach radikaler Prostatektomie gegenüber der Patientengruppe ohne *TLOC1*-Amplifikation ($p=0,051$).

3.6.3 *Real-time* RT-PCR zur Untersuchung der Genexpression

Die Untersuchung der Genexpression wurde mit der *real-time* RT-PCR-Methode und der relativen Quantifizierungs-Software *RelQuant* am LightCycler-Gerät (Roche Diagnostics) durchgeführt (Kapitel 2.2.7.2).

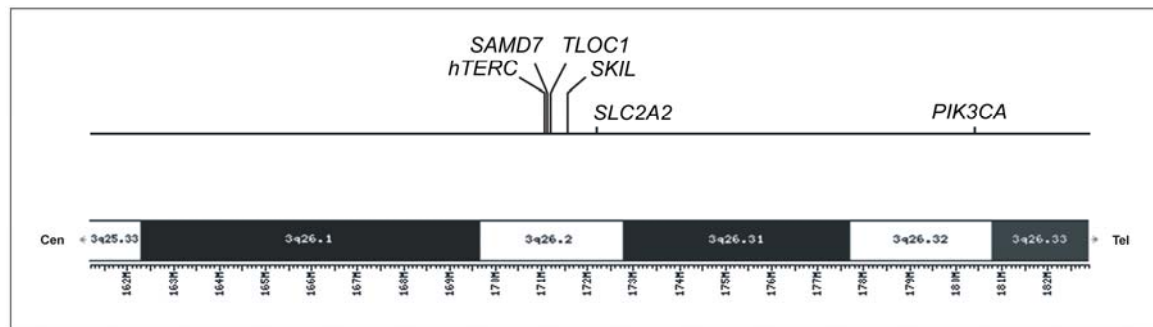


Abb. 44: Darstellung der chromosomalen Region 3q25-q26 mit den auf Expression untersuchten Genen

Dabei wurden quantitative *real-time* RT-PCR-Untersuchungen an den Genen *hTERC*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* durchgeführt (Abb.44), die in Prostatakarzinomzelllinien (Kapitel 3.6.2.1) und nativen Prostatakarzinomen (Kapitel 3.6.2.2) eine erhöhte Genkopienzahl gegenüber normaler Blut-Leukozyten-DNA zeigten. Das Gen *SAMD7* konnte aufgrund einer sehr geringen Expression (CP-Wert >30) in den Prostatakarzinomzelllinien und Prostatakarzinomproben nicht untersucht werden.

Untersuchungen der Gene *hTERC*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* wurden an Prostatakarzinomzelllinien (Tab. 31 und Abb. 45) und primären Prostatakarzinomproben (Tab. 32 und Abb. 46) durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung wurden tabellarisch (Tab. 33) und graphisch (Abb. 47) dargestellt.

Die statistische Auswertung der *real-time* RT-PCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe der Software SPSS Version 10.0 (SPSS, Chicago Inc.) und verschiedenen statistischen Tests durchgeführt (Kapitel 2.3).

3.6.3.1 Untersuchung von Prostatakarzinomzelllinien und Tumorgewebeproben

Die Untersuchung der Expression der Gene *hTERT*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* wurde an den Prostatakarzinomzelllinien PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145, DU145MN1 und an 13 nativen Prostatakarzinomen durchgeführt. Dabei wurde der Grenzwert (*cutoff*) für eine Genüberexpression ab einer 3-fachen Expression gegenüber normaler Prostata definiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind tabellarisch (Tab. 31, 32) und graphisch (Abb. 45, 46) dargestellt.

Tabelle 31: *Real-time* RT-PCR-Egebnisse der Genexpression in Prostatakarzinomzelllinien

Nr.	Zelllinie	Genexpression / Normal				• Gewinn
		<i>hTERT</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>
1	PC-13	5538,31	16,92	17,20	1,30	9,22
2	PC3-16	160,15	6,88	2,81	2,64	15,97
3	PC3-24	1471,31	11,88	4,82	3,49	12,81
4	DU145	40,62	9,08	3,30	1,64	10,35
5	DU145MN1	13,31	4,79	1,19	2,36	4,86
Grenzen		>3-fache Expression gegenüber normaler Prostata				
Anzahl		5	5	3	1	5
%		100	100	60	20	100

In den Prostatakarzinomzelllinien konnte für alle untersuchten Gene eine Überexpression gegenüber normaler Prostata-RNA gefunden werden. Eine >3-fache Expression konnte für die Gene *hTERT*, *TLOC1* und *PIK3CA* in 5 (100%), *SKIL* in 3 (60%) und *SLC2A2* in einer (20%) Prostatakarzinomzelllinie nachgewiesen werden (Tab. 31 und Abb. 45).

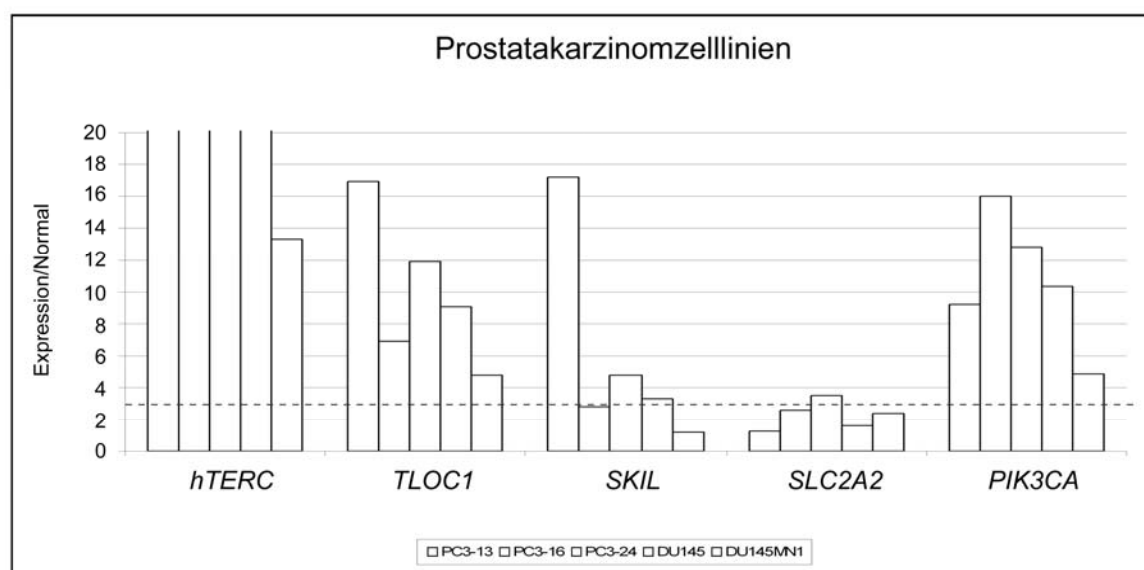


Abb. 45: Expression der Gene *hTERT*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien gegenüber normaler Prostata. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze (*cutoff*) für eine signifikante Abweichung von normal.

Tabelle 32: Real-time PCR-Ergebnisse der Genexpression in Prostatakarzinomproben

Nr.	Probe	Genexpression / Normal				• Gewinn
		<i>hTERC</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>
1	P99	4,69	6,77	1,79	18,21	4,22
2	P129	0,62	4,83	3,80	4,12	4,32
3	P133	1,69	5,87	2,07	14,24	2,76
4	P139	4,54	5,88	3,68	8,71	3,76
5	P163	1,46	3,13	0,47	3,09	1,11
6	P167	3,38	3,23	1,45	2,08	2,81
7	P 169	0,92	3,23	1,02	2,48	1,65
8	P 187	3,00	4,23	2,23	2,15	3,16
9	P 201	1,54	5,02	2,07	4,07	3,54
10	P 205	1,54	4,79	1,29	2,52	2,84
11	P 209	10,31	14,21	3,91	3,26	7,46
12	P 213	0,85	3,37	1,34	4,44	2,05
13	P 219	7,92	7,12	1,58	3,90	3,76
Grenzen		>3-fache Expression gegenüber normaler Prostata				
Anzahl		5	13	3	9	7
%		38,5	100	23,1	69,2	53,8

In den Prostatakarzinomproben konnte für alle untersuchten Gene eine Überexpression gegenüber normaler Prostata-RNA gefunden werden. Eine >3-fache Expression konnte für das Gen *TLOC1* in 13 (100%), *SLC2A2* in 9 (69,2%), *PIK3CA* in 7 (53,8%), *hTERC* in 5 (38,5%) und *SKIL* in 3 (23,1%) Prostatakarzinomproben nachgewiesen werden (Tab. 32 und Abb. 46). Eine Expression von *SAMD7* konnte in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien und Prostatakarzinomproben nicht nachgewiesen werden.

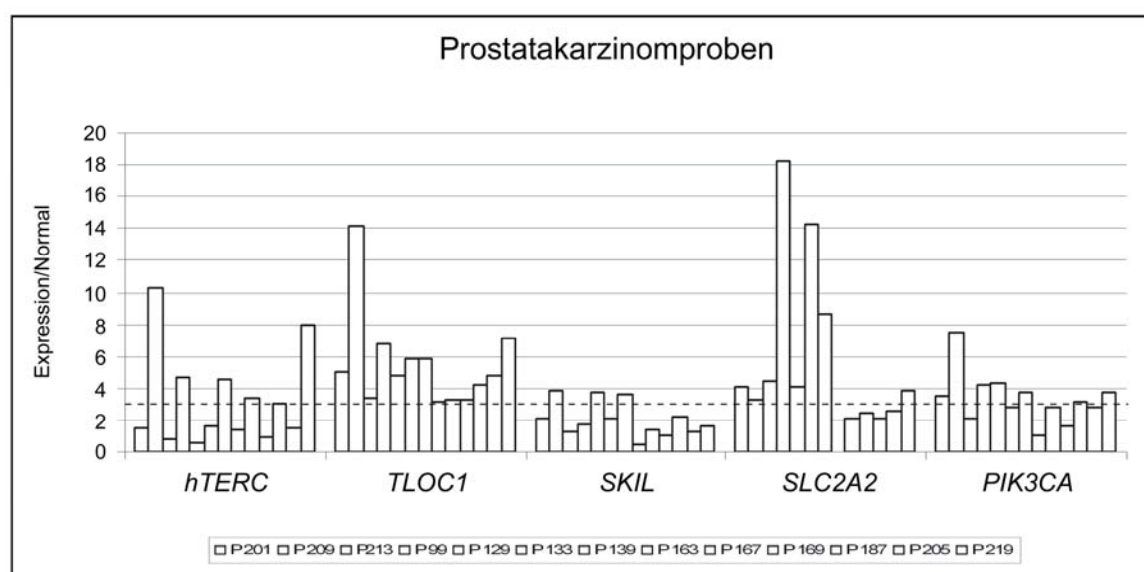


Abb. 46: Expression der Gene *hTERC*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* in den untersuchten Prostatakarzinomproben gegenüber normaler Prostata. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze (*cutoff*) für eine signifikante Abweichung von normal.

Nach Bestimmung der Grenzwerte (Kapitel 3.1.8) wurden in den untersuchten Prostatakarzinomproben die Kopienzahlen der Gene *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA* auf Gewinne untersucht und tabellarisch (Tab. 33) sowie graphisch (Abb. 47) dargestellt.

Tabelle 33: Anzahl der Genkopienzahlgewinne der Gene *hTERT*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2*, *PIK3CA*

Gen	<i>hTERT</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>
Zelllinie n = 5	5 100%	5 100%	3 60%	1 20%	5 100%
Proben n = 13	5 38,5%	13 100%	3 23,1%	9 69,2%	7 53,8%

In den Prostatakarzinomzelllinien konnte für alle untersuchten Gene eine Überexpression gegenüber normaler Prostata-RNA gefunden werden. Eine >3 fache Expression konnte für das Gen *hTERT* in 6 (100%), *TLOC1* in 6 (100%), *SKIL* in 3 (60%), *SLC2A2* in 2 (20%) und *PIK3CA* in 5 (100%) Zelllinien nachgewiesen werden (Tab. 31 und Abb. 45).

In den Prostatakarzinomproben konnte eine >3 fache Expression für das Gen *TLOC1* in 13 (100%), *SLC2A2* in 9 (69,2%), *PIK3CA* in 7 (53,8%), *hTERT* in 5 (38,5%) und *SKIL* in 3 (23,1%) Tumorproben nachgewiesen werden (Tab. 32 und Abb. 46).

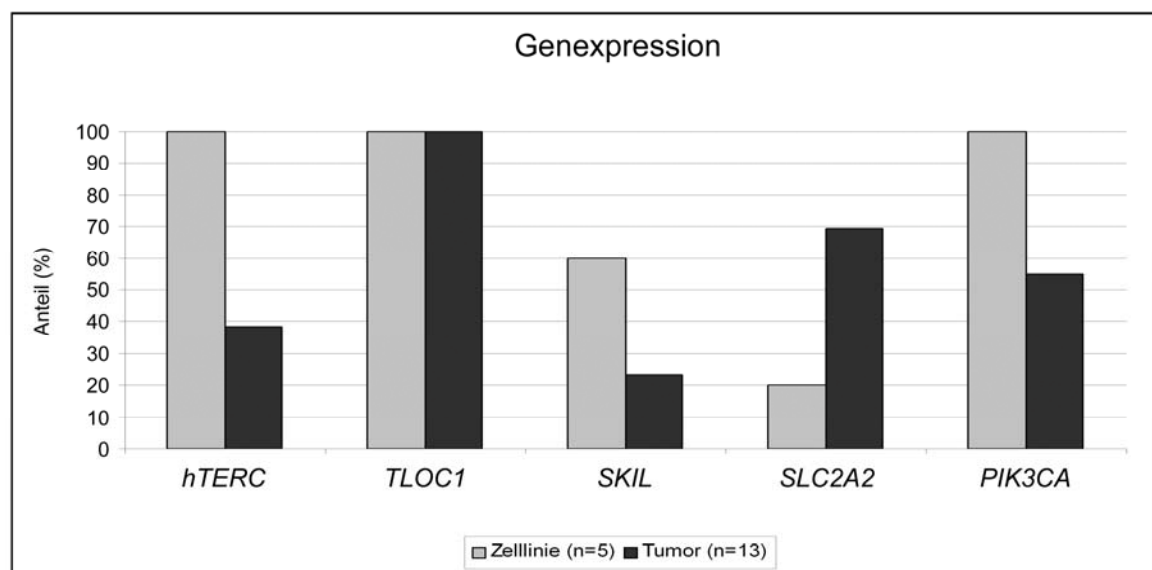


Abb. 47: Anzahl der untersuchten Prostatakarzinomzelllinien und Prostatakarzinomproben mit erhöhter Expression der Gene *hTERT*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA*.

3.6.3.2 Korrelation der Tumorproben mit klinischen Parametern

Nach der *real-time* RT-PCR-Bestimmung der Expression der Gene *hTERT*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* wurden die Prostatakarzinome bezüglich eines Zusammenhangs zwischen Expressionsergebnissen und klinischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) oder histopathologischen (DRU, PSA) Merkmalen untersucht (Tab. 34). Die statistische Auswertung der Daten wurde für das Gen *TLOC1* durchgeführt, da es mit 100% unter den untersuchten Prostatakarzinomen die höchste Expressionsrate zeigt.

Tabelle 34: Vergleich der *real-time* PCR-Ergebnisse mit klinischen- und molekulargenetischen Parametern

Gen		<i>hTERT</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>
Proben n = 13		↑	↑	↑	↑	↑
		5 38,5%	13 100%	3 23,1%	9 69,2%	7 53,8%
Tumorstadium	pT2	1 7,7%	5 38,5%	1 7,7%	4 30,8%	3 23,1%
	pT3/4	4 30,8%	8 61,5%	2 15,4%	5 38,5%	4 30,8%
Malignitätsgrad	<7	1 7,7%	2 15,4%	0 0%	2 15,4%	1 7,7%
	≥7	4 30,8%	11 84,6%	3 23,1%	7 53,8%	6 46,1%
DRU	-	0 0%	4 30,8%	0 0%	2 15,4%	2 15,4%
	+	5 38,5%	9 69,2%	3 23,1%	7 53,8%	5 38,5%
PSA	<4	2 15,4%	4 30,8%	3 23,1%	3 23,1%	4 30,8%
	≥4	3 23,1%	9 69,2%	0 0%	6 46,1%	3 23,1%

Gen: ↑ = gewonnen

3.6.3.3 Untersuchung der Tumorproben mit erhöhter *TLOC1*-Genexpression

Nach Vergleich der Genexpression mit histopathologischen Parametern konnte für das Tumorstadium (*staging*) eine erhöhte *TLOC1*-Expression in 5 (38,5%) Tumoren mit einem pT2-Stadium und 8 (61,5%) Tumoren mit einem pT3/4-Stadium nachgewiesen werden. Für den Malignitätsgrad (*grading*) konnte eine erhöhte *TLOC1*-Expression in 2 (15,4%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme <7 und 11 (84,6%) Tumorproben mit einer Gleasonsumme ≥ 7 nachgewiesen werden (Abb. 48).

Nach Vergleich der *TLOC1*-Expression mit klinischen Parametern konnte für die digitale rektale Untersuchung (DRU) eine erhöhte Expression in 4 (30,8%) DRU-negativen und 9 (69,2%) DRU-positiven Fällen nachgewiesen werden. Für das prostata-spezifische Antigen (PSA) konnte eine erhöhte Expression in 4 (30,8%) Tumorproben mit einem PSA-Wert <4 und in 9 (69,2%) Tumorproben mit einem PSA-Wert ≥ 4 nachgewiesen werden (Abb. 48).

Die statistische Auswertung der Prostatakarzinomproben mit einer erhöhten *TLOC1*-Expression ergab zu den untersuchten klinischen Parametern folgende Werte: Tumorstadium ($p=0,94$; pT2 gegen pT3/4), Malignitätsgrad ($p=0,77$; Gleasongrad <7 gegen ≥ 7), DRU-Befund ($p=0,26$; positiv gegen negativ) und PSA-Wert ($p=0,33$; <4 gegen ≥ 4).

Eine signifikante Korrelation zu histopathologischen und klinischen Parametern konnte für die *TLOC1*-Expression nicht nachgewiesen werden.

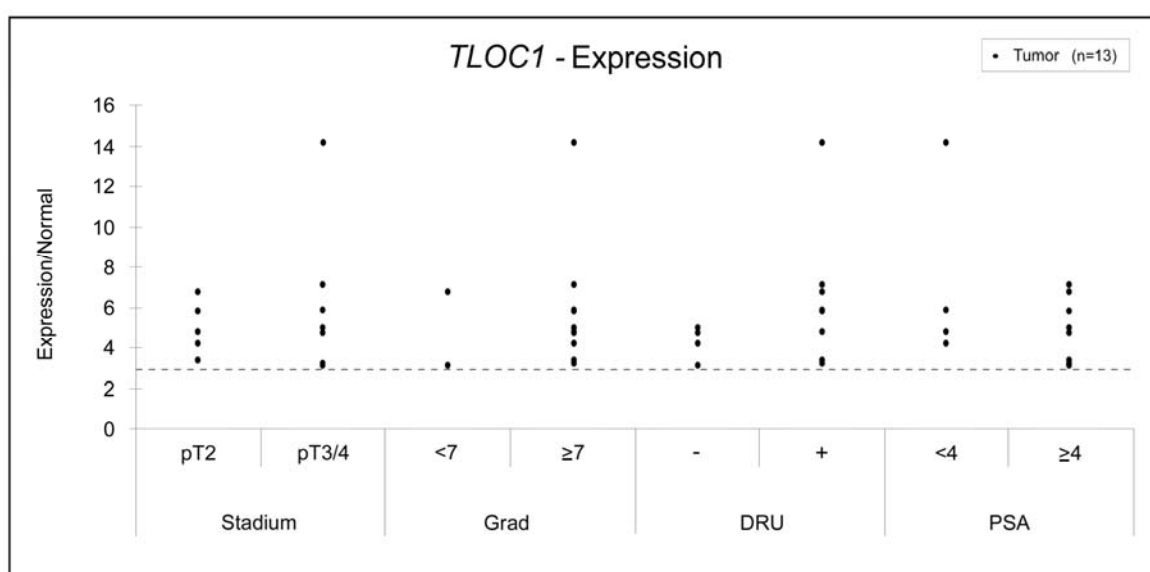


Abb. 48: Darstellung der Prostatakarzinomproben mit erhöhter *TLOC1*-Genkopienzahl im Vergleich zu histopathologischen (Tumorstadium, Malignitätsgrad) und klinischen (DRU-Befund, PSA-Wert) Parametern. Die gestrichelte Linie stellt die normale Grenze (*cutoff*) dar.

3.6.3.4 Untersuchung von Normal-Gewebeproben und einer Zellkultur

Real-time RT-PCR-Untersuchungen der Expression der Gene *hTERT*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* wurden neben den Prostatakarzinomproben und den BPH-Proben auch an Geweben der Milz und Niere sowie an einer normalen Zahnfleischfibroblastenkultur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden tabellarisch (Tab. 35) und graphisch (Abb. 49) dargestellt.

Tabelle 35: *Real-time* PCR-Ergebnisse der Genüberexpression in Normalgewebeproben

Nr.	Probe	Expression / Normal					• Gewinn
		<i>hTERT</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>	
1	Milz	17,31	1,21	1,41	0,52	0,92	
2	Niere	10,54	7,09	3,02	8,11	6,38	
3	Fibroblasten	4,38	1,17	0,65	0,73	2,41	
Grenze		>3-fache Expression gegenüber normaler Prostata					
Anzahl		3	1	1	1	1	
%		100	33,3	33,3	33,3	33,3	

Untersuchungen der Genexpression an Normalgeweben haben eine >3-fache Expression der untersuchten Gene gegenüber normaler Prostata in jeweils mindestens einer Normalprobe gezeigt. Dabei konnte eine Überexpression für das Gen *hTERT* in 3 (100%) Proben (Milz, Niere, Fibroblasten) und für *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* sowie *PIK3CA* in 1 (33,3%) Probe (Niere) nachgewiesen werden.

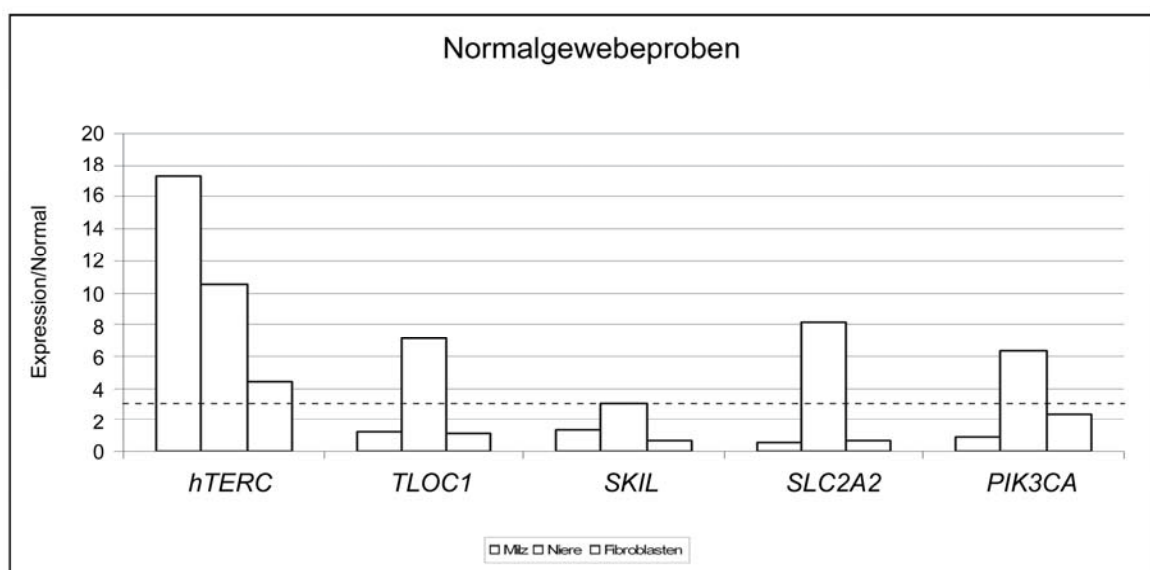


Abb. 49: Expression der Gene *hTERT*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* in den untersuchten Gewebeproben gegenüber normaler Prostata. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze (*cutoff*) für eine signifikante Abweichung der untersuchten Proben von normal.

3.6.3.5 Untersuchung von BPH-Gewebeproben

Real-time RT-PCR-Untersuchungen der *TLOC1*-Genexpression wurden zusätzlich auch an insgesamt 6 BPH-Gewebeproben durchgeführt (Tab. 36 und Abb. 50).

Tabelle 36: *Real-time* PCR-Ergebnisse der Genüberexpression in Normalgewebeproben

Proben	Expression / Normal						• Gewinn
	<i>TLOC1</i>						
	BPH 1	BPH 3	BPH 4	BPH 5	BPH 6	BPH 10	
	1	2	3	4	5	6	
	4,60	2,85	0,69	1,71	2,77	3,92	
Grenzen	>3-fache Expression gegenüber normaler Prostata						
Anzahl	1	-	-	-	-	1	
%	16,6	-	-	-	-	16,6	

Dabei konnten eine erhöhte *TLOC1*-Genexpression (>3-fache Expression gegenüber normaler Prostata-mRNA in 2 (33,3%) Proben (3,92 und 4,60-fach) nachgewiesen werden. Die restlichen 4 BPH-Gewebeproben zeigten keine erhöhte *TLOC1*-Genexpression und variierten zwischen 0,69-fach und 2,85-fach. Im Vergleich zu den 13 untersuchten Prostatakarzinomproben mit einer bis zu 14,21-fache *TLOC1*-Genexpression (Kapitel 3.6.3.1) konnten in den BPH-Gewebeproben keine oder eine geringe *TLOC1*-Genexpression nachgewiesen werden.

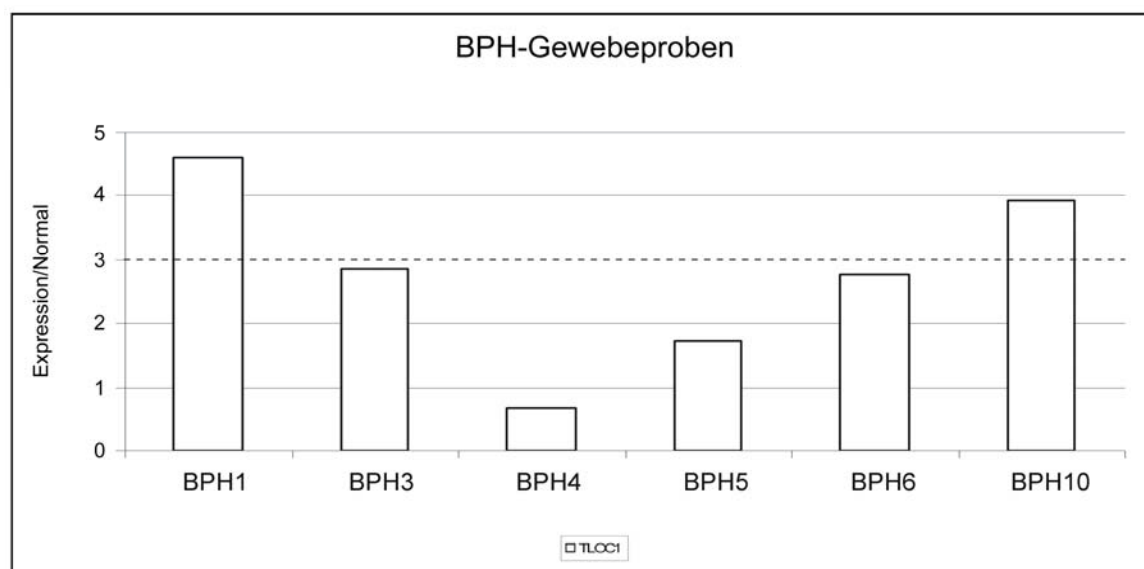


Abb. 50: Darstellung der *TLOC1*-Expression von 6 BPH-Gewebeproben im Verhältnis zu normaler Prostata. Die gestrichelte Linie markiert die Grenze (*cutoff*) für eine signifikante Abweichung der untersuchten Proben von normal.

3.6.4 Nachweis von *TLOC1*-Protein im Western-Blot

Der Nachweis einer *TLOC1*-Proteinüberexpression wurden durch Mitarbeiter des Institutes für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg mit Hilfe der Westernblot-Analyse (Kapitel.2.2.4.10) an den Prostatakarzinomzelllinien DU145MN1, DU145, PC3 und der Kontrollzelllinie BPH1 durchgeführt und das Verhältnis (Ratio) der Expression des Proteins *TLOC1/Sec62p* zu der Expression der Referenzproteine *Sec61ap* und β -*Tubulin* bestimmt (Abb.51).

Eine *TLOC1/Sec62p* Proteinüberexpression konnte in allen Prostatakarzinomzelllinien nachgewiesen werden, wobei eine erhöhte Ratio von *Sec62p* zu den Referenzproteinen *Sec61ap* und β -*Tubulin* zwischen 1,33 und 3,49 festgestellt werden konnte. Die höchste *TLOC1/Sec62p*-Proteinüberexpression konnte dabei in der Prostatakarzinomzelllinie DU145 nachgewiesen werden (Tab.37).

Tabelle 37: Mittelwert und Standardabweichung der Ratio *Sec62p* zu *Sec61ap* und β -*Tubulin*

Zelllinie	Protein-Expression	
	Ratio	
	<i>Sec62p</i> / <i>Sec61ap</i>	<i>Sec62p</i> / β - <i>Tubulin</i>
DU145MN1	2,20 ± 0,43	2,52 ± 1,11
DU145	2,85 ± 0,89	3,49 ± 2,47
PC3	1,33 ± 0,69	1,82 ± 1,44
BPH1	1	1

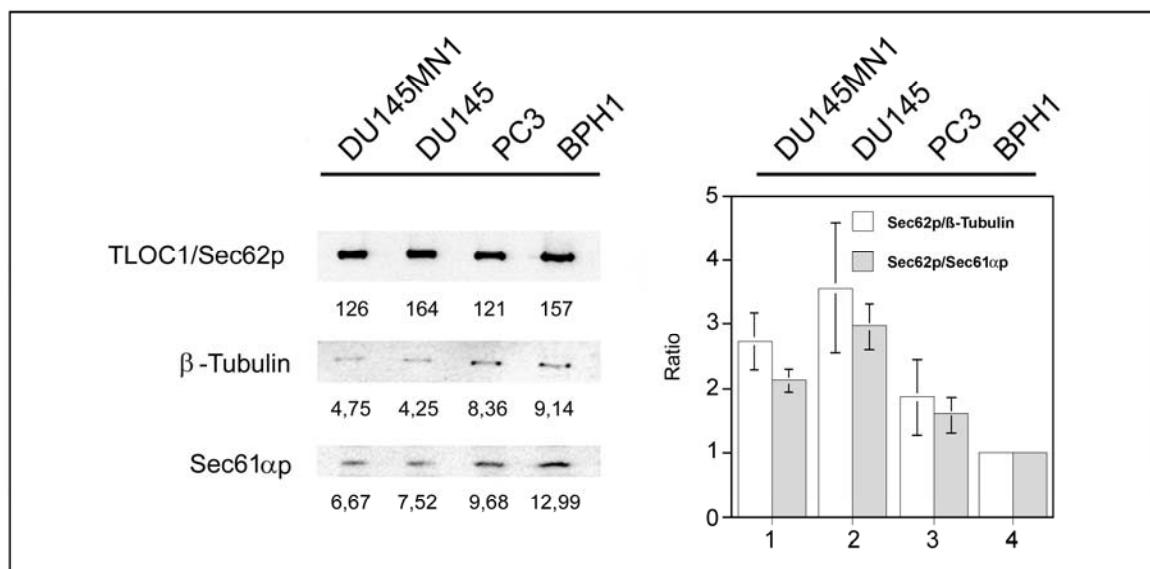


Abb. 51: Ergebnisse der SDS-PAGE und Westernblot-Untersuchung der *TLOC1*-Proteinexpression in benigne Prostatahyperplasie- (BPH1) und Prostatakarzinom- (DU145MN1, DU145, PC3) Zelllinien nach Bestimmung des Gehaltes von *TLOC1/Sec62p* Protein im Vergleich zu dem Cytoskelettassoziierten (β -Tubulin) und Endoplasmatisches Retikulum resistenten (*Sec61ap*) Protein. Gemittelte und normalisierte Werte konnten gezeigt werden für (n=6). Die Ratio der Proteine wurden für BPH1 gleich 1 gesetzt.

4 Diskussion

4.1 Genamplifikation in Tumoren

Die Genamplifikation ist eine Form genomischer Instabilität, die durch gezielte Vermehrung von bestimmten DNA-Abschnitten entsteht und zur Entwicklung von Tumoren beiträgt (Schwab 1999; Ciullo et al. 2002; Albertson 2006). Sie führt zu einer selektiven Zunahme der Genkopienzahl und ist ein allgemeiner Mechanismus zur Hochregulation der Genexpression und Proteinmenge (Schwab 1999; Albertson 2006). Eine Zunahme in der Kopienzahl bestimmter Onkogene, die das normale Wachstum und das Überleben der Zelle kontrollieren, konnte in Säugetieren nachgewiesen und mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert werden (Schwab 1999; Coquelle et al. 1998, 2002; Hellman et al. 2002; Albertson 2006).

In Metaphasen von humanen Tumorzelllinien und Tumoren können Amplifikationen cytogenetisch als extrachromosomale oder intrachromosomale Elemente (Abb. 53 A, B) in Form von *double minutes (dmins)* oder *heterogeneous staining regions (HSRs)* nachgewiesen werden (Debatisse et al. 1998; Schwab 1999; Ciullo et al. 2002; Albertson 2006). Während *dmins* kleine runde gepaarte extrachromosomale DNA-Fragmente darstellen, die durch Ausschluss von genetischem Material aus Chromosomen hervorgehen (Debatisse et al. 1998), bilden *HSRs* intrachromosomale DNA-Fragmente die aus viele nacheinander angeordnete Kopien (Tandem-Wiederholungen) der amplifizierten DNA-Sequenz bestehen und nach einer Chromosomenbänderung als einheitlich gefärbte Chromosomenabschnitte erkennbar werden (Schwab 1999; Narayanan et al. 2006). Amplifizierte DNA-Bereiche können dabei innerhalb eines Chromosoms oder im gesamten Genom verteilt vorliegen und eine tandemförmige oder invertierte Anordnung repetitiver Elemente besitzen (Schwab 1999; Albertson 2006).

In Kulturen von Säugetierzellen und Mausmodellen können Genamplifikationen durch einen DNA-Doppelstrangbruch an einer fragilen Stelle initiiert werden (Coquelle et al. 1997; Pipiras et al. 1998; Albertson 2006). Während ein frühes Ereignis für eine Deletion und Ausbildung extrachromosomaler Elemente sorgt, führt eine folgende Integration dieser Elemente zu einer Reihe von chromosomalen Instabilitäten und Ausbildung von intrachromosomalen Amplifikationen in Form von *HSRs* (Ruiz und Wahl 1990). Einmal integriert bleiben amplifizierte Sequenzen instabil und können auf andere Chromosomen übertragen werden (Ruiz und Wahl 1990).

Ein klassisches Modell für die Entstehung von intrachromosomalen Amplifikationen in Form von *HSRs* stellt der *breakage fusion bridge* (BFB) Mechanismus (McClintock 1951) dar (Abb. 52 C). Er wird durch einen DNA-Doppelstrangbruch innerhalb einer fragilen Stelle initiiert und beruht auf einer ungleichen Verteilung von genetischem Material während der mitotischen Zellteilung (Toledo et al. 1993; Coquelle et al. 1997; Ciullo et al. 2002; Hellmann et al. 2002; Shimizu et al. 2005).

In diesem Prozess fördert ein DNA-Doppelstrangbruch eine Fusion von Chromosomenenden und die Ausbildung eines dizentrischen Chromosoms, das innerhalb der Anaphase der mitotischen Zellteilung brechen und zu einem Chromosom mit einer invertierten Duplikation von terminalen Sequenzen führen kann (Albertson 2006). Weitere Brüche können zu einem Zyklus des BFB-Mechanismus und zur Akkumulation von genetischem Material führen (Coquelle et al. 1997; Pipiras et al. 1998; Albertson 2006). Der Zyklus kann erst wieder beendet werden, wenn neue telomere Sequenzen eine Fusion von Schwesterchromatiden verhindern (Albertson 2006; Bailey und Murnane 2006). Dies kann einerseits durch eine Translokation der amplifizierten Sequenz auf andere chromosomale Regionen oder durch einen Wiederaufbau telomerer Sequenzen durch das Enzym Telomerase erfolgen (Albertson 2006; Bailey und Murnane 2006).

Der Verlust der Telomerefunktion ist ein wichtiger Mechanismus für die chromosomale Instabilität, die in Tumoren gefunden wird (Bailey und Murnane 2006). Ein teilweiser oder vollständiger Verlust von telomeren Sequenzen, kann zu verlängerten BFB-Zyklen mit umfangreichen DNA-Amplifikationen und terminalen Deletionen führen (Bailey und Murnane 2006). Eine Fusion von Schwesterchromatiden mit verkürzten Telomeren konnte in vitro und in vivo Modellen von Nagetieren (Smith et al. 1995; Stark 1993), Mäusen und humanen Tumoren (Chan und Blackburn 2002; Hackett und Greider 2002) beobachtet werden.

Ein Zusammenhang zwischen DNA-Doppelstrangbrüchen und fragilen Stellen konnte in tierischen und humanen Tumorzellen nachgewiesen werden, die durch Zytostatika behandelt wurden (Coquelle A et al. 1998; Debatisse M et al. 1998; Ciullo M et al. 2002; Hellman A et al. 2002). Dabei konnte für das chemische Agens Aphidikolin (Hypoxia) eine Fusion und gezielte Reintegration von *dmins* innerhalb von fragilen Stellen und die Ausbildung von *HSRs* nachgewiesen werden (Coquelle A et al. 1998). In Tumoren, in denen keine fragile Stellen vorhanden sind, können Rekombinationsereignisse zur Ausbildung von Amplifikationen führen (Yoshitaka Kuwahara et al. 2004; Slack A 2006).

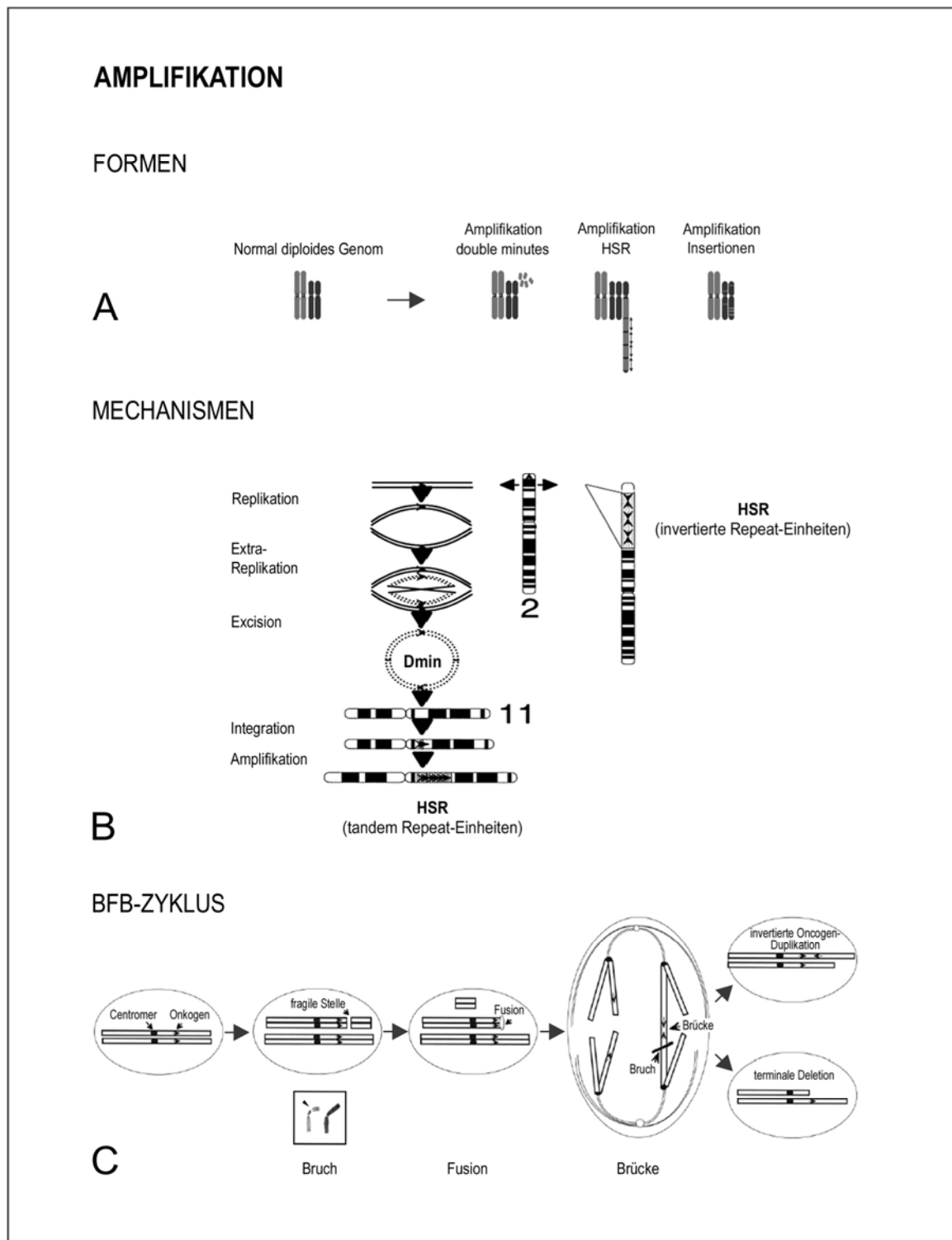


Abb. 52: Formen (A) und Mechanismen (B) der DNA-Amplifikation und schematische Darstellung des BFB-Mechanismus (C). DNA-Amplifikation kann in verschiedenen Formen existieren (A): Im Tumor kann die DNA-Amplifikation als double minutes (*dm*ins), homogeneously staining regions (*HSRs*) oder in Form von Insertionen über das gesamte Genom verteilt vorliegen. Mögliche Mechanismen der DNA-Amplifikation am Beispiel des *MYCN*-Gens in Neuroblastomen (B): DNA-Amplifikation kann durch ungeplante Replikation, Ausschluss und Reintegration von genetischem Material zur Entstehung von tandemförmigen und invertierten Repeat-Einheiten in Form von *dm*ins oder *HSRs* führen. Dabei kann die Amplifikation eines Gens auf ein Chromosom (2) beschränkt sein oder auf andere Chromosomen (11) übertragen werden. BFB-Zyklus (C): In diesem Prozess fördert ein DNA-Doppelstrangbruch eine Fusion von Chromosomenenden und die Ausbildung eines dizentrischen Chromosoms, das innerhalb der Anaphase der mitotischen Zellteilung brechen und zu einem Chromosom mit einer invertierten Duplikation von terminalen Sequenzen führen kann. Quellen modifiziert: Albertson 2006 (A) und Schwab 1999 (B, C).

Die Identifizierung und die Bestimmung amplifizierter DNA in Tumorzellen ist eine Strategie zur Isolierung zellulärer Gene, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Tumoren haben (Schwab 1999). Amplifizierte DNA dient dabei als diagnostischer Marker und ist ein Indikator für eine bestimmte Amplifikationsregion die möglicherweise Kandidaten-Onkogene enthält (Albertson 2006). Weil Amplifikationen häufig mit einem schlechten Verlauf von Tumoren assoziiert sind und ein Mechanismus zur Resistenz gegenüber chemischen Agenzien darstellen, ist eine Identifikation und Charakterisierung der Gene wichtig (Albertson 2006).

Mit Hilfe molekularzytogenetischer Methoden wie die CGH konnten bis heute eine steigende Anzahl amplifizierter Regionen untersucht und verschiedene Gene der Amplifikation in unterschiedlichen Tumoren nachgewiesen werden (Schwab 1999). Im Prostatakarzinom konnten Onkogene wie z.B. *MYC* (8q24), *HER2/NEU* (17q21) oder der Androgen-Rezeptor, *AR* (Xq11) identifiziert und mit der Tumorprogression assoziiert werden (Jenkins et al. 1997; Visakorpi et al. 1999; Porkka und Visakorpi 2004). Auf Chromosom 3q konnten Gewinne von genetischem Material in 50% der untersuchten Prostatakarzinome nachgewiesen und auf die Region 3q25-q26 eingegrenzt werden (Sattler et al. 1999, 2000). Ähnliche Häufigkeiten von 3q-Gewinnen konnten auch durch weitere Studien beschrieben werden, in denen DNA-Amplifikationen vom Zentromer bis zur Region 3q26 reichten (Cher et al. 1996; Strohmeyer et al. 2004).

Neben der CGH konnten in den letzten Jahren verschiedene molekular-zytogenetische und molekulargenetische Methoden wie z.B. die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), den Southernblot, die Mikrosatelliten-Analyse oder die PCR-Amplifikation für Gendosis-Untersuchungen verwendet werden (Ma und Chen 2007; Kallioniemi et al. 1992; Schwab 1999). Aufgrund ihrer begrenzten Auflösung (CGH, PCR), verschiedenen zeitaufwendigen Optimierungen (Mikrosatelliten-Analyse) und die Notwendigkeit hoher Mengen an DNA (Southernblot) sind sie zur quantitativen Untersuchung spezifischer Zielgene ungeeignet (Schwab 1999; Jung et al. 2000; Kubista et al. 2006). Die *real-time* PCR stellt eine molekular-genetische Methode dar, die zur quantitativen Untersuchung putativer Kandidaten-Onkogene geeignet ist (Yun et al. 2006). Aufgrund seines großen dynamischen Bereichs, der Abwesenheit von post-PCR-Untersuchungen und einer Hoch-Durchsatz-Screening-Kapazität wird sie zunehmend in der molekularen Diagnostik und der biomedizinischen Forschung verwendet (Ding und Cantor 2004; Arya et al. 2006; Hoebeek et al. 2007). Zur quantitativen Untersuchung der Amplifikationsregion 3q25-q26 wurde in dieser Arbeit die *real-time* PCR-Technik verwendet.

4.2 Quantitative *real-time* PCR

Zur quantitativen Untersuchung putativer Zielgene innerhalb der Amplifikationsregion 3q25-q26 wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene *real-time* PCR-Methoden verwendet und auf dem LightCycler-System (Roche) durchgeführt (Kapitel 2.2.8). Während zur Untersuchung von Genamplifikationen (DNA-Genkopienzahlgewinne) eine neue *real-time* PCR-Methode entwickelt wurde (2.2.8.1), erfolgte die Untersuchung der Expression der Gene mit Hilfe einer bereits etablierten *real-time* RT-PCR Methode (*RelQuant*, Roche) zur quantitativen Bestimmung von Gentranskripten (2.2.8.2). Beide Methoden basieren auf dem Prinzip der relativen Quantifizierung, in der die Konzentration eines Zielgens im Verhältnis (Ratio) zur Konzentration eines Referenzgens untersucht wird.

Die Methode der *real-time* PCR beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR (Saki RK et al. 1985), wobei durch Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen die Konzentration der PCR-Produkte über einen PC-Monitor in Echtzeit überwacht und mit Hilfe einer Software quantitativ bestimmt werden kann (Kapitel 2.2.7). Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt über die Fluoreszenzmessung des DNA-bindenden Farbstoffs SYBR-Green-I, der sequenzunabhängig aber spezifisch an die dsDNA bindet (Kapitel 2.2.7.3). Die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs ist zur Konzentration des neu-gebildeten PCR-Produkts direkt proportional und kann mit Hilfe der LightCycler-Software einem bestimmten CP-Wert zugeordnet werden, der sich aus der Anzahl an PCR-Zyklen in einer PCR-Reaktion ergibt (Kapitel 2.2.7.4). Die Anzahl der PCR-Zyklen wird benötigt um die Menge der amplifizierten DNA-Moleküle in der PCR-Reaktion zu bestimmen (Kubista et al. 2006).

Die neuentwickelte Methode (Kindich et al. 2005) stellt eine Modifikation der nach Livak und Schmittgen (2001) etablierten $2(-\Delta\Delta C(T))$ -Methode dar, bei der das PCR-Signal eines Zielgens in dem zu untersuchenden Gewebe (Tumor) im Verhältnis (Ratio) zu einem Kontroll-Gewebe (Blut) gebracht und auf ein Referenzgen (Haushaltsgen) normalisiert wird (Livak und Schmittgen, 2001). Zur Bestimmung der *real-time* PCR-Ergebnisse wurden die CT-Werte von Zielgen und Referenzgen (ΔCT) in dem zu untersuchenden Gewebe und Kontrolle (ΔCT) voneinander abgezogen und in Form eines Delta-Delta-CT-Wertes ($\Delta\Delta CT$) angegeben (Kapitel 2.2.8.1). Die Zahl 2 stellt dabei die Effizienz der PCR-Reaktion dar, die sich aus den theoretischen Effizienzwerten von Ziel- und Referenzgen ergeben. Das Ergebnis der Methode wird in Form einer Ratio dargestellt und als x-fache Expression eines Zielgens gegenüber einem Referenzgen in dem zu untersuchenden Gewebe gegenüber einer Kontrolle bezeichnet.

Als eine Modifikation der 2(-Delta Delta C(T))-Methode stellt die neue *real-time* PCR-Methode eine effizienz-korrigierte Methode dar, in der die PCR-Effizienz für jedes untersuchte Gen einzeln bestimmt und in die Berechnung der *real-time* PCR-Ergebnisse einbezogen wurde. Die relative Genkopienzahl konnte damit aus den optimalen *real-time* PCR-Effizienzen und den CT-Wert-Abweichungen der untersuchten Gene (Zielgen/Referenzgen) in den Geweben (Tumor/Normalgewebe) bestimmt werden (2.2.8.1). Zur optimalen Darstellung der *real-time* PCR-Ergebnisse wurden die relativen Genkopienzahlen mit dem Faktor 2 multipliziert, der sich aus dem diploiden Chromosomensatz der Kontroll-Probe (Blut) ergibt. Die Untersuchung der Genkopienzahl-Veränderungen wurde nach der Bestimmung der Grenzwerte durchgeführt (Kapitel 3.1.8).

Eine weitere Modifikation der *real-time* PCR-Methode kommt in der Art der Untersuchung der einzelnen Gene erzielt werden. Im Gegensatz zur relativer Quantifizierungen, in der das Ziel- und Referenzgen in einem PCR-Lauf gemeinsam bestimmt werden, wurde in dieser *real-time* PCR-Methode das Ziel- und Referenzgen in getrennten PCR-Reaktionen zu den jeweils optimalen PCR-Bedingungen durchgeführt (Kapitel. 3.1). Diese Art der Untersuchung wurde speziell zur Screening-Analysen putativer Zielgene innerhalb der Amplifikationsregion 3q25-q26 entwickelt, da eine Etablierung optimaler PCR-Bedingungen für die gleichzeitige Untersuchung unbekannter Ziel- und Referenzgene nicht möglich war. Die Normalisierung der einzelnen PCR-Daten erfolgte mit Hilfe einer PCR-Lauf-internen Kontrolle, die gleichzeitig auch als Calibrator verwendet wurde.

Zur Etablierung der *real-time* PCR-Methode wurden Untersuchungen durchgeführt die die Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Effizienz der PCR-Methode berücksichtigt haben.

Die Sensitivität der *real-time* PCR-Methode wurde so eingestellt, dass eine von zwei Genkopien unterschieden werden konnten. Am Beispiel des Androgenrezeptorgens (*AR*) auf Chromosom Xq12 und normalen Blutproben unterschiedlichen Geschlechts konnte Leukozyten-DNA von männlichen und weiblichen Probanden bestimmt und ein einfacher Chromosomensatz (XY, männlich) vom doppelten Chromosomensatz (XX, weiblich) unterschieden werden (Kapitel 3.1.5). Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde das autosomale Gen Topoisomerase-2-Beta (*TOP2B*) auf Chromosom 3p verwendet. Während für das Gen *TOP2B* zwischen männlicher ($2,12 \pm 0,22$) und weiblicher Leukozyten-DNA ($2,02 \pm 0,22$) kein Unterschied festgestellt wurde, konnte für das Androgenrezeptorgen eine Genkopienzahl von $1,18 \pm 0,18$ für männliche und $2,27 \pm 0,34$ für weibliche DNA bestimmt und ein Unterschied von 1,09 Kopien nachgewiesen werden.

Die Reproduzierbarkeit der *real-time* PCR-Methode wurde am Beispiel zweier Experimente durchgeführt, in denen sowohl einzelne Messwerte (CP-Werte) als auch einzelne PCR-Ergebnisse (Genkopienzahlen) untersucht wurden (Kapitel 3.1.6). Die Reproduzierbarkeit einzelner CP-Werte konnte an *Intra*- und *Inter*-PCR-Experimenten am Beispiel der Gene *GAPDH*, *NKX3.1* und *MYC* nachgewiesen werden, in denen Mehrfachmessungen (5x) einer Standard- (COLO320DM) und Kontroll-DNA (Blut) an drei verschiedenen Tagen *Intra*- und *Inter*-PCR-Varianzen von 0,07 und 0,09 für *GAPDH* sowie 0,09 und 0,10 für *MYC* ergeben haben. Im Falle des Gens *NKX3.1* war eine erhöhte *Intra*- und *Inter*-PCR-Varianz von 0,21 und 1,25 auf eine Verschiebung der Messwerte in der Kontroll-DNA zurückzuführen. Eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zweier *real-time* PCR-Experimente wurde am Beispiel des Kontrollgens *TOP2B* an Prostatakarzinomproben und Zelllinien durchgeführt und zeigte eine Standardabweichung der Genkopienzahlen zweier PCR-Experimente zwischen 0,01 und 0,56 Genkopien.

Die PCR-Effizienz stellt ein Parameter dar, der die Sensitivität und Reproduzierbarkeit der *real-time* PCR beeinflussen kann (Kapitel 2.2.7.6). Zur Optimierung der PCR-Ergebnisse wurde die *real-time* PCR-Effizienz aus PCR-Lauf-internen Standardkurven bestimmt, die aus DNA der Zelllinie COLO320DM bzw. DU145MN1 für jedes Gen generiert wurden (Kapitel 3.1.7). Sie ist mit der Effizienz von PCR-Lauf-externen Standardkurven vergleichbar, die zum Test der PCR-Primer dienen. Am Beispiel der Gene *GAPDH*, *TOP2B* und *TLOC1* konnten hohe Effizienz-Werte zwischen 1,93 und 2,02 nachgewiesen werden.

Entsprechend der Genauigkeit der *real-time* PCR-Methode haben Untersuchungen der *MYC*-Genkopienzahl in Prostatakarzinomzelllinien eine hohe Übereinstimmung mit vorher von Lensch und Mitarbeiter (2002) beschriebenen FISH-Ergebnissen (Kapitel 3.4) gezeigt. In 4 von 5 untersuchten Prostatakarzinomzelllinien (PC3-13, PC3-16, DU145, DU145MN1) konnten die Ergebnisse der FISH-Untersuchung bestätigt und ein Cluster an *MYC*-Signalen in der Prostatakarzinomzelllinie auf 24 Genkopien bestimmt werden.

Zusammenfassend stellt diese *real-time* PCR-Methode eine effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmethode dar, die durch eine getrennte Untersuchung von Referenz- und Zielgenen an jeweils optimalen PCR-Bedingungen zur Einzelgen- und Screening-Analyse mehrerer Gene parallel geeignet ist. Durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green-I konnte ein kostengünstiger Nachweis der *real-time* PCR-Produkte erzielt werden.

4.3 Untersuchung der Gene *NKX3.1* und *MYC*

Um die Nützlichkeit dieser *real-time* PCR Methode zu demonstrieren (Kindich et al. 2006), wurden in dieser Arbeit die Kopienzahlen der Gene *NKX3.1* und *MYC* auf Chromosom 8 in Prostatakarzinomen untersucht (Kapitel 3.5). Beide Gene sind innerhalb verschiedener chromosomaler Regionen lokalisiert, in denen Veränderungen von genetischem Material zur Karzinogenese des Prostatakarzinoms führen (Schulz et al. 2003).

Im Prostatakarzinom ist das Tumorsuppressorgen *NKX3.1* auf Chromosom 8p21 häufig verloren und das Onkogen *MYC* auf Chromosom 8q24 häufig gewonnen. Ein Verlust von *NKX3.1* konnte vorwiegend in frühen Stadien des Prostatakarzinoms, ein Gewinn von *MYC* häufig in fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms nachgewiesen werden. Beide Gene konnten auf Chromosom 8 vereinzelt oder gemeinsam nachgewiesen und mit einem höheren Tumorstadium und Malignitätsgrad assoziiert werden (Macoska et al. 2000; Steiner et al. 2002; Tsuchiya et al. 2002).

Der biologische Grund für diese Befunde ist noch nicht eindeutig verstanden. Eine plausible aber ungeprüfte Hypothese ist, dass die Progressionsrate des Prostatakarzinoms vom Gleichgewicht verschiedener Gene auf Chromosom 8p und 8q abhängig ist. Um beide Veränderungen gleichzeitig zu erfassen wurden die Kopienzahlen der Gene *NKX3.1* und *MYC* untersucht (Kindich et al. 2006), das Verhältnis beider Gene in Form einer Ratio *NKX3.1/MYC* bestimmt und mit histopathologischen, klinischen und molekular-genetischen Parametern korreliert (Kapitel 3.5).

Die Kopienzahlen der Gene *NKX3.1* und *MYC* wurden an 63 Prostatakarzinomproben untersucht. Das Gen *NKX3.1* war in 42 (66,7%) Fällen verändert. Ein Verlust von *NKX3.1* konnte in 32 (50,8%) Fällen, ein Gewinn in 10 (15,9%) Fällen nachgewiesen werden. Das *MYC*-Gen war in 43 (68,3%) Prostatakarzinomproben verändert. Ein Gewinn von *MYC* konnte in 39 (61,9%) Fällen und ein Verlust in 4 (6,4%) Fällen nachgewiesen werden. Für die Ratio *NKX3.1/MYC* konnten Veränderungen in 45 (71,4%) der untersuchten Prostatakarzinomproben nachgewiesen werden. Eine verminderte Ratio *NKX3.1/MYC* konnte in 43 (68,3%) Fällen und eine erhöhte Ratio in 2 (3,2%) Fällen festgestellt werden.

Ein gleichzeitiger *NKX3.1*-Verlust und *MYC*-Gewinn konnte in 17 (27%) Fällen nachgewiesen werden, in denen die meisten (15) ein fortgeschrittenes Tumorstadium (pT3/4) hatten. Die Untersuchung der Ratio *NKX3.1/MYC* ergab für diese *real-time* PCR-Methode eine 66%ige Sensitivität und eine 87%ige Spezifität in der Identifizierung von Prostatakarzinomproben die ein pT2-Stadium überschritten haben.

Eine signifikante Korrelation der *real-time* PCR-Ergebnisse mit histopathologischen, klinischen und molekulargenetischen Parametern konnte für den Verlust von *NKX3.1*, den Gewinn von *MYC* und der Ratio *NKX3.1/MYC* nachgewiesen werden. Dabei konnte der Verlust von *NKX3.1* mit dem Tumorstadium ($p=0,03$ für pT2 gegen pT3/4), der Gewinn von *MYC* mit dem Malignitätsgrad ($p=0,03$ für Gleason-Summe <7 gegen ≥ 7) und die Ratio *NKX3.1/MYC* mit dem Tumorstadium ($p=0,002$ für pT2 gegen pT3/4) korreliert werden. Die höchste Korrelation konnte dabei für die Ratio *NKX3.1/MYC* und dem Tumorstadium nachgewiesen werden, wobei eine signifikante Trennung zwischen organbegrenzte (pT2) und organüberschreitende Tumore (pT3/4) erzielt werden konnte.

Wenn die Ratio *NKX3.1/MYC* an einer größeren Anzahl an Tumoren bestätigt werden kann, könnte die Ratio *NKX3.1/MYC* ein nützlicher Zusatz zu den zurzeit benutzten Nomogrammen (Grading, Staging, PSA-Wert) sein. Ein Vorteil dieser Methode in der klinischen Anwendung würde in der Geschwindigkeit der Durchführung dieser Untersuchungen und den Bedarf minimaler Mengen an DNA liegen. Diese *real-time* PCR-Methode könnte dann an Biopsieproben mit einem geringen Anteil an Tumorzellen verwendet werden. Daten über das Stadium der Tumorausbreitung könnten bereits vor einer operativen Behandlung verfügbar sein und zur Verbesserung der Therapie von Prostatakarzinompatienten benutzt werden.

Zusammenfassend lassen diese Untersuchungen vermuten, dass die Bestimmung der Ratio *NKX3.1/MYC* ein nützlicher molekularer Marker zur Vorhersage des Prostatakarzinomstadiums darstellen könnte. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit des Markers *NKX3.1/MYC* sind aufgrund der geringen Fallzahl an Prostatakarzinomen mit gleichzeitigem *NKX3.1*-Verlust und *MYC*-Gewinn weitere Untersuchungen nötig.

4.4 Charakterisierung der Region 3q25-q26 im Prostatakarzinom

Zum Hauptziel dieser Arbeit gehörte die weitere Charakterisierung einer Amplifikations-einheit auf Chromosom 3q, die durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe cytogenetischer (CGH) und molekulargenetischer Methoden (comparative PCR) in 50% der untersuchten Prostatakarzinome identifiziert und auf die Region 3q25-q26 eingeschränkt werden konnte (Sattler et al. 2000). Die weitere Charakterisierung der Amplifikationsregion 3q25-q26 wurde mit Hilfe der *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung* (FISH) und der *real-time* PCR-Methode an Prostatakarzinomzelllinien und Prostatatumoren durchgeführt.

Während mit Hilfe der FISH-Methode und 22 BAC-spezifischen Klonen die Amplifikationsregion bestätigt und auf eine 700 kb große Region auf 3q26.2 eingegrenzt wurde, konnten ausgewählte Gene innerhalb der Region 3q25-q26 mit Hilfe der *real-time* PCR/RT-PCR-Methode auf DNA-Amplifikation und RNA-Überexpression untersucht werden (Kapitel 3.6).

Die Untersuchung putativer Zielgene auf Amplifikation wurden mit Hilfe der *real-time* PCR-Methode an 5 Prostatakarzinomzelllinien (PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145, DU145MN1) und 22 nativen Prostatakarzinomproben durchgeführt. In den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien konnten Kopienzahlgewinne für die Gene *IL12A*, *MDS1*, *hTERC*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* in mindestens zwei Zelllinien nachgewiesen werden. Nach Eingrenzung der Amplifikationsregion konnte in den Prostatakarzinomproben die Gene *hTERC*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* untersucht und *TLOC1* mit der höchsten Amplifikationshäufigkeit in 50% der Fälle nachgewiesen werden. Weniger häufig erhöht waren die Gene *SAMD7* und *SLC2A2* in 32% und 27% der Fälle und die Gene *hTERC* und *PIK3CA* in jeweils 9% der Fälle. *SKIL*-Genkopienzahlgewinne konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung putativer Zielgene auf mRNA-Überexpression wurde mit Hilfe einer bereits etablierten realtime RT-PCR-Methode (RelQuant, Roche) an 5 Prostatakarzinomzelllinien (PC3-13, PC3-16, PC3-24, DU145, DU145MN1) und 13 nativen Prostatakarzinomproben durchgeführt (Kapitel 3.6.3). In den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien konnten Kopienzahlgewinne für die Gene *hTERC*, *SAMD7*, *TLOC1*, *SKIL*, *SLC2A2* und *PIK3CA* in mindestens zwei Zelllinien nachgewiesen werden. Nach Untersuchung der Prostatakarzinomproben konnte eine mRNA-Überexpression des Gens *TLOC1* in 100% der Fälle nachgewiesen werden. Seltener zeigte sich eine Überexpression für die Gene *SLC2A2* (62%), *PIK3CA* (54%) und *hTERC* (39%).

Eine Überexpression von *SAMD7* gegenüber gepoolter mRNA aus normalen Prostaten konnte in keiner Tumorprobe nachgewiesen werden. Da sich die *TLOC1*-mRNA-Überexpression nicht auf Tumore mit einer *TLOC1*-Amplifikation beschränkt, ist zu vermuten, dass die Amplifikation nur einen von mehreren Mechanismen darstellt, die zu einer Überexpression dieses Gens führen. Die hohe Amplifikations- und mRNA-Überexpressionshäufigkeit macht *TLOC1/SEC62* zum wichtigsten Kandidatengen innerhalb der Region 3q25-q26 beim Prostatakarzinom. Diese Vermutung wurde durch Western-blot-Analysen gestützt, die eine bis zu 3,5-fache Zunahme der *TLOC1/Sec62*-Protein-

Expression in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien (PC3, DU145, DU145MN1) ergaben (Kapitel 3.6.4). Die Bedeutung dieses Gens in der Prostatakarzinomentwicklung wird unterstrichen durch Untersuchungen von Gewebeproben aus Prostata mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) und anderen Normalgeweben (Milz, Niere, Fibroblasten), wo jeweils nur in einem Drittel der untersuchten Fälle eine mRNA-Überexpression von *TLOC1/SEC62* nachweisbar war und die Expressionszunahme deutlich geringer ausfiel als in den untersuchten Prostatakarzinomproben (Kapitel 3.6.3.4 und 3.6.3.5).

Im Prostatakarzinom konnte ein klinischer Zusammenhang zwischen dem *TLOC1/SEC62*-Gen und der Tumorprogression nachgewiesen werden (Kapitel 3.6.2.3). Dabei konnte beobachtet werden, dass Tumore von Patienten, bei denen innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes keine Progression nach radikaler Prostatektomie auftrat, eine signifikant höhere *TLOC1/SEC62*-Genkopienzahl nachgewiesen werden konnte, als bei Patienten mit einer Progression ($p=0,002$). Teilt man die Tumorpatienten in zwei Gruppen mit und ohne *TLOC1/SEC62*-Amplifikation ein, so konnte statistisch ($p=0,051$) ein längeres progressionsfreies Intervall für die Gruppe mit einer *TLOC1/SEC62*-Amplifikation nachgewiesen werden als in der Gruppe ohne Genamplifikation. Diese Befunde lassen vermuten, dass eine Überrepräsentation des *TLOC1/SEC62*-Gens in der Tumorgenese des Prostatakarzinoms eine wichtige Rolle spielt und möglicherweise einen protektiven Schutz gegenüber einer Progression des Prostatakarzinoms darstellt.

Obwohl Gewinne von genetischem Material auf Chromosom 3q26 neben dem Prostatakarzinom auch in anderen malignen Tumoren, wie dem Cervixkarzinom (Heselmeyer-Haddad et al. 2005), dem Ovarialkarzinom (Arnold et al. 1996), dem Bronchialkarzinom (Brass et al. 1997), dem Ösophaguskarzinom (Imoto et al. 2001) und Karzinomen des HNO-Bereichs (Singh et al. 2001) beschrieben wurden, ergibt sich auf molekularer Ebene hinsichtlich der vermuteten Zielgene der Amplifikation ein recht heterogenes Bild. Während *SKIL* das wahrscheinlichste Zielgen in Ösophaguskarzinomen zu sein scheint (Imoto et al. 2001), wurde in Ovarialkarzinomen eine biologische Rolle für *PIK3CA* (Campbell et al. 2004) und in Cervixkarzinomen für *hTERC* (Heselmeyer-Haddad et al. 2005) nachgewiesen. In den untersuchten Prostatakarzinomproben konnten eine Amplifikation und Überexpression des Gens *TLOC1/SEC62* nachgewiesen werden und *SKIL* und *PIK3CA* als putative Zielgene einer Amplifikation im Prostatakarzinom ausgeschlossen werden. Damit scheint die Region 3q26 mehrere Gene zu beherbergen, die differenziell zur Tumorentwicklung in verschiedenen Organen beitragen.

Die biologische Rolle von *TLOC1/SEC62* in der Pathogenese des Prostatakarzinoms und anderen Tumoren sowie seine Verwendbarkeit als ein Tumor- oder prognostischer Marker ist bislang ungeklärt.

4.5 Molekulargenetische Grundlagen von *TLOC1/SEC62*

Das Gen *TLOC1/SEC62* kodiert für ein 32 kDa Protein (*Sec62p*) das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) von eukaryontischen Zellen lokalisiert ist. Es besitzt eine carboxy- und amino-terminale Domäne und stellt eine essentielle Komponente eines Translokations-Apparates dar, der in eukaryotischen Zellen für den Transport von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen zuständig ist (Deshaies und Schenkman 1989; Rapoport et al. 1996; Wang und Johnsson 2005; Zimmermann et al. 2006).

Der Transport der Proteine vom Cytosol in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums stellt den ersten Schritt der Proteinsekretion dar und ist für die Proteinsynthese von Organellen der Endozytose und Exozytose wichtig (Kalies und Hartmann 1998; Palade 1975). Er dient der strukturellen Modifikation und funktionellen Kontrolle unreifer Vorstufenproteine, die nach ihrem Zusammenbau (Faltung) zu nativen Proteinen in membranumhüllten Vesikel verpackt und über verschiedene zelluläre Kompartimente (Golgi-Apparat, Lysosomen und Endosomen) bis hin zur Cytoplasmamembran transportiert, integriert oder außerhalb der Zelle entlassen werden.

Als erstes in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben erfolgt der Transport der Proteine durch die ER-Membran über einen Membranprotein-Komplex, der aus einem trimeren Sec61-Protein-Komplex (*Sbh1p*, *Sec61p*, *Sss1p*) und einem tetrameren Sec62-Sec63-Protein-Unterkomplex (*Sec62p*, *Sec63p*, *Sec71p*, *Sec72p*) besteht (Deshaies et al. 1991; Panzner et al. 1995; Wittke et al. 2000). Der Sec61-Protein-Komplex hat die Funktion einer Proteintranslokase, die in Form einer Pore oder eines Kanals für die Anbindung und Translokation der Proteine an und durch die ER-Membran zuständig ist (Hanein et al. 1998). Die Translokation der Proteine erfolgt durch Assoziation des Sec61-Protein-Komplexes mit dem Sec62-Sec63-Protein-Komplex und unter Bindung luminaler Chaperone (Kar2p/Hefe, BiP/Säugetiere) an die entstehende Polypeptidkette. Während in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine Assoziation des Sec61-Protein-Komplexes mit dem Sec62-Sec63-Protein-Unterkomplex in Form eines Sec-Komplexes nachgewiesen wurde (Abb. 53 A, C), wird in Säugetieren eine Interaktion vermutet (Wirth et al. 2003).

Der Transport der Proteine durch die ER-Membran kann co-translational während und post-translational nach der Synthese der Vorstufenproteine an die Ribosomen erfolgen. Der Proteintransport findet durch Anbindung der Vorstufenproteine an die ER-Membran, Translokation der Vorstufenproteine und Termination des Translokationsvorgangs in drei wesentlichen Schritten statt (Abb. 54 B, C / 1-3). Die Anbindung der Vorstufenproteine an den Translokations-Apparat erfolgt in Anwesenheit bestimmter Signalsequenzen, die am N-terminalen Ende der entstehenden Polypeptidkette lokalisiert sind. Alleine oder durch Bindung an Ribosomen können sie zwischen den co- und post-translationalen Transport wählen (Ng et al. 1996).

Beim co-translationalen Mechanismus (Abb. 53 B) erfolgt die Anbindung der Vorstufenproteine an die ER-Membran in Gegenwart von Ribosomen und mit Hilfe eines Signal-Erkennungs-Partikels (SRP; signal recognition particle) (Keenan RJ et al. 2001), der an die Signalsequenz des Vorstufenproteins bindet und in Form eines Ribosomen-Protein-SRP-Komplexes zum Signal-Erkennungs-Partikel-Rezeptor (SR) an die ER-Membran leitet. Nach der Erkennung des Ribosomen-Protein-SRP-Komplexes durch den SR-Komplex, wird die Signalsequenz vom SRP freigesetzt und das Vorstufenprotein zur ER-Translokations-Stelle gebracht (Pool et al. 2002). Der Mechanismus wird durch eine Folge der Bindung und Hydrolyse von GTP (Guanosin-Triphosphat) geregelt (Keen et al. 2001). Beim post-translationalen Mechanismus (Abb. 53 C) erfolgt die Anbindung der Vorstufenproteine an die ER-Membran nach ihrer vollständigen Synthese und in Abwesenheit von Ribosomen, einem SRP oder SR.

Nach Anbindung an die ER-Membran erfolgt der Transport der Vorstufenproteine durch den Translokationskanal (Gilmore und Blobel 1985; Hanein et al. 1996) entsprechend einer molekularen Ratsche durch Interaktion der entstehende Polypeptidkette mit dem luminalen Chaperon (Kar2p/Hefe oder BiP/Säugetiere) (Zimmermann et al. 2006). Ein Rücktransport der entstehenden Polypeptidkette in das Cytoplasma der Zelle wird durch BiP verhindert (Zimmermann 2006).

Obwohl die Assoziation von *TLOC1/Sec62* mit dem Sec61p-Komplex in Säugetierzellen im Transportprozess ähnlich dem des Hefe Sec-Komplexes (Tyedmers et al. 2000; Wirth et al. 2003) ist, ist die genaue Funktion des *TLOC1/Sec62*-Proteins in Säugetierzellen noch unbekannt. Unser Befund einer *TLOC1/Sec62*-Überexpression in Prostatakarzinomzellen ist die erste Beschreibung einer TLOC1/SEC62-Überregulation in Tumorzellen überhaupt (Jung et al. 2006).

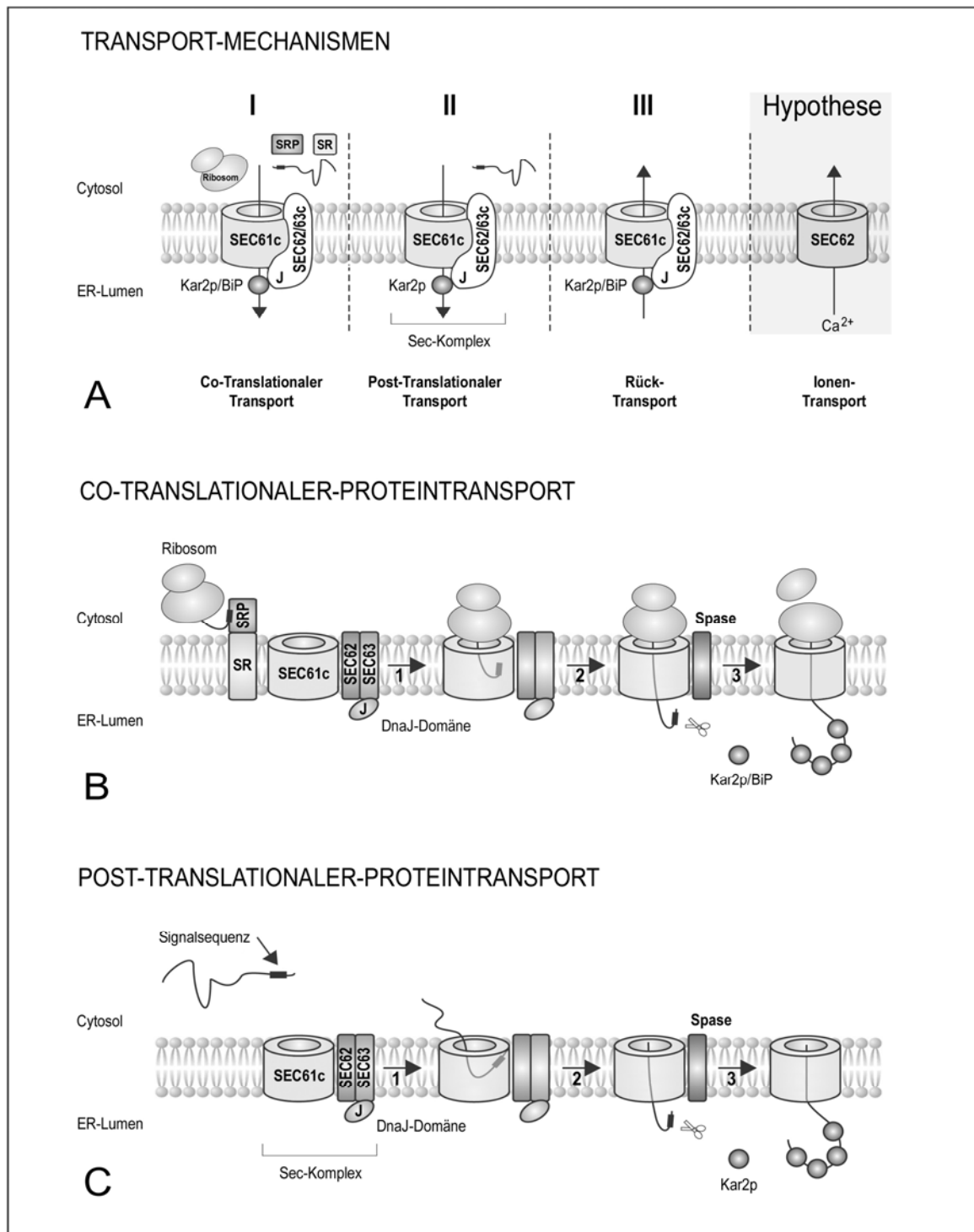


Abb. 53: Schematische Darstellung der Proteintransport-Mechanismen in der ER-Membran (I-III) und mögliche Rolle des Sec62-Proteins im co-translationalen Protein-Transport der Säugetiere, im post-translationalen Protein-Transport der Hefe *saccharomyces cerevisiae*, beim Rücktransport ungefalteter Proteine vom ER-Lumen in das Cytosol und als möglicher eigenständiger Ionenkanal (Hypothese). Der Transport der Proteine erfolgt durch die ER-Membran mit Hilfe eines Protein-Translokations-Apparates, der aus einem trimeren Sec61-Protein-Komplex und einem tetrameren Sec62/63-Protein-Komplex aufgebaut ist. Der co-translationaler Protein-Transport (B) erfolgt während der Synthese der Vorstufenproteine mit Hilfe von Ribosomen. Der post-translationaler Protein-Transport (C) erfolgt nach der Synthese der Vorstufenproteine ohne Ribosomen. Der signalpeptidabhängige Proteintransport (B/C) beginnt mit dem Transport des Polypeptids zur ER-Membran (1). Nach Interaktion mit dem Sec-Komplex und Bindung luminaler Chaperone (Kar2p/Hefe, BiP/Säugetiere) erfolgt der Transport der Proteine durch den Translokationskanal (Sec61p) des Sec61-Komplexes entsprechend einer molekularen Ratsche (2). Die Anlagerung des Proteins Kar2p/BiP verhindert den Rücktransport der entstehenden Polypeptidkette.

4.6 Physiologische Funktion von *TLOC1/SEC62*

Im Prostatakarzinom konnte das Gen *TLOC1/SEC62* in 50% der Fälle als amplifiziert und in 100% der Fälle als überexprimiert nachgewiesen werden (Jung et al. 2006). Eine Überexpression des *Sec62*-Proteins (*Sec62p*) konnte durch Westernblot-Untersuchungen in Prostatakarzinomzelllinien bestätigt werden. Interessanterweise war dabei eine erhöhte *SEC62*-Genkopienzahl in Prostata Tumoren von Patienten mit einem geringeren Risiko einer Rezidiv und einem langsameren Krankheitsverlauf nach radikaler Prostatektomie festzustellen. Aufgrund dieser Befunde ist zu vermuten, dass eine Überexpression des *SEC62*-Gens zur Pathogenese des Prostatakarzinoms beitragen kann oder als ein positiver Mechanismus zum Schutz vor einer Tumorprogression darstellt.

Im Prostatakarzinom ist eine Protein-Überexpression von *SEC62* mit einem proliferativen Vorteil assoziiert (Zimmermann et al. 2006). Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass das *SEC62*-Gen in Prostatakarzinomzellen höher exprimiert ist als in BPH- (Kapitel 3.6.3.4) und Normalgewebe-Proben (Kapitel 3.6.3.5). Ein weiterer Beweis für eine Protein-Überexpression des *TLOC1/SEC62*-Gens konnte für das orthologe *SEC62*-Gen *DTRP1* in den Paragonial-Drüsen von *Drosophila* nachgewiesen werden, die den Prostata Drüsen im Menschen funktionell entsprechen (Noel und Cartwright 1994). Westernblot-Untersuchungen an Hundepankreas lassen vermuten, dass *SEC62* an der Translokation von Proteinen beteiligt ist und durch Interaktion mit dem *SEC61*-Komplex und *Sec63* im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums zurückgehalten wird. Wenn überexprimiert, könnte *SEC62* die ER durch den vesikulären Transport verlassen und auf dem Weg des sekretorischen Zyklus eine neue noch unbekannt Funktion ausüben, die nicht mit der Translokation verbunden ist (Zimmermann 2006).

Eine weitere Funktion von *Sec62* könnte ein möglicher nicht-selektiver Kationenkanal sein, wie in der Protein-Datenbank (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>, Saier MH 2000) erwähnt. Dabei könnte *Sec62* als ein Ionenkanal in den Prostatazellen (z.B. Plasmamembran) auch unter normalen Bedingungen handeln. Im Falle einer größeren Überproduktion im Vergleich zum normalen Prostatagewebe, könnte eine erhöhte Ionenkanal-Aktivität zu einem proliferativen Vorteil führen (Zimmermann 2006). Diese Hypothese wird unterstützt durch eine Genexpressions-Studie an sporadischen colorektalen Tumoren, in denen eine *Sec62*-Protein-Überproduktion als ein Teil von 43-Genen verwendet wurde um den Langzeit-Erfolg von colorektalen Tumorpatienten vorherzusagen (Eschrich et al. 2005).

Zusammenfassend kann ein *SEC62-SEC63*-Ungleichgewicht zur Entwicklung von humanen Tumorerkrankungen beitragen, indem eine Relokalisation des unkomplexierten *SEC62* an einem anderen Standort entlang des sekretorischen Weges stattfindet. Diese Relokalisation ist mit einem proliferativen Vorteil assoziiert, der zur Tumorgenese führen kann (Zimmermann et al. 2006).

Bis heute konnten Verschiedene humane Erkrankungen mit dem Protein-Netzwerk im ER-Lumen assoziiert werden, der für den Import, Export und die Faltung von Proteinen wichtig ist. Hefe *SEC*-Mutanten, die mit der humanen Erkrankung assoziiert sind zeigen typischerweise Defekte im Proteintransport in das ER (Zimmermann et al. 2006).

Mutationen im *SEC63*-Gen verursachen eine autosomal-dominante polyzystische Lebererkrankung (ADPLD; OMIM 174050) (Davila et al. 2004). Dabei führen im *SEC63*-Gen verschiedene Mutationen (frameshift, nonsense) zur vorzeitigen Termination der Polypeptid-Synthese und zum Verlust der *SEC63*-Protein-Funktion. Der Verlust der Funktion des Sec63-Proteins ermöglicht, dass Proteine nicht mehr aus dem Cytosol in das ER-Lumen transportiert werden können und dadurch möglicherweise einen proliferativen Vorteil bekommen könnten (Zimmermann et al. 2006).

Mutationen im humanen und murinen *SIL* führen zu neurogenerativen Erkrankungen wie dem Marinesco-Sjögren Syndrom (MSS; OMIM 248800) (Anttonen et al. 2005). *SIL* ist ein nukleotid-exchange factor (NEF) für BiP mit der Funktion, einen funktionellen BiP für die Zelle bereitzustellen (Zimmermann et al. 2006). Neueste Studien haben eine humane infektiöse Erkrankung mit dem ER-Chaperon BiP assoziiert (Paton et al. 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Cytotoxin AB5-Subtilase das Endo-plasmatische-Retikulum-Chaperon BiP inaktiviert (Paton et al. 2006). Das AB5-Subtilase-Cytotoxin bestimmter pathogener Bakterien verursacht Morbidität und Mortalität unter Kindern in den Entwicklungsländern durch Inaktivierung von BiP.

Da es bisher keine Untersuchungen zu einem Zusammenhang zwischen einer *TLOC1/Sec62*-Proteinüberexpression und der Entwicklung eines menschlichen Tumors gibt, ist es notwendig die klinische Bedeutung und physiologische Funktion von *TLOC1/SEC62* als Tumor oder Prognosemarker zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die Genamplifikation spielt in der Entstehung und Progression von Tumoren eine wichtige Rolle. Sie führt zu einer zunehmenden genomischen Instabilität und betrifft Onkogene, die für die Kontrolle und Regulation bestimmter zellulärer Prozesse zuständig sind. Im Prostatakarzinom konnten auf Chromosom 3q Gewinne von genetischem Material in 50% der Tumore nachgewiesen und auf die chromosomale Region 3q25-q26 eingegrenzt werden (Sattler et al. 1999, 2000).

Entsprechend dem Ziel dieser Arbeit diese chromosomale Region im Prostatakarzinom zu charakterisieren und mögliche Zielgene der Amplifikation zu identifizieren, wurden FISH-Analysen an Prostatakarzinomzelllinien durchgeführt um die Amplifikationseinheit zu bestätigen und weiter einzugrenzen und quantitative *real-time* PCR und RT-PCR-Analysen an Prostatakarzinomzelllinien und Prostatakarzinomproben um ausgewählte Zielgene auf Amplifikation und mRNA-Überexpression zu testen (Jung et al. 2006).

Zur Untersuchung der Genamplifikation wurde eine modifizierte *real-time* PCR-Methode entwickelt (Kindich et al. 2005), die zur quantitativen Bestimmung von DNA-Genkopienzahlen geeignet ist. Sie wurde am Beispiel zweier Gene auf Chromosom 8 validiert, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung (*NKX3.1*, 8p21) und Progression (*MYC*, 8q24) des Prostatakarzinoms spielen. Als bester Parameter zur gleichzeitigen Identifizierung von frühen und fortgeschrittenen Tumoren wurde die Ratio *NKX3.1/MYC* bestimmt, die mit dem Tumorstadium ($p=0,002$) assoziiert und als möglicher signifikanter Prädiktor für eine Progression des Prostatakarzinoms nachgewiesen werden konnte (Kindich et al. 2006).

Innerhalb der chromosomalen Region 3q25-q26 als amplifiziert nachgewiesene Gene konnten an Prostatakarzinomzelllinien und Prostatakarzinomproben mit Hilfe einer bereits etablierten *real-time* RT-PCR-Methode (*Relquant*, Roche) auf mRNA-Überexpression untersucht werden. Unter den am häufigsten amplifizierten (50%) und überexprimierten (100%) Genen konnte in den Prostatakarzinomproben das Gen *TLOC1/SEC62* als Kandidatengen der Region nachgewiesen werden. Eine erhöhte Genkopienzahl und mRNA-Überexpression konnte durch Westernblot-Analysen bestätigt werden, die in Prostatakarzinomzelllinien eine bis zu 3,5-fache *TLOC1/Sec62*-Protein-Überexpression gegenüber der benignen Prostatazelllinie BPH1 nachgewiesen haben (Jung et al. 2006). Eine signifikante Korrelation konnte zwischen einer erhöhten *TLOC1/SEC62* Genkopienzahl und der Tumorprogression nachgewiesen werden ($p=0,002$).

Das Protein *TLOC1/Sec62* ist eine Komponente des Protein-Translokations-Apparates des Endoplasmatischen Retikulums (ER), dessen Funktion in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms unbekannt ist. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und in Säugetieren ist *TLOC1/Sec62* an der co- und post-translationalen Translokation von sekretorischen Proteinen und Membran-Proteinen durch die ER-Membran beteiligt.

6 Summary

Gene amplification plays a significant role in the development and progression of many cancer types. It causes an increased genomic instability and concerns oncogenes which are intended for the control and regulation of several cellular processes. In prostate cancer gene copy number gains on chromosome 3 could be detected in 50% of the tumor samples and narrowed down to the chromosomal region 3q25-q26 (Sattler et al. 1999, 2000).

According to the aim of this study to characterize the chromosomal region 3q25-q26 in prostate cancer and to identify potential target genes of amplification, we used FISH analysis on prostate cancer cell lines to confirm and narrow down the amplification unit and quantitative real time PCR and RT-PCR analysis on prostate cancer cell lines and prostate cancer samples to test selected genes for amplification and overexpression.

The determination of the amplified genes was performed using a modified real time PCR technique for relative gene copy number quantification (Kindich et al. 2005) validated on two genes on chromosome 8 playing a significant role in the development (*NKX3.1*, 8p21) and progression (*MYC*, 8q24) of prostate cancer. The best parameter for a simultaneous identification of early and advanced prostate cancers was the detection of the ratio *NKX3.1/MYC*, which was strongly associated with the tumor stage ($p=0,002$) and proved to be a good predictor for prostate cancer progression (Kindich et al. 2006).

After detection of gene copy number alterations within the chromosomal region 3q25-q26 overexpression of the amplified genes was tested on prostate cancer cell lines and prostate cancer samples using *real-time* RT-PCR analyses with a well-established relative quantification method (*Relquant*, Roche). Among the most frequently amplified (50%) and overexpressed (100%) genes *TLOC1/SEC62* seems to be the best candidate detected in prostate cancer. Protein overexpression of *TLOC1/Sec62p* was confirmed on prostate cancer cell lines with western blot analysis showing an up to 3.5-fold *TLOC1/SEC62* protein overexpression against the benign prostate cell line BPH1. For *TLOC1/SEC62* significant correlation ($p=0,002$) between gene copy number increase and tumor progression could be shown (Jung et al. 2006).

The protein *TLOC1/Sec62* is a component of the endoplasmatic reticulum (ER) protein-translocation apparatus, whose function in the prostate cancer has to be determined. In the yeast *saccharomyces cerevisiae* and mammals *TLOC1/Sec62* is involved in the co- and post-translational translocation of secretory and membrane proteins of the ER-membrane.

7 Anhang

7.1 Real-time PCR-Daten zur Bestimmung der Grenzwerte

Tabelle 38: Genkopienzahlen und Grenzen der Gene *NKX3.1*, *MYC* und deren Ratio *NKX3.1/MYC*

Probe	Genkopienzahl		Ratio
	<i>NKX3.1</i>	<i>MYC</i>	<i>NKX3.1/MYC</i>
B 1	2,19	1,94	1,13
B 2	1,98	1,70	1,16
B 3	1,98	1,55	1,28
B 4	1,91	1,72	1,11
B 5	1,89	1,65	1,14
B 6	2,21	1,76	1,26
B 7	2,53	1,81	1,39
B 8	2,09	1,95	1,08
Mw	2,10	1,76	1,19
± Stw (x2)	0,42	0,27	0,21
Grenzen	2,52	2,03	1,41
	1,67	1,49	0,98

Tabelle 39: Genkopienzahlen und Grenzen der Gene innerhalb der Amplifikationsregion 3q25-q26

Probe	Genkopienzahl				
	<i>TOP2B</i>	<i>IL12A</i>	<i>MDS1</i>	<i>hTERC</i>	<i>SAMD7</i>
B 1	2,39	1,87	2,05	2,04	1,83
B 2	1,95	2,62	2,44	1,39	1,66
B 3	1,82	2,16	2,27	1,72	1,85
B 4	2,19	2,27	1,93	1,94	2,08
B 5	2,05	1,95	1,96	1,84	1,88
B 6	1,96	2,15	2,33	1,92	2,11
B 7	2,04	1,91	2,25	1,82	1,81
B 8	2,10	2,38	2,33	2,35	2,30
Mw	2,06	2,16	2,19	1,88	1,94
± Stw (x2)	0,34	0,52	0,38	0,54	0,42
Grenzen	2,40	2,68	2,57	2,42	2,36
	1,72	1,64	1,81	1,34	1,52

Tabelle 40: Genkopienzahlen und Grenzen der Gene innerhalb der Amplifikationsregion 3q25-q26

Probe	Genkopienzahl				
	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SOX2</i>
B 1	1,84	2,27	1,98	1,86	1,74
B 2	1,47	2,58	2,05	2,20	2,57
B 3	1,80	2,32	1,93	2,20	1,96
B 4	2,27	2,24	1,77	1,99	1,63
B 5	1,90	2,41	2,01	1,93	1,63
B 6	2,20	2,83	1,75	2,08	1,77
B 7	2,13	2,84	1,86	2,07	1,67
B 8	2,39	2,55	2,05	2,27	2,05
Mw	2,00	2,50	1,92	2,08	1,88
± Stw (x2)	0,60	0,48	0,24	0,28	0,64
Grenzen	2,60	2,98	2,16	2,36	2,52
	1,40	2,02	1,68	1,80	1,24

B1-B8 = Blutproben

7.2 Real-time PCR-Daten der Genkopienzahl in Tumorzelllinien

Tabelle 41: Kopienzahlen der Gene der Amplifikationsregion 3q25-q26 in Prostatakarzinomzelllinien

Probe	Genkopienzahl				
	<i>IL12A</i>	<i>MDS1</i>	<i>hTERC</i>	<i>SAMD7</i>	<i>TLOC1</i>
PC3-13	2,41	2,15	2,79	2,30	2,32
PC3-16	1,91	2,20	4,08	3,50	4,07
PC3-24	1,84	4,01	3,51	4,01	4,82
DU145	5,78	3,90	3,17	3,35	3,37
DU145MN1	2,95	2,52	3,91	3,67	3,68
Probe	Genkopienzahl				
	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SOX2</i>	
PC3-13	1,51	1,56	1,56	1,66	
PC3-16	2,94	2,36	1,18	1,36	
PC3-24	3,65	6,18	2,97	3,22	
DU145	3,28	3,94	2,77	2,96	
DU145MN1	2,44	2,60	2,25	1,85	

7.3 Real-time PCR-Daten der Genkopienzahl in Tumoren

Tabelle 42: Kopienzahlen der Gene der Amplifikationseinheit 3q25-q26 in Prostatakarzinomproben

Nr.	Probe	Kopienzahl					
		<i>hTERC</i>	<i>SAMD7</i>	<i>TLOC1</i>	<i>SKIL</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>PIK3CA</i>
1	P47	1,76	2,16	2,37	1,78	1,90	1,88
2	P51	1,91	2,04	1,93	1,87	2,20	1,95
3	P76	1,53	2,34	1,76	2,17	2,03	1,68
4	P91	1,72	2,05	2,04	1,63	2,24	1,62
5	P99	1,90	1,89	1,42	1,64	2,09	2,55
6	P109	1,68	1,81	3,10	1,85	2,08	1,65
7	P129	2,47	2,53	2,99	1,82	2,28	1,90
8	P133	2,03	2,33	2,45	2,10	2,39	1,85
9	P139	1,93	1,91	1,90	2,37	2,37	2,01
10	P143	1,84	2,68	2,25	2,38	2,13	1,84
11	P153	1,40	1,44	2,01	1,50	1,65	1,61
12	P165	2,28	2,50	3,55	2,18	2,03	2,61
13	P167	2,18	2,09	1,98	1,99	2,09	2,03
14	P169	1,81	2,14	3,55	1,87	1,56	1,88
15	P187	1,92	2,04	3,39	2,08	1,87	2,03
16	P201	1,69	2,30	3,03	1,89	1,91	1,74
17	P205	1,80	2,04	3,02	1,76	1,92	1,80
18	P207	2,11	2,26	2,91	1,56	2,06	1,62
19	P209	2,67	2,86	4,89	1,30	2,07	1,68
20	P211	2,17	3,68	3,71	1,76	1,86	1,85
21	P213	2,09	2,37	3,20	2,16	1,96	2,18
22	P219	1,91	2,71	2,36	2,44	2,24	2,18

7.4 Real-time RT-PCR-Daten der Genexpression in Tumorzelllinien

Tabelle 43: Expressionsergebnisse der *real-time* RT-PCR in Prostatakarzinomzelllinien

Gen	<i>hTERC</i>			
Zelllinie	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
PC3-13	404,97	315,01	359,990	5538,31
PC3-16	11,13	9,69	10,410	160,15
PC3-24	100,91	90,36	95,635	1471,31
DU145	2,77	2,51	2,640	40,62
MN1	0,95	0,78	0,865	13,31
LNCAP	1,79	1,73	1,760	27,08
Normal	0,07	0,06	0,065	1,00
Gen	<i>TLOC1</i>			
Zelllinie	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
PC3-13	4,34	4,48	4,410	16,96
PC3-16	1,88	1,70	1,790	6,88
PC3-24	3,11	3,07	3,090	11,88
DU145	2,39	2,33	2,360	9,08
MN1	1,58	0,91	1,245	4,79
LNCAP	4,29	3,80	4,045	15,56
Normal	0,29	0,23	0,260	1,00
Gen	<i>SKIL</i>			
Zelllinie	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
PC3-13	11,72	9,27	10,495	17,20
PC3-16	1,83	1,60	1,715	2,81
PC3-24	2,95	2,93	2,940	4,82
DU145	1,67	2,36	2,015	3,30
MN1	0,55	0,90	0,725	1,19
LNCAP	1,07	0,76	0,915	1,50
Normal	0,58	0,64	0,610	1,00
Gen	<i>SLC2A2</i>			
Zelllinie	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
PC3-13	0,63	-	0,630	1,30
PC3-16	1,60	0,96	1,280	2,64
PC3-24	1,62	1,77	1,695	3,49
DU145	0,67	0,92	0,795	1,64
MN1	1,29	1,00	1,145	2,36
LNCAP	5,19	7,38	6,285	12,96
Normal	0,42	0,55	0,485	1,00
Gen	<i>PIK3CA</i>			
Zelllinie	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
PC3-13	1,57	1,84	1,705	9,22
PC3-16	2,56	3,35	2,955	15,97
PC3-24	2,37	2,37	2,370	12,81
DU145	2,12	1,71	1,915	10,35
MN1	0,82	0,98	0,900	4,86
LNCAP	0,45	0,49	0,470	2,54
Normal	0,19	0,18	0,185	1,00

7.5 Real-time RT-PCR-Daten der Genexpression in Tumoren

Tabelle 44: Real-time RT-PCR-Ergebnisse der Prostatakarzinomproben P201-P219 für das Gen *hTERC*

Gen	<i>hTERC</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
P 201	0,08	0,12	0,100	1,54
P 209	0,64	0,7	0,670	10,31
P213	0,06	0,05	0,055	0,85
P 99	0,28	0,33	0,305	4,69
P 129	0,04	0,04	0,040	0,62
P 133	0,1	0,12	0,110	1,69
P 139	0,32	0,27	0,295	4,54
P 163	0,09	0,1	0,095	1,46
P 167	0,21	0,23	0,220	3,38
P 169	0,06	0,06	0,060	0,92
P 187	0,25	0,14	0,195	3,00
P 205	0,10	0,10	0,100	1,54
P 219	0,64	0,39	0,515	7,92
Normal	0,07	0,06	0,065	1,00

Tabelle 45: Real-time RT-PCR-Ergebnisse der Prostatakarzinomproben P201-P219 für das Gen *TLOC1*

Gen	<i>TLOC1</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
P 201	1,23	1,38	1,305	5,02
P 209	3,34	4,05	3,695	14,21
P213	0,86	0,89	0,875	3,37
P 99	1,6	1,92	1,760	6,77
P 129	1,04	1,47	1,255	4,83
P 133	1,47	1,58	1,525	5,87
P 139	1,50	1,56	1,530	5,88
P 163	0,79	0,84	0,815	3,13
P 167	0,80	0,88	0,840	3,23
P 169	0,77	0,91	0,840	3,23
P 187	1,22	0,98	1,100	4,23
P 205	1,21	1,28	1,245	4,79
P 219	1,53	2,17	1,850	7,12
Normal	0,29	0,23	0,260	1,00

Tabelle 46: *Real-time* RT-PCR-Ergebnisse der Prostatakarzinomproben P201-P219 für das Gen *SKIL*

Gen	<i>SKIL</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
P 201	1,30	1,22	1,260	2,07
P 209	2,47	2,30	2,385	3,91
P213	0,70	0,93	0,815	1,34
P 99	1,00	1,18	1,090	1,79
P 129	2,09	2,54	2,315	3,80
P 133	1,26	1,26	1,260	2,07
P 139	2,57	1,92	2,245	3,68
P 163	0,22	0,35	0,285	0,47
P 167	0,96	0,81	0,885	1,45
P 169	0,70	0,54	0,620	1,02
P 187	1,49	1,23	1,360	2,23
P 205	0,75	0,82	0,785	1,29
P 219	1,03	0,90	0,965	1,58
Normal	0,58	0,64	0,610	1,00

Tabelle 47: *Real-time* RT-PCR-Ergebnisse der Prostatakarzinomproben P201-P219 für das Gen *SLC2A2*

Gen	<i>SLC2A2</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
P 201	2,32	1,63	1,975	4,07
P 209	1,46	1,70	1,580	3,26
P213	2,29	2,02	2,155	4,44
P 99	10,91	6,75	8,830	18,21
P 129	2,10	1,90	2,000	4,12
P 133	9,68	4,13	6,905	14,24
P 139	3,58	4,87	4,225	8,71
P 163	2,21	0,79	1,500	3,09
P 167	1,01	-	1,010	2,08
P 169	2,00	0,41	1,205	2,48
P 187	0,60	1,49	1,045	2,15
P 205	-	1,22	1,220	2,52
P 219	1,79	1,99	1,890	3,90
Normal	0,42	0,55	0,485	1,00

Tabelle 48: *Real-time* RT-PCR-Ergebnisse der Prostatakarzinomproben P201-P219 für das Gen *PIK3CA*

Gen	<i>PIK3CA</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
P 201	0,61	0,70	0,655	3,54
P 209	1,50	1,26	1,380	7,46
P213	0,43	0,33	0,380	2,05
P 99	0,79	0,77	0,780	4,22
P 129	0,83	0,77	0,800	4,32
P 133	0,54	0,48	0,510	2,76
P 139	0,71	0,68	0,695	3,76
P 163	0,19	0,22	0,205	1,11
P 167	0,49	0,55	0,520	2,81
P 169	0,28	0,33	0,305	1,65
P 187	0,56	0,61	0,585	3,16
P 205	0,53	0,52	0,525	2,84
P 219	0,67	0,72	0,695	3,76
Normal	0,19	0,18	0,185	1

7.6 Real-time RT-PCR-Daten der Genexpression in Normalgeweben

Tabelle 49: Real-time RT-PCR-Ergebnisse der Normalgewebeproben

Gen	<i>hTERC</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
Milz	0,86	1,39	1,125	17,31
Niere	0,47	0,90	0,685	10,54
Fibroblasten	0,26	0,31	0,285	4,38
Prostata	0,07	0,06	0,065	1,00
Gen	<i>TLOC1</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
Milz	0,29	0,34	0,315	1,21
Niere	1,71	1,98	1,845	7,09
Fibroblasten	0,30	0,31	0,305	1,17
Prostata	0,29	0,23	0,260	1,00
Gen	<i>SKIL</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
Milz	0,83	0,89	0,860	1,41
Niere	1,66	2,03	1,845	3,02
Fibroblasten	0,23	0,56	0,395	0,65
Prostata	0,58	0,64	0,610	1,00
Gen	<i>SLC2A2</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
Milz	0,20	0,30	0,250	0,52
Niere	3,37	4,50	3,935	8,11
Fibroblasten	0,20	0,51	0,355	0,73
Prostata	0,42	0,55	0,485	1,00
Gen	<i>PIK3CA</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
Milz	0,19	0,15	0,170	0,92
Niere	1,32	1,04	1,180	6,38
Fibroblasten	0,42	0,47	0,445	2,41
Prostata	0,19	0,18	0,185	1,00

Tabelle 50: Real-time RT-PCR-Ergebnisse der BPH-Proben

Gen	<i>TLOC1</i>			
Probe	norm. Ratio		Mittelwert (Exp.1+2)	Ratio Probe/ Normal
	Exp. 1	Exp. 2		
BPH1	1,08	1,31	1,195	4,60
BPH3	0,73	0,75	0,740	2,85
BPH4	0,18	0,18	0,180	0,69
BPH5	0,49	0,40	0,445	1,71
BPH6	0,66	0,78	0,720	2,77
BPH10	1,12	0,92	1,020	3,92
Normal	0,29	0,23	0,260	1,00

7.7 Klinische Daten der untersuchten Prostatakarzinomproben

Tabelle 51: Klinische Daten der Prostatakarzinomproben zur Untersuchung der Genkopienzahl

Nr.	Proben	Tumor Stadium	Gleason Wert	Gleason Summe	DRU	PSA
1	P47	3c	3+4	7	1	10,5
2	P51	2c	3+4	7	0	8,1
3	P76	3b	3+4	7	1	15,3
4	P91	3b	4+5	9	1	22,4
5	P99	2b	3+2	5	1	10,6
6	P109	3a	4+5	9	1	15,3
7	P129	2b	4+3	7	1	3,7
8	P133	2b	4+3	7	1	11,5
9	P139	3b	4+5	9	1	0,3
10	P143	3b	3+5	8	0	12,4
11	P163	3a	3+2	5	0	7,8
12	P165	3a	4+3	7	1	9,8
13	P167	3a	4+5	9	1	38,4
14	P169	3a	3+4	7	1	12,6
15	P187	2b	3+5	8	0	1,5
16	P201	3a	4+4	8	0	10,7
17	P205	3a	4+3	7	0	17,0
18	P207	3b	3+5	8	1	12,5
19	P209	3a	4+3	7	1	1,2
20	P211	3b	5+4	9	1	9,3
21	P213	2a	4+3	7	1	4,4
22	P219	4	4+3	7	1	15,5

Tabelle 52: Klinische Daten der Prostatakarzinomproben zur Untersuchung der Genexpression

Nr.	Probe	Tumor Stadium	Gleason Wert	Gleason Summe	DRU	PSA
1	P99	2b	3+2	5	1	10,6
2	P129	2b	4+3	7	1	3,7
3	P133	2b	4+3	7	1	11,5
4	P139	3b	4+5	9	1	0,3
5	P163	3a	3+2	5	0	7,8
6	P167	3a	4+5	9	1	38,4
7	P 169	3a	3+4	7	1	12,6
8	P 187	2b	3+5	8	0	1,5
9	P 201	3a	4+4	8	0	10,7
10	P 205	3a	4+3	7	0	17,0
11	P 209	3a	4+3	7	1	1,2
12	P 213	2a	4+3	7	1	4,4
13	P 219	4	4+3	7	1	15,5

8 Literaturverzeichnis

Abate-Shen C, Shen MM. (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* Oct 1;14(19):2410-34.

Abdulkadir SA, Magee JA, Peters TJ, Kaleem Z, Naughton CK, Humphrey PA, Milbrandt J. (2002) Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intra-epithelial neoplasia. *Mol Cell Biol.* Mar;22(5):1495-503.

Abdulkadir SA. (2005) Mechanisms of prostate tumorigenesis: roles for transcription factors Nkx3.1 and Egr1. *Ann N Y Acad Sci.* Nov;1059:33-40.

Adhikary S, Eilers M. (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Aug;6(8):635-45.

Albertson DG. (2006) Gene amplification in cancer. *Trends Genet.* Aug;22(8):447-55. Epub Jun 19.

Alers JC, Krijtenburg PJ, Rosenberg C, Hop WC, Verkerk AM, Schroder FH, van der Kwast TH, Bosman FT, van Dekken H. (1997) Interphase cytogenetics of prostatic tumor progression: specific chromosomal abnormalities are involved in metastasis to the bone. *Lab Invest.* Nov;77(5):437-48.

Alers JC, Rochat J, Krijtenburg PJ, Hop WC, Kranse R, Rosenberg C, Tanke HJ, Schroder FH, van Dekken H. (2000) Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest.* Jun;80(6):931-42.

Alers JC, Krijtenburg PJ, Vis AN, Hoedemaeker RF, Wildhagen MF, Hop WC, van Der Kwast TT, Schroder FH, Tanke HJ, van Dekken H. (2001) Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies: early cancers may contain aggressive genetic features. *Am J Pathol.* Feb;158(2):399-406.

Alitalo K, Schwab M. (1986) Oncogene amplification in tumor cells. *Adv Cancer Res.* 47:235-81.

Altwein JE, Mohandessi B. (2000) Early detection of prostate carcinoma. What diagnosis is of value when? *MMW Fortschr Med.* Mar 16;142(11):28-31.

Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. (1992) Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* Nov;98:13-24.

Anttonen AK, Mahjneh I, Hamalainen RH, 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 AE. (2005) The gene disrupted in Marinesco-Sjogren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone. *Nat Genet.* Dec;37(12):1309-11.

- Asatiani E**, Huang WX, Wang A, Rodriguez Ortner E, Cavalli LR, Haddad BR, Gelmann EP. (2005) Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res.* Feb 15;65(4):1164-73.
- Arnold N**, Hagele L, Walz L, Schempp W, Pfisterer J, Bauknecht T, Kiechle M. (1996) Overrepresentation of 3q and 8q material and loss of 18q material are recurrent findings in advanced human ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* May;16(1):46-54.
- Arya M**, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* Mar;5(2):209-19.
- Bailey SM**, Murnane JP. (2006) Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res.* May 8;34(8):2408-17.
- Batzer MA**, Deininger PL. (2002) Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet.* May;3(5):370-9.
- Becker N**. (2001) Epidemiologic aspects of cancer prevention in Germany. *J Cancer Res Clin Oncol.* Jan;127(1):9-19.
- Becopoulos T**. (2005) Clinically significant and non significant prostate cancer an ongoing question. *Acta Chir Iugosl.* 52(4):27-9.
- Bernard S**, Eilers M. (2006) Control of cell proliferation and growth by Myc proteins. *Results Probl Cell Differ.* 42:329-42.
- Bhatia-Gaur R**, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C, Shen MM. (1999) Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.* Apr 15;13(8):966-77.
- Bex A**, Wullich B, Endris V, Otto T, Rembrink K, Stockle M, Rubben H. (2001) Comparison of the malignant phenotype and genotype of the human androgen-independent cell line DU 145 and a subline derived from metastasis after orthotopic implantation in nude mice. *Cancer Genet Cytogenet.* Jan 15;124(2):98-104.
- Birnbaum D**, Adelaide J, Popovici C, Charafe-Jauffret E, Mozziconacci MJ, Chaffanet M. (2003) Chromosome arm 8p and cancer: a fragile hypothesis. *Lancet Oncol.* Oct;4(10):639-42.
- Bostock CJ**. (1986) Mechanisms of DNA sequence amplification and their evolutionary consequences. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1986 Jan 29;312(1154):261-73.
- Bott SR**, Arya M, Shergill IS, Williamson M. (2005) Molecular changes in prostatic cancer. *Surg Oncol.* Aug;14(2):91-104.
- Bova GS**, Isaacs WB. (1996) Review of allelic loss and gain in prostate cancer. *World J Urol.* 14(5):338-46.

- Bowen C**, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, Gasser TC, Koivisto P, Lack EE, Kononen J, Kallioniemi OP, Gelmann EP. (2000) Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.* Nov 1;60(21):6111-5.
- Bracarda S**, de Cobelli O, Greco C, Prayer-Galetti T, Valdagni R, Gatta G, de Braud F, Bartsch G. (2005) Cancer of the prostate. *Crit Rev Oncol Hematol.* Dec;56(3):379-96.
- Brass N**, Racz A, Heckel D, Remberger K, Sybrecht GW, Meese EU. (1997) Amplification of the genes BCHE and SLC2A2 in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 57:2290–4.
- Camp NJ**, Farnham JM, Cannon Albright LA. (2005) Genomic search for prostate cancer predisposition loci in Utah pedigrees. *Prostate.* Dec 1;65(4):365-74.
- Campbell IG**, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA. (2004) Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 64:7678–81.
- Cancel-Tassin G**, Cussenot O. (2005) Prostate cancer genetics. *Minerva Urol Nefrol.* Dec;57(4):289-300.
- Cancel-Tassin G**, Cussenot O. (2005) Genetic susceptibility to prostate cancer. *BJU Int.* Dec;96(9):1380-5.
- Carroll SM**, DeRose ML, Gaudray P, Moore CM, Needham-Vandevanter DR, Von Hoff DD, Wahl GM. (1988) Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Mol Cell Biol.* Apr;8(4):1525-33.
- Chan JM**, Gann PH, Giovannucci EL. (2005) Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol.* Nov 10;23(32):8152-60.
- Cassinelli G**, Supino R, Zuco V, Lanzi C, Scovassi AI, Semple SC, Zunino F. (2004) Role of c-myc protein in hormone refractory prostate carcinoma: cellular response to paclitaxel. *Biochem Pharmacol.* Sep 1;68(5):923-31.
- Carroll SM**, DeRose ML, Gaudray P, Moore CM, Needham-Vandevanter DR, Von Hoff DD, Wahl GM. (1988) Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. *Mol Cell Biol.* Apr;8(4):1525-33.
- Chan SW**, Blackburn EH. (2002) New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene.* Jan 21;21(4):553-63.
- Cher ML**, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB, Jensen RH. (1996) alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res.* Jul 1;56(13):3091-102.

- Chomczynski P**, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr;162(1):156-9.
- Chong P**, Rashid P. (2005) Can we prevent prostate cancer? *Aust Fam Physician.* Apr;34(4):265-7.
- Ciullo M**, Debily MA, Rozier L, Autiero M, Billault A, Mayau V, El Marhomy S, Guardiola J, Bernheim A, Coullin P, Piatier-Tonneau D, Debatisse M. (2002) Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I. *Hum Mol Genet.* Nov 1;11(23):2887-94.
- Claycomb JM**, Orr-Weaver TL. (2005) Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. *Trends Genet.* Mar;21(3):149-62.
- Coquelle A**, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M. (1997) Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. *Cell.* Apr 18;89(2):215-25.
- Coquelle A**, Toledo F, Stern S, Bieth A, Debatisse M. (1998) A new role for hypoxia in tumor progression: induction of fragile site triggering genomic rearrangements and formation of complex DMs and HSRs. *Mol Cell.* Aug;2(2):259-65.
- Coquelle A**, Rozier L, Dutrillaux B, Debatisse M. (2002) Induction of multiple double-strand breaks within an hsr by meganucleaseI-SceI expression or fragile site activation leads to formation of double minutes and other chromosomal rearrangements. *Oncogene.* Oct 31;21(50):7671-9.
- Cussenot O**, Cancel-Tassin G. (2004) Genetic susceptibility to prostate cancer. *Med Sci (Paris).* May;20(5):562-8.
- Damber JE.** (1999) Hereditary prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 1999;203:25-8.
- Damber JE.** (2000) Diet probably plays an important role in the development of prostatic cancer *Lakartidningen.* Aug 9;97(32-33):3475-80.
- Davila S**, Furu L, Gharavi AG, Tian X, Onoe T, Qian Q, Li A, Cai Y, Kamath PS, King BF, Azurmendi PJ, Tahvanainen P, Kääriäinen H, Höckerstedt K, Devuyst O, Pirson Y, Martin RS, Lifton RP, Tahvanainen E, Torres VE, Somlo S. (2004) Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet.* Jun;36(6):575-7.
- Debatisse M**, Coquelle A, Toledo F, Buttin G. (1998) Gene amplification mechanisms: the role of fragile sites. *Recent Results Cancer Res.* 154:216-26.
- Deshaies RJ**, Schekman R. (1989) SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* Dec;109(6 Pt 1):2653-64.

- Deshaies RJ**, Sanders SL, Feldheim DA, Schekman R. (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*. Feb 28;349(6312):806-8.
- Ding C**, Cantor CR. (2004) Quantitative analysis of nucleic acids--the last few years of progress. *J Biochem Mol Biol*. 2004 Jan 31;37(1):1-10.
- Dong JT**, Isaacs WB, Isaacs JT. (1997) Molecular advances in prostate cancer. *Curr Opin Oncol*. Jan;9(1):101-7.
- Dong JT**. (2001) Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 20(3-4):173-93.
- Duffy MJ**. (1993) Cellular oncogenes and suppressor genes as prognostic markers in cancer. *Clin Biochem*. Dec;26(6):439-47.
- Elo JP**, Visakorpi T. (2001) Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med*. Mar; 33(2):130-41.
- Florl AR**, Steinhoff C, Muller M, Seifert HH, Hader C, Engers R, Ackermann R, Schulz WA. (2004) Hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer*. Aug 31;91(5):985-94.
- Fu W**, Bubendorf L, Willi N, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G, Gasser TC. (2000) Genetic changes in clinically organ-confined prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Urology*. Nov 1;56(5):880-5.
- Fukumoto M**, Shevrin DH, Roninson IB. (1988) Analysis of gene amplification in human tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep;85(18):6846-50.
- Gallant P**. (2006) Myc/Max/Mad in invertebrates: the evolution of the Max network. *Curr Top Microbiol Immunol*. 302:235-53.
- Gentechnische Methoden (1999)** 2. Auflage, Spektrum Verlag
- Gilmore R**, Blobel G. (1985) Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants. *Cell*. Sep;42(2):497-505.
- Gleason DF**, Mellinger GT. (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. Jan;111(1):58-64.
- Gorlich D**, Rapoport TA. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*. Nov 19;75(4):615-30.
- Haapala K**, Kuukasjarvi T, Hyytinen E, Rantala I, Helin HJ, Koivisto PA. (2007) Androgen receptor amplification is associated with increased cell proliferation in prostate cancer. *Hum Pathol*. Mar;38(3):474-8.

- Hackett JA**, Greider CW. (2002) Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene*. Jan 21;21(4):619-26.
- Hamman BD**, Hendershot LM, Johnson AE. (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*. Mar 20;92(6):747-58.
- Hanein D**, Matlack KE, Jungnickel B, Plath K, Kalies KU, Miller KR, Rapoport TA, Akey CW. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*. Nov 15;87(4):721-32.
- Harvei S.** (1999) Epidemiology of prostatic cancer. *Tidsskr Nor Laegeforen*. Oct 10;119(24):3589-94.
- Heselmeyer-Haddad K**, Sommerfeld K, White NM, Chaudhri N, Morrison LE, Palanisamy N, Wang ZY, Auer G, Steinberg W, Ried T. (2005) Genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in pap smears predicts the development of cervical cancer. *Am J Pathol*. Apr;166(4):1229-38.
- He WW**, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, Curtis RT, Shell BK, Bostwick DG, Tindall DJ, Gelmann EP, Abate-Shen C, Carter KC. (1997) A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics*. Jul 1;43(1):69-77.
- Hellman A**, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Trakhtenbrot L, Kerem B. (2002) A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell*. Feb;1(1):89-97.
- Hoebeeck J**, Speleman F, Vandesompele J. (2007) Real-time quantitative PCR as an alternative to Southern blot or fluorescence in situ hybridization for detection of gene copy number changes. *Methods Mol Biol*. 353:205-26.
- Hooker CW**, Hurlin PJ. (2006) Of Myc and Mnt. *J Cell Sci*. Jan 15;119(Pt 2):208-16.
- Horoszewicz JS**, Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 43: 1809-1818.
- Huang Z**, Fasco MJ, Kaminsky LS. (1996) Optimization of Dnase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *Biotechniques*. Jun;20(6):1012-4, 1016, 1018-20.
- Hyytinen ER**, Frierson HF Jr, Boyd JC, Chung LW, Dong JT. (1999) Three distinct regions of allelic loss at 13q14, 13q21-22, and 13q33 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. Jun;25(2):108-14.

- Imoto I**, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Yang ZQ, 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. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 24;286(3):559-65.
- Jemal A**, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. (2006) Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr;56(2):106-30.
- Jenkins R**, Takahashi S, DeLacey K, Bergstrahl E, Lieber M. (1998) Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q, and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* Feb;21(2):131-43.
- Jung R**, Soondrum K, Neumaier M. (2000) Quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med.* Sep;38(9):833-6.
- Jung V**, Kindich R, Kamradt J, Jung M, Muller M, Schulz WA, Engers R, Unteregger G, Stockle 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. *Mol Cancer Res.* 2006 Mar;4(3):169-76.
- Jungnickel B**, Rapoport TA. (1995) A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell.* Jul 28;82(2):261-70.
- Kaighn ME**, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* 17: 16-23.
- Kalies KU**, Hartmann E. (1998) Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)--two similar routes with different modes. *Eur J Biochem.* May 15;254(1):1-5.
- Kalies KU**, Rapoport TA, Hartmann E. (1998) The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol.* May 18;141(4):887-94.
- Kallioniemi A**, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* Oct 30;258(5083):818-21.
- Kleine-Kohlbrecher D**, Adhikary S, Eilers M. (2006) Mechanisms of transcriptional repression by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol.*;302:51-62.
- Karan D**, Lin MF, Johansson SL, Batra SK. (2003) Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. *Int J Cancer.* Jan 20;103(3):285-93.
- Keenan RJ**, Freymann DM, Stroud RM, Walter P. (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem.*;70:755-75.

- Kim HL**, Steinberg GD. (2000) New insights and candidate genes and their implications for care of patients with hereditary prostate cancer. *Curr Urol Rep.* May;1(1):9-14.
- Kindich R**, Florl AR, Jung V, Engers R, Muller M, Schulz WA, Wullich B. (2005) Application of a modified real-time PCR technique for relative gene copy number quantification to the determination of the relationship between NKX3.1 loss and MYC gain in prostate cancer. *Clin Chem.* Mar;51(3):649-52.
- Kindich R**, Florl AR, Kamradt J, Lehmann J, Muller M, Wullich B, Schulz WA. (2006) Relationship of NKX3.1 and MYC gene copy number ratio and DNA hypomethylation to prostate carcinoma stage. *Eur Urol.* Jan;49(1):169-75.
- Kubista M**, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* Apr-Jun;27(2-3):95-125.
- Kuwahara Y**, Tanabe C, Ikeuchi T, Aoyagi K, Nishigaki M, Sakamoto H, Hoshinaga K, Yoshida T, Sasaki H, Terada M. (2004) Alternative mechanisms of gene amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* Oct;41(2):125-32.
- Latil A**, Vidaud D, Valeri A, Fournier G, Vidaud M, Lidereau R, Cussenot O, Biache I. (2000): htert expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer. *Int J Cancer.* Mar 20;89(2):172-6.
- Leube B**, Drechsler M, Muhlmann K, Schafer R, Schulz WA, Santourlidis S, Anastasiadis A, Ackermann R, Visakorpi T, Muller W, Royer-Pokora B. (2002) Refined mapping of allele loss at chromosome 10q23-26 in prostate cancer. *Prostate.* Feb 15;50(3):135-44.
- Lee AH**, Fraser ML, Meng X, Binns CW. (2006) Protective effects of green tea against prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* Apr;6(4):507-13.
- Lensch R**, Gotz C, Andres C, Bex A, Lehmann J, Zwergel T, Unteregger G, Kamradt J, Stoeckle M, Wullich B. (2002) Comprehensive genotypic analysis of human prostate cancer cell lines and sublines derived from metastases after orthotopic implantation in nude mice. *Int J Oncol.* Oct;21(4):695-706.
- Li LC**, Okino ST, Dahiya R. (2004) DNA methylation in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* Sep 20;1704(2):87-102.
- Livak KJ**, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* Dec;25(4):402-8.
- LightCycler Operators Manual** Version 3.5, 2000 (Roche Molecular Biochemicals)
- Ma HL**, Chen B. (2007) [Advancement in the methods for gene dosage analysis] *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* Feb;24(1):76-9.

- Macoska JA**, Trybus TM, Benson PD, Sakr WA, Grignon DJ, Wojno KD, Pietruk T, Powell IJ. (1995) Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res.* Nov 15;55(22):5390-5.
- Macoska JA**, Trybus TM, Wojno KJ. (2000) 8p22 loss concurrent with 8c gain is associated with poor outcome in prostate cancer. *Urology.* May;55(5):776-82.
- Magee JA**, Abdulkadir SA, Milbrandt J. (2003) Haploinsufficiency at the Nkx3.1 locus. A paradigm for stochastic, dosage-sensitive gene regulation during tumor initiation. *Cancer Cell.* Mar;3(3):273-83.
- Mai S**, Mushinski JF. (2003) c-Myc-induced genomic instability. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 22(3):179-99
- Matsuyama H**, Pan Y, Oba K, Yoshihiro S, Matsuda K, Hagarth L, Kudren D, Naito K, Bergerheim US, Ekman P. (2003) The role of chromosome 8p22 deletion for predicting disease progression and pathological staging in prostate cancer. *Aktuelle Urol.* Jul; 34(4):247-9.
- Matsuyama H**, Pan Y, Yoshihiro S, Kudren D, Naito K, Bergerheim US, Ekman P. (2003) Clinical significance of chromosome 8p, 10q, and 16q deletions in prostate cancer. *Prostate.* Feb 1;54(2):103-11.
- Matsuda K**, Matsuyama H, Hara T, Yoshihiro S, Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Izumi H, Naito K, Sasaki K. (2004) DNA sequence copy number aberrations in prostate cancers: a comparison of comparative genomic hybridization data between Japan and European countries. *Cancer Genet Cytogenet.* Jul 15;152(2):119-23
- McClintock B.** (1951) Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **16**, 13–47.
- McNeal JE.** (1969) Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer.* Jan;23(1):24-34.
- McNeal JE.** (1988) Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.* Aug;12(8):619-33.
- Narayanan V**, Mieczkowski PA, Kim HM, Petes TD, Lobachev KS. (2006) The pattern of gene amplification is determined by the chromosomal location of hairpin-capped breaks. *Cell.* Jun 30;125(7):1283-96.
- Nelson WG**, De Marzo AM, Isaacs WB. (2003) Prostate cancer. *N Engl J Med.* Jul 24;349(4):366-81.
- Ng DT**, Brown JD, Walter P. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol.* Jul;134(2):269-78.

- Noel P**, Cartwright IL. (1994) A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *EMBO J.* Nov 15;13(22):5253-61.
- Nupponen N**, Visakorpi T. (1999) Molecular biology of progression of prostate cancer. *Eur Urol.* 35(5-6):351-4.
- Nupponen NN**, Visakorpi T. (2000) Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microsc Res Tech.* Dec 1;51(5):456-63.
- Nupponen NN**, Carpten JD. (2001) Prostate cancer susceptibility genes: many studies, many results, no answers. *Cancer Metastasis Rev.* 20(3-4):155-64.
- Okegawa T**, Kinjo M, Nutahara K, Higashihara E. (2006) Pretreatment serum level of HER2/nue as a prognostic factor in metastatic prostate cancer patients about to undergo endocrine therapy. *Int J Urol.* Sep;13(9):1197-201.
- Oliver J**, Jungnickel B, Gorlich D, Rapoport T, High S. (1995) The Sec61 complex is essential for the insertion of proteins into the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* Apr 3;362(2):126-30.
- Palade G.** (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science.* Aug 1;189(4200):347-58.
- Panzner S**, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA. (1995) Posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 60:31-40.
- Paton AW**, Beddoe T, Thorpe CM, Whisstock JC, Wilce MC, Rossjohn J, Talbot UM, Paton JC. (2006) AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature.* Oct 5;443(7111):548-52.
- Perry AS**, Foley R, Woodson K, Lawler M. (2006) The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006 Jun;13(2):357-77.
- Pipiras E**, Coquelle A, Bieth A, Debatisse M. (1998) Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *EMBO J.* Jan 2;17(1):325-33.
- Pfaffl MW.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* May 1;29(9):e45.
- Pfaffl MW.** *BIOspektrum-1/04-10.Jahrgang*
- Pool MR**, Stumm J, Fulga TA, Sinning I, Dobberstein B. (2002) Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science.* Aug 23;297(5585):1345-8.
- Porkka KP**, Visakorpi T. (2004) Molecular mechanisms of prostate cancer. *Eur Urol.* Jun;45(6):683-91.

Prostatakrebs (2004) Deutsche Krebshilfe, Die blauen Ratgeber 17, 7. Ausgabe.

Qian J, Jenkins RB, Bostwick DG. (1999) Genetic and chromosomal alterations in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Eur Urol.* 35(5-6):479-83.

Quinn LA, Moore GE, Morgan RT, Woods LK. (1979) Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. *Cancer Res.* 39: 4914-4924.

Rasmussen R. (2001) Quantification on the LightCycler. Meuer S Wittwer C Nakagawara K eds. *Rapid cycle real-time PCR, methods and applications* 21-34 Springer Press Heidelberg.

Rapoport TA, Rolls MM, Jungnickel B. (1996) Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr Opin Cell Biol.* Aug;8(4):499-504.

Robert Koch Institut (2006) Krebs in Deutschland, 5. Ausgabe.

Roscigno M, Scattoni V, Bertini R, Pasta A, Montorsi F, Rigatti P. (2004) Diagnosis of prostate cancer. State of the art. *Minerva Urol Nefrol.* Jun;56(2):123-45.

Rothblatt JA, Deshaies RJ, Sanders SL, Daum G, Schekman R. (1989) Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol.* Dec;109(6 Pt 1):2641-52.

Roylance R, Spurr N, Sheer D. (1997) The genetic analysis of prostate carcinoma. *Semin Cancer Biol.* Feb;8(1):37-44.

Ruiz JC, Wahl GM. (1990) Chromosomal destabilization during gene amplification. *Mol Cell Biol.* Jun;10(6):3056-66.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* Dec 20;230(4732):1350-4.

Sakr WA, Partin AW. (2001) Histological markers of risk and the role of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology.* Apr;57(4 Suppl 1):115-20.

Sato H, Minei S, Hachiya T, Yoshida T, Takimoto Y. (2006) Fluorescence in situ hybridization analysis of c-myc amplification in stage TNM prostate cancer in Japanese patients. *Int J Urol.* Jun;13(6):761-6.

Sato K, Qian J, Slezak JM, Lieber MM, Bostwick DG, Bergstralh EJ, Jenkins RB. (1999) Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* Sep 15;91(18):1574-80.

- Sattler HP**, Rohde V, Bonkhoff H, Zwergel T, Wullich B. (1999) Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *Prostate*. May;39(2):79-86.
- Sattler HP**, 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. *Prostate*. Nov 1;45(3):207-15.
- Schimke RT**. (1984) Gene amplification, drug resistance, and cancer. *Cancer Res*. May; 44(5):1735-42.
- Schulz WA**, Burchardt M, Cronauer MV. (2003) Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod*. Aug;9(8):437-48.
- Schulz WA**, Hatina J. (2006) Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med*. Jan-Mar;10(1):100-25.
- Schwab M**. (1999) Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol*. Aug;9(4):319-25.
- Shen MM**, Abate-Shen C. (2003) Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev Dyn*. Dec;228(4):767-78.
- Shimizu N**, Shingaki K, Kaneko-Sasaguri Y, Hashizume T, Kanda T. (2005) When, where and how the bridge breaks: anaphase bridge breakage plays a crucial role in gene amplification and HSR generation. *Exp Cell Res*. Jan 15;302(2):233-43.
- Siddiqui E**, Mumtaz FH, Gelister J. (2004) Understanding prostate cancer. *J R Soc Health*. Sep;124(5):219-21.
- Singh B**, Gogineni SK, Sacks PG, Shaha AR, Shah JP, Stoffel A, Rao PH. (2001) Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res*. Jun 1;61(11):4506-13.
- Slack A**, Thornton PC, Magner DB, Rosenberg SM, Hastings PJ. (2006) On the mechanism of gene amplification induced under stress in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*. Apr;2(4):e48.
- Small EJ**, Roach M 3rd. (2002) Prostate-specific antigen in prostate cancer: a case study in the development of a tumor marker to monitor recurrence and assess response. *Semin Oncol*. Jun;29(3):264-73.
- Smith KA**, Agarwal ML, Chernov MV, Chernova OB, Deguchi Y, Ishizaka Y, Patterson TE, Poupon MF, Stark GR. (1995) Regulation and mechanisms of gene amplification. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Jan 30;347(1319):49-56.
- Southern EM**. (1974) An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal Biochem*. Nov;62(1):317-8.

- Spradling AC**, Mahowald AP. (1980) Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb;77(2):1096-100.
- Stark GR**, Debatisse M, Giulotto E, Wahl GM. (1989) Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. *Cell*. Jun 16;57(6):901-8.
- Stark GR**. (1993) Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. *Adv Cancer Res*. 61:87-113.
- Steiner T**, Junker K, Burkhardt F, Braunsdorf A, Janitzky V, Schubert J. (2002) Gain in chromosome 8q correlates with early progression in hormonal treated prostate cancer. *Eur Urol*. Feb;41(2):167-71.
- Stone KR**, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int. J. Cancer* 21: 274-281.
- Strohmeyer DM**, Berger AP, Moore DH 2nd, Bartsch G, Klocker H, Carroll PR, Loening SA, Jensen RH. (2004) Genetic aberrations in prostate carcinoma detected by comparative genomic hybridization and microsatellite analysis: association with progression and angiogenesis. *Prostate*. Apr 1;59(1):43-58.
- Sunny L**. (2005) A low fat diet rich in fruits and vegetables may reduce the risk of developing prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. Oct-Dec;6(4):490-6.
- Technical Note** No. LC 9/2000, LC 11/2000, LC 13/2001, LC 15/2002, Roche
- Toledo F**, Buttin G, Debatisse M. (1993) The origin of chromosome rearrangements at early stages of AMPD2 gene amplification in Chinese hamster cells. *Curr Biol*. May 1;3(5):255-64.
- Torring N**, Borre M, Sorensen KD, Andersen CL, Wiuf C, Orntoft TF. (2007) Genome-wide analysis of allelic imbalance in prostate cancer using the Affymetrix 50K SNP mapping array. *Br J Cancer*. Feb 12;96(3):499-506.
- Tower J**. (2004) Developmental gene amplification and origin regulation. *Annu Rev Genet*. 38:273-304.
- Tsuchiya N**, Slezak JM, Lieber MM, Bergstralh EJ, Jenkins RB. (2002) Clinical significance of alterations of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridization analysis in pathologic organ-confined prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. Aug;34(4):363-71.
- Van Dekken H**, Alers JC, Damen IA, Vissers KJ, Krijtenburg PJ, Hoedemaeker RF, Wildhagen MF, Hop WC, van der Kwast TH, Tanke HJ, Schroder FH. (2003) Genetic evaluation of localized prostate cancer in a cohort of forty patients: gain of distal 8q discriminates between progressors and nonprogressors. *Lab Invest*. Jun;83(6):789-96.

- Virgin JB**, Hurley PM, Nahhas FA, Bebhuk KG, Mohamed AN, Sakr WA, Bright RK, Cher ML. (1999) Isochromosome 8q formation is associated with 8p loss of heterozygosity in a prostate cancer cell line. *Prostate*. Sep 15;41(1):49-57.
- Visakorpi T**. (1999) Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Chir Gynaecol*. 88(1):11-6.
- Voeller HJ**, Augustus M, Madike V, Bova GS, Carter KC, Gelmann EP. (1997) Coding region of NKX3.1, a prostate-specific homeobox gene on 8p21, is not mutated in human prostate cancers. *Cancer Res*. Oct 15;57(20):4455-9.
- Vogelstein B**, Kinzler KW. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. Apr;9(4):138-41.
- Wade M**, Wahl GM. (2006) c-Myc, genome instability, and tumorigenesis: the devil is in the details. *Curr Top Microbiol Immunol*. 302:169-203.
- Wang L**, McDonnell SK, Elkins DA, Slager SL, Christensen E, Marks AF, Cunningham JM, Peterson BJ, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ, Thibodeau SN. (2002) Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet*. Jul;71(1):116-23.
- Wang X**, Johnsson N. (2005) Protein kinase CK2 phosphorylates Sec63p to stimulate the assembly of the endoplasmic reticulum protein translocation apparatus. *J Cell Sci*. 2005 Feb 15;118(Pt 4):723-32.
- Wang L**, Dobberstein B. (1999) Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*. Sep 3;457(3):316-22.
- Watanabe T**, Horiuchi T. (2005) A novel gene amplification system in yeast based on double rolling-circle replication. *EMBO J*. Jan 12;24(1):190-8.
- Williams K**, Fernandez S, Stien X, Ishii K, Love HD, Lau YF, Roberts RL, Hayward SW. (2005) Unopposed c-MYC expression in benign prostatic epithelium causes a cancer phenotype. *Prostate*. Jun 1;63(4):369-84.
- Windle BE**, Wahl GM. (1992) Molecular dissection of mammalian gene amplification: new mechanistic insights revealed by analyses of very early events. *Mutat Res*. 1992 May;276(3):199-
- Wirth A**, Jung M, Bies C, Frien M, Tyedmers J, Zimmermann R, Wagner R. (2003) The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. *Mol Cell*. Jul;12(1):261-8.
- Wittke S**, Dünnwald M, Johnsson N. (2000) Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol Biol Cell*. Nov;11(11):3859-71.
- Yun JJ**, Heisler LE, Hwang II, Wilkins O, Lau SK, Hycza M, Jayabalasingham B, Jin J, McLaurin J, Tsao MS, Der SD. (2006) Genomic DNA functions as a universal external standard

in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jul 13;34(12):e85. Erratum in: *Nucleic Acids Res.* 2006;34(22):6718.

Zhang X, Lee C, Ng PY, Rubin M, Shabsigh A, Buttyan R (2000) Prostatic neoplasia in transgenic mice with prostate-directed overexpression of the c-myc oncoprotein. *Prostate.* 2000 Jun 1;43(4):278-85.

Zheng SL, Ju JH, Chang BL, Ortner E, Sun J, Isaacs SD, Sun J, Wiley KE, Liu W, Zemedkun M, Walsh PC, Ferretti J, Gruschus J, Isaacs WB, Gelmann EP, Xu J (2006) Germ-line mutation of NKX3.1 cosegregates with hereditary prostate cancer and alters the homeodomain structure and function. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):69-77.

Zimmermann R, Muller L, Wullich B. (2006) Protein transport into the endoplasmic reticulum: mechanisms and pathologies. *Trends Mol Med.* Dec;12(12):567-73.