

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Identifizierung potentieller Tumorsuppressorgene innerhalb der 6q12-q22 Deletion beim Prostatakarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

Medizinische Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

**Mina Eshagzaiy
aus Hamburg**

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.03.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. K. Pantel

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	3
1	Einleitung	5
2	Material und Methoden	9
2.1	Zelllinien	9
2.2	Medien	10
2.3	Zellpflege	11
2.4	Bestimmung der Zellzahl	11
2.5	kommerzielle shRNA-Konstrukte	11
2.6	TaqMan®-Sonden	15
2.7	Verwendete Antikörper	16
2.8	Reagenzien und kommerzielle Kits	16
2.9	Material und Geräte	18
2.10	Verwendete Lösungen	19
2.11	Plasmid-Isolierung von shRNA-Konstrukten	20
2.12	RNA Isolation aus Prostatazelllinien	20
2.13	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von RNA- und DNA Proben.....	21
2.14	Reverse Transkription	21
2.15	TaqMan®-PCR.....	22
2.16	Proteinisolation.....	22
2.17	Proteinbestimmung	23
2.18	Western Blot.....	23
2.19	Transfektion von shRNA-DNA-Plasmiden mit Lipofectamin®2000	24
2.20	Transduktion von Prostatazellen mit Lentiviren	24
2.21	Colony-Formation-Assay	25
2.22	Invasion Assay	26
2.23	Datenbanken und Analyseprogramme	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Expression der 13 ausgewählten Kandidatengene in vier Prostata- (karzinom)Zelllinien.....	28
3.2	Auswahl der optimalen shRNA-Konstrukte für die Depletionsexperimente	30
3.3	Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die Genexpression (shRNA- Konstruktvalidierung)	32
3.4	Bestimmung der depletionsbedingten Wachstumseinflüsse mittels Colony- Formation Assay.....	34

3.5	Validierung der potentiellen Zielgene der 6q-Deletion	39
3.5.1	Colony-Formation Assay	39
3.5.2	Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion auf mRNA-Ebene in den transduzierten Zelllinien BPH-1 und DU 145	42
3.5.3	Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion auf Protein-Ebene in den transduzierten Zelllinien BPH-1 und DU 145	44
3.6	Auswirkungen der <i>HMGN3</i> - und <i>SMAP1</i> -Suppression auf das invasive Zellwachstum.....	46
4	Diskussion.....	48
5	Zusammenfassung	53
6	Abstract.....	54
II.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	55
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	57
IV.	Literaturverzeichnis.....	58
V.	Danksagung	64
VI.	Lebenslauf.....	65
VII.	Eidesstattliche Versicherung.....	66

1 Einleitung

Weltweit ist das Prostatakarzinom mit über 1 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr die zweithäufigste Tumorerkrankung und macht damit gut 17 % der gesamten Tumorneuerkrankungen aus [1]. In Deutschland treten jährlich über 60.000 neue Prostatakarzinomfälle auf. Dies entspricht ca. 120 Erkrankungen pro 100.000 Männer pro Jahr. Damit ist das Prostatakarzinom in Deutschland, wie auch in den anderen Industrieländern, das häufigste Karzinom des Mannes. Da 90 % der Betroffenen bereits die sechste Lebensdekade überschritten haben und das durchschnittlich Erkrankungsalter 70 Jahre ist, zählt das Prostatakarzinom außerdem zu den Erkrankungen des älteren Mannes [1, 2]. Vergleichsweise scheint die Mehrzahl der Prostatakarzinome mit einer mittleren Sterberate von jährlich 24 Sterbefällen pro 100.000 Männern [2], eine mindere Aggressivität zu besitzen. Dies spiegelt sich auch in der stetig steigenden relativen 5-Jahres-Überlebensrate von über 92 % wider, die das Prostatakarzinom in Deutschland prognostisch an zweiter Stelle nach dem Hodenkarzinom einordnet [2, 3]. Allerdings zählt das Prostatakarzinom wegen seiner Häufigkeit weltweit immer noch zu den 10 häufigsten Tumor-bedingten Todesursachen des Mannes [1]. In Deutschland gehört das Prostatakarzinom zusammen mit Karzinomen der Lunge und des Darms sogar zu den drei häufigsten Tumor-assoziierten Todesursachen [2].

Der Umstand der steigenden Überlebensrate lässt sich vor allem durch den früheren Diagnosezeitpunkt von symptomlosen, klinisch wenig relevanten Prostatakarzinomen in eher jungen Jahren der Patienten erklären. Gewährleistet wurde dies vor allem durch die Etablierung des prostataspezifischen Antigen(PSA)-Bluttests in den Industrieländern. Hier zeigt der Vergleich mit Entwicklungsländern, in denen der Test selten bis gar nicht durchgeführt wird, mehr als fünffach höhere Inzidenzraten in den westlichen Industrieländern [1]. Der PSA-Test stellt eine verlässliche Methode zur Sekundärprävention dar. Obgleich es, auf Grund individueller Faktoren, hohe Raten an falsch-positiven Ergebnissen gibt, werden unter anderem 75 % aller asymptomatischen Prostatatumoren erkannt. Abhängig vom Testsystem gilt ein Grenzwert von ≥ 4 ng PSA/ml Serum als Karzinom verdächtig. Bei 85 % der Männer liegt der PSA-Wert unter diesem Grenzwert. Die Nachweisrate von Prostatakarzinomen ab diesem Grenzwert liegt bei 20 %, ab 10 ng PSA/ml Serum liegt die Wahrscheinlichkeit eines Prostatakarzinoms zwischen 33 % bis 50 % [3, 4]. Zur endgültigen Sicherung der Diagnose erfolgt bei erhöhten PSA-Werten eine Prostatabiopsie mit nachfolgender Klassifizierung des Karzinoms anhand des Gleason-Scores [5]. Der Gleason-Score wird aus dem Gleason Grad gebildet, der zur histologischen Bestimmung des Entdifferenzierungsgrades der Drüsenstruktur im Karzinomgewebe herangezogen wird. Der Gleason Grad kann von 1 (gut differenzierte Drüsen) bis 5 (keine Differenzierung) reichen [6]. Zusätzlich zum Gleason-Score wird das TNM-Staging durchgeführt, in dem das Tumorstadi-

um (T), das Vorhandensein von Metastasen in den Lymphknoten (N) und weiterentfernt liegenden Organen und Geweben (M) festgelegt wird [5]. Anschließend werden dann in Abhängigkeit vom TNM-Staging, dem PSA-Wert, dem Gleason-Score in der Stanzbiopsie und dem Gesundheitszustand sowie Alter des Patienten die Therapiemöglichkeiten für den Patienten diskutiert. Diese Therapieoptionen umfassen sowohl invasive Methoden wie die radikale Prostatektomie und die Strahlentherapie (extern und Brachytherapie) bei organbegrenzten und lokalfortgeschrittenen Karzinomen oder die Hormonenzugstherapie bei metastasierenden Karzinomen sowie nicht invasive Methoden wie das „Active Surveillance“ und das „Watchful Waiting“. Wobei letztere durch das kontrollierte Zuwarten mit engmaschigen Kontrollen einen invasive Therapie vermeiden oder hinauszögern sollen [3, 5]. Ein Problem bei der Therapiewahl ist jedoch, dass zum Zeitpunkt der initialen Diagnose des Prostatakarzinoms in der Regel anhand der oben genannten etablierten Prognosefaktoren keine sichere Unterscheidung zwischen eher „gutartigen“ Karzinomen und hoch aggressiven Karzinomen, die zu einem lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf führen, getroffen werden kann. Aus diesem Grund stehen Arzt und Patient häufig vor der schwierigen Entscheidung zwischen einem aggressiven Eingriff mit den dazugehörigen Nebenwirkungen oder einem abwartenden Verhalten bis zur eventuellen Nachweisbarkeit der Aggressivität des Karzinoms. Daraus ergibt sich die dringende Notwendigkeit der Identifizierung zusätzlicher Prognosefaktoren, welche möglichst früh zum Diagnosezeitpunkt die Klassifizierung der Prostatakarzinome in jene aggressiven Karzinome und asymptomatische Tumoren gemeinsam mit den etablierten Parametern ermöglichen.

Vorschläge für Prognosefaktoren werden in Literaturfachkreisen fortlaufend debattiert. Diese umfassen Parameter, wie zum Beispiel die Veränderung der Proliferationsaktivität (Ki-67 Labeling Index) [7-9] oder auch die Inaktivierung der bekannten Tumorsuppressorgene *PTEN* [10, 11] und *TP53* [12-15]. Aber auch Veränderungen in der Expression zahlreicher Proteine, wie zum Beispiel von *p27*, *Beta-catenin*, *VEGF* und *BMP* wurden als mögliche prognostische Parameter vorgeschlagen [12]. Die häufigste genetische Veränderung beim Prostatakarzinom ist die *TMPRSS2:ERG* Fusion, welche sich in gut 50 % der Prostatakarzinome manifestiert. Bedingt durch eine Deletion auf Chromosom 21 kommt es hier zu einer Fusion zwischen dem Androgen-regulierten Gen *TMPRSS2* und dem Transkriptionsfaktor *ERG*, die zu einer Expression von *ERG* in den betroffenen Karzinomzellen führt [16, 17]. Bemerkenswert ist jedoch, dass sich Patienten deren Tumoren eine *ERG* Expression aufweisen hinsichtlich der Prognose nicht von Patienten deren Tumoren keine *ERG* Expression zeigen unterscheiden [17]. Damit scheint der *ERG*-Status zunächst nicht als Prognoseparameter geeignet zu sein. Anhand des *ERG*-Status kann jedoch eine Unterteilung der Prostatakarzinome in *ERG*-positive (mit Fusionsgen) und *ERG*-negative (ohne Fusionsgen) Tumoren vorgenommen werden. Diese Unterteilung der Prostatakarzinome in molekularen Untergruppen ist deswegen sinnvoll, weil sich in diesen Tumorgruppen unterschiedliche weitere Veränderungen anreichern [11, 15, 18-27]. Auch haben viele sekundäre Veränderungen eine unterschiedliche klinische Relevanz [23, 28]. Neben der *TMPRSS2:ERG* Fusion spielen Verluste (Deletionen) verschiedener chromosomaler Regionen mit einer

Häufigkeit von 10 % bis 60 % eine zentrale Rolle beim Prostatakarzinom [22, 29, 30]. Während in den ERG-positiven Prostatakarzinomen gehäuft Deletionen von *PTEN* [11], *TP53* [15] und 3p13 [20] nachweisbar sind, treten Deletionen von 5q [18] und 6q [19] typischerweise in Prostatakarzinomen mit einem negativen *ERG* Status auf.

In einer vorangegangenen Studie des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf konnte gezeigt werden, dass die 6q-Deletion unabhängig vom *ERG*-Status beim Prostatakarzinom eine hohe prognostische Relevanz aufweist. Insbesondere Tumoren mit einem ungünstigen Phänotyp und einer erhöhten Rezidiv-Wahrscheinlichkeit sind gehäuft von einer 6q-Deletion betroffen [19]. Aus diesem Grund wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ein besonderer Fokus auf die weitere Charakterisierung der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom gesetzt. Die 6q-Deletion ist bei circa 18 % bis 62 % der Prostatakarzinome nachweisbar [19, 21, 22, 29-32]. Die tumorrelevanten Gene der 6q-Deletion sind bisher jedoch nicht bekannt. Generell können tumorrelevante Gene in Onkogene und Tumorsuppressorgene unterschieden werden. Onkogene sind dadurch charakterisiert, dass ihre Aktivierung durch zum Beispiel Amplifikationen ein ungebremses Tumorwachstum fördert. Eines der bekanntesten Onkogene ist *HER2* das in circa 20 % aller Mamma-Karzinome amplifiziert ist [33, 34]. Im Gegensatz dazu verursacht die Beeinträchtigung oder Inaktivierung der Funktion von Tumorsuppressorgenen zum Beispiel durch Deletionen den tumorbegünstigenden Effekt. Ein bekanntes Beispiel sind hier die Tumorsuppressorgene *PTEN* (10q23) und *TP53* (17p13) deren Deletions-bedingter Verlust in circa 20 % [11] und 15 % [15] aller Prostatakarzinome eine hohe prognostische Relevanz aufweist. Basierend darauf ergibt sich die Annahme, dass im Bereich der 6q-Deletion ebenfalls mindestens ein tumorsuppressives Gen lokalisiert ist. Eine gängige und häufig verwendete Strategie zur Identifizierung von Tumorsuppressorgenen ist die Suche nach einer gemeinsamen minimal deletierten Region. Dies beruht auf der Annahme, dass in diesen Bereichen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit zumindest ein Gen mit tumorsuppressiven Eigenschaften lokalisiert ist. Studien die sich mit der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom befassen, konnten eine solche 0,8 bis 4 Megabasen große minimale Deletionsregion auf 6q15 nachweisen [19, 21, 22, 29, 31, 32]. In diesem Bereich sind zwischen 5 und 23 Gene lokalisiert, die zum Teil auf Grund ihrer zellulären Funktion tumorsuppressive Eigenschaften besitzen könnten. Dazu zählt zum Beispiel das Gen *MAP3K7*, das unter anderem eine wichtige Funktion in der Regulation des BMP- und WNT-Signalweges besitzt [35, 36]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass die Suppression von *MAP3K7* im Mausmodell mit funktionellen Effekten verbunden ist, die auf eine Funktion von *MAP3K7* als Tumorsuppressorgen beim Prostatakarzinom hindeuten [37]. Bemerkenswert ist, dass in einer in der Arbeitsgruppe um Frau Kluth durchgeführten Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungsanalyse (FISH) an über 5.000 Prostatakarzinomen gezeigt werden konnte, dass die prognostische Relevanz der 6q-Deletion abhängig von der Ausdehnung der 6q-Deletion ist. Genauer gesagt ergaben die Analysen, dass Tumoren mit kleineren Deletionen die von 6q14.3 bis 6q16.1 reichen eine deutlich schlechtere Prognose aufweisen als Tumore ohne eine 6q-Deletion. Allerdings war im Vergleich die Prognose der Tumoren mit kleinen Deleti-

onen wesentlich besser als von Tumoren mit einer sehr großen Deletion die von 6q12 bis 6q22.31 reicht [38].

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Hypothese, dass die 6q-Deletion nicht durch die Inaktivierung eines einzigen Genes zu einer Begünstigung der Tumorprogression beim Prostatakarzinom führt. Sondern dass durch die 6q-Deletion mehrere potentielle tumorsuppressive Gene in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Es ist daher denkbar, dass außerhalb der minimal deletierten Region im Bereich 6q15 weitere potentiell tumorsuppressive Gene lokalisiert sind. Dies würde außerdem bedeuten, dass die Anzahl der betroffenen tumorrelevanten Gene von der Größe der 6q-Deletion abhängt. Somit würden Deletion von kleinen Chromosomenabschnitten zur Beeinträchtigung von einem oder wenigen tumorsuppressiven Genen führen, während große Deletionen in der Inaktivierung von mehreren Tumorsuppressorgenen resultieren würden.

Zur Untersuchung der obengenannten Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob außerhalb der kleinen 6q14.3 bis 6q16.1 Deletion Gene lokalisiert sind, die tumorsuppressive Eigenschaften aufweisen und so die schlechtere Prognose von großen Deletionen im Vergleich zu kleinen Deletionen auf dem langem Arm von Chromosom 6 erklären könnten. Zur Klärung der genannten Fragestellung wurden die Gene *HACE1*, *ATG5*, *CD164*, *TRAF3IP2*, *MARCKS*, *HDAC2*, *ASF1A* telomerwärts und die Gene *SMAP1*, *EEF1A1*, *SENP6*, *PHIP*, *HMGN3*, *TTK* centromerwärts zur 6q14.3-q16.1 Deletion randomisiert ausgewählt. Alle 13 ausgewählten Gene wurden in der Prostatakarzinomzelllinie DU 145 und der benignen Prostata-Zelllinie BPH-1 shRNA-vermittelt supprimiert und die Auswirkungen der Gensuppression auf das Zellwachstum mittels Colony-Formation-Assay untersucht. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte zwei potentiell tumorsuppressive Gene innerhalb der großen 6q-Deletion identifiziert werden, die bisher nicht als solche bekannt waren.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Für die Untersuchung und Identifizierung von potentiell tumorwachstumsrelevanten Genen wurden Prostata(karzinom-)zelllinien kultiviert. Diese wurden für Expressionsanalysen, die Testung von shRNA-Konstrukten und die Durchführung der Colony-Formation Assays und des Invasion Assays verwendet. Zudem wurden für die Produktion von Lentiviren Phoenix-Zellen kultiviert. Alle verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Organismus	Organ	Erkrankung	Alter	Ethnizität
BPH-1	DSMZ, Braunschweig	Homo Sapiens	Prostata, epithelial	Benigne Prostata Hyperplasie	68	Kaukasisch
DU 145	ATCC, Wesel	Homo Sapiens	Prostata, epithelial	Karzinom	69	Kaukasisch
LNCaP clone FGC	ATCC, Wesel	Homo Sapiens	Prostata, epithelial	Karzinom	50	Kaukasisch
PC-3	ATCC, Wesel	Homo Sapiens	Prostata	Adenokarzinom	62	Kaukasisch
Phoenix	Arbeitsgruppe Gary Nolan, Stanford	Homo Sapiens	Niere			Embryo
VCap	ATCC, Wesel	Homo Sapiens	Prostata, epithelial	Karzinom	59	Kaukasisch

2.2 Medien

Für die Kultivierung der Prostata(karzinom)- und Nierenzelllinien wurden folgende Vollmedien verwendet:

Vollmedium für Prostatazelllinien, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

- 500 ml RPMI Medium 1640 (1x)+ GlutaMAX™ - I
- 50 ml Fetal Bovine Serum Gold (FCS)
- 5,5 ml Natrium Pyruvate
- 5,5 ml MEM NEAA 100x
- 5,5 ml Pen Strep

Vollmedium für Nierenzelllinien, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

- 500 ml DMEM Medium 1640 (1x)+ GlutaMAX™ - I
- 50 ml FCS
- 5,5 ml Natrium Pyruvate
- 5,5 ml MEM NEAA 100x
- 5,5 ml Pen Strep

Selektionsmedium für depletierte Prostatazelllinien, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)

- 500 ml RPMI Medium 1640 (1x)+ GlutaMAX™ - I
- 50 ml FCS
- 5,5 ml Natrium Pyruvate
- 5,5 ml MEM NEAA 100x
- 5,5 ml Pen Strep
- 84,9 µl Puromycin-Lösung (10 µg/µl)

OPTIMEM-Medium

2.3 Zellpflege

Die verwendeten Zelllinien wurden je nach Bedarf in T-25, T-75 oder T-175 Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Sowohl die Prostata(karzinom)zelllinien als auch die Nierenzelllinie (Phoenix) wurden jeden zweiten Tag mit neuem Vollmedium versorgt (siehe Punkt 2.2).

Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen wie in Tabelle 2.2 aufgeführt, mit Hilfe von Trypsin gesplittet und in eine neue Flasche umgesetzt.

Tabelle 2.2 Zellpflege

Kulturflasche	Volumen Medium (ml)	Volumen Trypsin (ml)	Trypsinierungszeit (Minuten)	Umsetzungsvolumen (ml)
T-25	5	1	5 /37 °C	1
T-75	10	2	5 /37 °C	2
T-175	20	4	5 /37 °C	4

Auf Grund der hohen Empfindlichkeit wurde die Trypsinierungszeit für die LNCaP-Zellen auf 1 Minute bei RT und für die Phoenix-Zellen auf 2 Minuten bei 37 °C reduziert. Außerdem wurde das Umsetzungsvolumen für die Phoenix-Zellen um die Hälfte reduziert.

2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzählung wurden die Prostatazellen wie in Punkt 2.3 beschrieben trypsinisiert und in Vollmedium aufgenommen. Dann wurden 20 µl der Zellsuspension in eine Zellkammer (Cellometer® Cell Counting Chamber) pipettiert und die Zellzahl mit Hilfe des Zellzählgeräts, Cellometer® Auto T4 Cell Counter bestimmt.

2.5 kommerzielle shRNA-Konstrukte

Um für die Depletionsversuche eine möglichst hohe Depletionseffizienz zu erzielen, wurden pro Gen 5 kommerziell erhältliche shRNA-Konstrukte von der Firma Sigma-Aldrich getestet. Für die shRNA-vermittelten Depletionsversuche wurde das Konstrukt mit der höchsten Depletionseffizienz ausgewählt (siehe Tabelle 2.3, fett gedruckt).

Tabelle 2.3 shRNA-Konstrukte von der Firma Sigma-Aldrich in Hamburg. Fett gedruckt sind die in den Depletionsversuchen verwendeten Konstrukte.

Konstrukt	Position	Bestellnummer	Basenfolge
ASF1A	D05	TRCN0000074268	GCCAGATGTTAAACTTTGAAT, CCGGGCCAGATGTTAAACTTTGAATCTCGAGATTCAAAGTT TAACATCTGGCTTTTTG
	D06	TRCN0000074269	CCAAATCTACAGTCACTTCTT, CCGGCCAAATCTACAGTCACTTCTTCTCGAGAAGAAGTGAC TGATAGATTTGGTTTTTG
	D07	TRCN0000074270	GTGAAGAATACGATCAAGTTT, CCGGGTGAAGAATACGATCAAGTTTCTCGAGAACTTGAT CGTATTCTTCACTTTTTG
	D08	TRCN0000074271	AGGCGTAACTGTTGTGCTAAT, CCGGAGGCGTAACTGTTGTGCTAATCTCGAGATTAGCACAA CAGTTACGCCTTTTTTG
	D09	TRCN0000074272	GCACCTAATCCAGGACTCATT, CCGGGCACCTAATCCAGGACTCATTCTCGAGAATGAGTCTT GGATTAGGTGCTTTTTG
ATG5	C07	TRCN0000330323	GATTCATGGAATTGAGCCAAT,
	C08	TRCN0000330392	CCTTTCATTGAGAAGCTGTTT,
	C09	TRCN0000151963	CCTGAACAGAATCATCCTTAA, CCGGCCTGAACAGAATCATCCTTAACTCGAGTTAAGGATG ATTCTGTTCCAGTTTTTTG
	C10	TRCN0000150645	GATTCATGGAATTGAGCCAAT, CCGGGATTCATGGAATTGAGCCAATCTCGAGATTGGCTCAA TTCCATGAATCTTTTTTG
	C11	TRCN0000151474	CCTTTCATTGAGAAGCTGTTT, CCGGCCTTTCATTGAGAA GCTGTTTCTCGAGAAACAGCTTCTGAATGAAAGTTTTTTTG
CD164	C12	TRCN0000057553	CCTGTGCGAAAGTCTACCTTT, CCGGCCTGTGCGAAAGTCTACCTTCTCGAGAAAGGTAGAC TTTCGCACAGTTTTTTG
	D01	TRCN0000057554	CTGCAAATCTAAAGAACGAAA, CCGGCTGCAAATCTAAAGA ACGAAACTCGAGTTTCGTTCTTTAGATTGCAGTTTTTTG
	D02	TRCN0000057555	GCTATTGTTACATAACTCAA, CCGGGCTATTGTTACATAACTCAACTCGAGTTGAGTTATGT GAACAATAGCTTTTTG
	D03	TRCN0000057556	CGTGACGACTTTAGCGCCCAT, CCGGCGTGACGACTTTAGCGCCCATCTCGAGATGGGCGCTA AAGTCGTCACGTTTTTG
	D04	TRCN0000057557	CGACAGACTTCTGTTCCGTTT, CCGGCGACAGACTTCTGTTCCGTTTCTCGAGAAACGGAAC AGAAGTCTGTCGTTTTTG
EEF1A1	A01	TRCN0000029329	CCTTGTTCAAGGGATGGAAA, CCGGCCTTGTTCAAGGGATGGAAACTCGAGTTTCCATCCC TTGAACCAAGTTTTT
	A02	TRCN0000029330	GCTGCCATTGTTGATATGGTT, CCGGGCTGCCATTGTTGATATGGTTCTCGAGAACCATATCA ACAATGGCAGCTTTTT
	A03	TRCN0000029331	CCAGAAGAGATATGAGGAAAT, CCGGCCAGAAGAGATATGAGGAAATCTCGAGATTTCTCAT ATCTCTTCTGGTTTTT
	A04	TRCN0000029332	CCCAGGACACAGAGACTTTAT, CCGGCCAGGACACAGAGACTTTATCTCGAGATAAAGTCTC TGTGTCCTGGGTTTTT
	A05	TRCN0000029333	CCTCTCCAGGATGTCTACAAA, CCGGCCTCTCCAGGATGTCTACAAACTCGAGTTTGTAGACA TCCTGGAGAGGTTTTT

Konstrukt	Position	Bestellnummer	Basenfolge
HACE1	E08	TRCN0000003413	GCTGTGCCATATACTCCAAAT, CCGGCTGTGCCATATACTCCAAATCTCGAGATTTGGAGTATAT GGCACAGCTTTTT
	E09	TRCN0000003414	CGGAAGGATTTGTTATGTTTA, CCGGCGGAAGGATTTGTTATGTTTACTCGAGTAAACATAACAAA TCCTCCGTTTT
	E10	TRCN0000003415	GCAGATTGTCAGGATGTTATT, CCGGCAGATTGTCAGGATGTTATTCTCGAGAATAACATCCTGA CAATCTGCTTTTT
	E11	TRCN0000003416	CCAGAAATTGATGTGAGTGAT, CCGGCCAGAAATTGATGTGAGTGATCTCGAGATCACTCACATCA ATTCTGTTTT
	E12	TRCN0000003417	GCCAGTACCTAAAGATTCTAA, CCGGCCAGTACCTAAAGATTCTAACTCGAGTTAGAATCTTTA GGTACTGGCTTTTT
HDAC2	A11	TRCN0000004822	GCAGACTCATTATCTGGTGAT, CCGGCAGACTCATTATCTGGTGATCTCGAGATCACCAGATAAT GAGCTGCTTTTT
	A12	TRCN0000004823	GCAAATACTATGCTGTCAATT, CCGGCAAATACTATGCTGTCAATTCTCGAGAATTGACAGCATA GTATTTGCTTTTT
	B01	TRCN0000004819	CAGTCTACCAATTTTCAGAAA,CCGGCAGTCTACCAATTTTCAG AAACTCGAGTTTCTGAAATTGGTGAGACTGTTTT
	B02	TRCN0000004820	CCAGCGTTTGATGGACTCTTT, CCGGCCAGCGTTTGATGGACTCTTTCTCGAGAAAGAGTCCATCA AACGCTGGTTTT
	B03	TRCN0000004821	GCCTATTATCTCAAAGGTGAT, CCGGCCCTATTATCTCAAAGGTGATCTCGAGATCACCTTTGAGA TAATAGGCTTTTT
HMG3	C02	TRCN0000019106	CTGTAGATAACGAGGGAGAAT, CCGGCTGTAGATAACGAGGGAGAATCTCGAGATTCTCCCTCGT TATCTACAGTTTT
	C03	TRCN0000285453	AGCTGTGTGTAAGATTGATTC,
	C04	TRCN0000275882	ACTAAACAGGAGCCACAAGA
	C05	TRCN0000275883	TCTGCCAGATTGTCAGCGAAA
	C06	TRCN0000019104	TCTGCCAGATTGTCAGCGAAA, CCGGTCTGCCAGATTGTCAGCGAAACTCGAGTTTCGCTGACAA TCTGGCAGATTTTT
	MARCKS	B04	TRCN0000029039
B05		TRCN0000029040	GCCTTCAAAGCGAACGGACA, CCGGCCCTTCAAAGCGAACGACTCGAGTGTCCGTTTCGCT TTGGAAGGCTTTTT
B06		TRCN0000029041	GAGCGCTTCTCTTCAAGAA, CCGGGAGCGGCTTCTCTTCAAGAACTCGAGTTCTTGAAGGAG AAGCCGCTTTTT
B07		TRCN0000029042	TGAAGGTAAACGGCGACGCTT, CCGGTGAAGGTAA ACGGCGACGCTTCTCGAGAAGCGTCGCCGTTTACCTTCATTTT
B08		TRCN0000029043	CAGCCCGAGTGCAGTCCAGAA,CCGGCAGCCCGAGTGCAGTCC AGAACTCGAGTTCTGGACTGCACTCGGGCTGTTTT
PHIP		E03	TRCN0000147136
	E04	TRCN0000147009	CGGATATTTACTGGTTCTGAT, CCGGCGGATATTTACTGGTTCTGATCTCGAGATCAGAACCAGTA AATATCCGTTTTTTG
	E05	TRCN0000130419	GTTAAGGAGAAGTAACCGAAA, CCGGTTAAGGAGAAGTAACCGAAACTCGAGTTTCGGTACTT CTCCTTAACTTTTTTG
	E06	TRCN0000130643	CCATGATATGCCTGACGTTAT, CCGGCCATGATATGCCTGACGTTATCTCGAGATAACGTCAGGC ATATCATGGTTTTTTG

Konstrukt	Position	Bestellnummer	Basenfolge
SENP6	D10	TRCN0000004103	GACAGAACTAACAGAAGAGAA,CCGGGACAGAACTAACAGAA GAGAAGCTCGAGTTCTCTTCTGTTAGTTCTGCTTTTT
	D11	TRCN0000004104	CACAGGATTAACAACCAAGAA, CCGGCACAGGATTAACAACCAAGAACTCGAGTTCTTGTTGTT AATCCTGTGTTTTT
	D12	TRCN0000004105	CTACAGGAAGATCAGAGCAA, CCGGCTACAGGAAGATCAGAGCAAACCTCGAGTTTGCTCTGAT CTTCCTGTAGTTTTT
	E01	TRCN0000272788	CCTTGATCCTCCGGCAAATAT,
	E02	TRCN0000272838	CACAGGATTAACAACCAAGAA,
SMAP1	F01	TRCN0000151136	GCTGTTGTTATGATGTGCTTA, CCGGGCTGTTGTTATGATGTGCTTACTCGAGTAAGCACATCAT AACAACAGCTTTTTTG
	F02	TRCN0000151900	CCATCCAATTAGCTTATGGTA, CCGGCCATCCAATTAGCTTATGGTACTCGAGTACCATAAGCTA ATTGGATGGTTTTTTG
	F03	TRCN0000151035	GCAGCACAAGTGAATGAATA, CCGGGCAGCACAAGTGAATGAATACTCGAGTATTCATTACAC TTGTGCTGCTTTTTTG
	F04	TRCN0000150993	CCGATGATTTCTAATCCCTTA, CCGGCCGATGATTTCTAA TCCCTTACTCGAGTAAGGGATTAGAAATCATCGGTTTTTTG
	F05	TRCN0000151488	CCTGGAATATTGGTGTGTTTA, CCGGCCTGGAATATTGGTGTGTTTACTCGAGTAAACACACCAA TATCCAGTTTTTTTG
TRAF3IP2	F06	TRCN0000162747	CCGTGATGATAATCGTAGCAA, CCGGCCGTGATGATAATCGTAGCAACTCGAGTTGCTACGATTA TCATCACGGTTTTTTG
	F07	TRCN0000160964	GCTTCAGAACACTCATGTCTA, CCGGGCTTCAGAACACTCATGTCTACTCGAGTAGACATGAGT GTTCTGAAGCTTTTTTG
	F08	TRCN0000158477	CATGGAATATCATTACCATT, CCGGCATGGAATATCATTACCATTCTCGAGAATGGTAATGAT AGTCCATGTTTTTTG
	F09	TRCN0000158671	CGAGCATTGATCATTAAA, CCGGCGAGGCATTGATATCATTAACTCGAGTTTAAATGATATC AATGCCTCGTTTTTTG
	F10	TRCN0000158694	GCGGAAAGTCTTTATCACTTA, CCGGGCGGAAAGTCTTTATCACTTACTCGAGTAAGTGATAAA GACTTCCGCTTTTTTG
TTK	B09	TRCN0000006356	CGGTATTAAGTCCCAAGAAT, CCGGCGGTATTAAC TGCCAAGAATCTCGAGATTCTGGGCAGTTAATACCGTTTTT
	B10	TRCN0000006357	CCAGTTGTAAGAATGACTTT, CCGGCCAGTTGTAAGAATGACTTTCTCGAGAAAGTCATTCT TTACAAGTGGTTTTT
	B11	TRCN0000006358	GCACAATTTGAAGTGTCAAA, CCGGGCACAATTTGAAGTGTCAAACTCGAGTTGTGACAGTTC AAATTGTGCTTTTT
	B12	TRCN0000011012	GCCAACTTGTGGTCTGAATT, CCGGGCCAACTTGTGGTCTGAATTCTCGAGAATTCAGACCAA CAAGTTGGCTTTTT
	C01	TRCN0000011011	GCAACCACTTATGGTACTGTA, CCGGGCAACCACTTATGGTACTGTAAGTACTCGAGTACAGTACCATA AGTGGTTGCTTTTT

Konstrukt	Position	Bestellnummer	Basenfolge
PTEN		TRCN0000002746	CCACAGCTAGAACTTATCAAA
Rb1		TRCN0000295892	GTGCGCTCTTGAGGTTGTAAT
shGFP		Everett et al. [39, 40]	CAACAAGATGAAGAGCACCAA Quelle: Zur Verfügung gestellt von R. Everett et al. (2006)
shNeg		Everett et al. [39, 40]	TTATCGCGCATATCACGCG, R. Everett et al. (2013)

2.6 TaqMan®-Sonden

Zur Bestimmung der mRNA Expression der untersuchten Gene mittels TaqMan®-PCR wurden folgende Sonden von der Firma Sigma-Aldrich (Hamburg) verwendet (siehe Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4 TaqMan®-Sonden (Sigma-Aldrich, Hamburg)

Gene Symbol	Assay-ID
ASF1A	Hs00204044_m1
ATG5	Hs00169468_m1
CD164	Hs00174789_m1
EEF1A1	Hs00265885_g1
HACE1	Hs00410879_m1
HDAC2	Hs00231032_m1
HMGN3	Hs01070466_g1
MARCKS	Hs00158993_m1
PHIP	Hs00215670_m1
SENP6	Hs00210213_m1
SMAP1	Hs00222567_m1
TRAF3IP2	Hs00210113_m1
TTK	Hs01009870_m1
GAPDH	Hs99999905_m1

2.7 Verwendete Antikörper

Zur Darstellung der Depletierung auf Proteinebene mittels Western Blot wurden die für folgende Proteine spezifischen Antikörper verwendet.

Tabelle 2.5 Western Blot Antikörper

Protein	Verdünnung	Firma
α -Tubulin	1:1.000	Sigma-Aldrich, München
goat α -mouse IgG	1:10.000	Dianova, Hamburg
goat α -rabbit IgG	1:10.000	Dianova, Hamburg
HMGN3	1:2000	Novus Biologicals, Littleton, USA
SMAP1	1:1000	Novus Biologicals, Littleton, USA

2.8 Reagenzien und kommerzielle Kits

Folgende Tabelle listet sämtliche in der Arbeit verwendeten Reagenzien und kommerziellen Kits auf.

Tabelle 2.6 Reagenzien und kommerzielle Kits

Reagenz	Bezugsquelle
Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich
Cell Extraction Buffer	Invitrogen
Chloroform	
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Invitrogen
dNTPs Mix (25X)	Applied Bioscience, Darmstadt
Ethanol 80 %	Merck Millipore, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck Millipore, Darmstadt
Fetal Bovine Serum Gold	PAA
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau	MERCK
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Bioscience, Darmstadt
Immersol™ 518F	Zeiss
LB broth, Miller	Sigma-Aldrich
Lipofectamine® 2000 (1mg/ml)	(PAA, A15-551)
MEM NEAA 100x	Invitrogen
Methanol	Merck
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ L)	Applied Bioscience, Darmstadt

Nuclease-free (DEPC-treated) H ₂ O	Applied Bioscience, Darmstadt
Opti-MEM® I (1x)	Invitrogen, Darmstadt
Pen Strep	Invitrogen, Darmstadt
Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung	Invitrogen, Darmstadt
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards	Bio-Rad, München
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Puromycin dihydrochloride	Sigma-Aldrich
Qiagen Plasmid <i>Plus</i> Maxi Kit	Qiagen
Qubit Protein Assay Kit	Invitrogen, Darmstadt
Qubit protein buffer	Invitrogen, Darmstadt
Qubit protein reagent	Invitrogen, Darmstadt
Qubit protein standard #1, #2, #3	Invitrogen, Darmstadt
Random primers (10X)	Applied Bioscience, Darmstadt
Reverse Transcription Buffer (10X)	Applied Bioscience, Darmstadt
RNase Inhibitor [ABI, NEU 12.7.07], 20 U/μl	Applied Bioscience, Darmstadt
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™- I	Invitrogen, Darmstadt
Sodium Pyruvate	Invitrogen, Darmstadt
Trizol®	Invitrogen, Darmstadt
universal mix [2x] für TaqMan®-PCR	Applied Bioscience, Darmstadt

2.9 Material und Geräte

Folgende Tabelle listet sämtliche in der Arbeit verwendeten Materialien und Geräte auf.

Tabelle 2.7 Material und Geräte

Material/Gerät	Bezugsquelle
6-, 12-, 24- Well Multiwell Platte CELLSTAR®	Greiner BioOne, Frickenhausen
7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Bd BioCoat Cell Culture Control Inserts	BD BioSciences
Bd BioCoat Matrigel Invasion Chambers	BD BioSciences
Deckgläser	Marienfeld
Flourometer, Qubit 2.0	Invitrogen, Life Technologies Gmbh, Darmstadt
Inkubator	Sanyo, München
Kamera mit Luftkühlung	TILL Phototonics GmbH, München
Kulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	Bio-Rad, München
NanoDrop ND 1000	Peqlab, Erlangen
Objektträger	Roth
Olympus IX70 Fluorescence Microscope	Olympus, Hamburg
PTC-100 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Reno, Nevada, USA
Schüttelinkubator GFL 3031	GFL, Großburgwedel
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega, Madison, USA
Werkbank, Heraeus HB 2448	Heraeus, Hanau
Zählkammer, Cellometer Cell Counting Chamber	Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA
Zellzählgerät, Cellometer Auto T4 Cell Counter	Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA
Zentrifuge, Heraeus Biofuge Fresco	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Zentrifuge, Heraeus Multifuge 3L	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Zentrifuge, Beckmann J2-21M/E	Beckmann, Krefeld
Zentrifuge, Sigma 2K 15	Sigma, Osterode am Harz

2.10 Verwendete Lösungen

Folgende Tabelle listet sämtliche in der Arbeit verwendeten Lösungen auf.

Tabelle 2.8 Verwendete Lösungen

Lösung	Komponenten
0,1M PMSF-Lösung	8,85 mg PMSF 500 µl DMSO
10x LB-Medium	250 g LB broth, Miller ad 1L dest. H ₂ O
10x Protease Inhibitor Cocktail	Serum in 10 ml Cell Extraction Buffer lösen
10xTBS	60,5 g Tris 87,6 g NaCl dissolve in 800 ml ad 1L (pH 7,5)
1x LB-Medium + Ampicillin (0,1mg/ml)	100 ml 10x LB-Medium 1ml Ampicillin-Stocklösung 900 ml dest. H ₂ O
1xTBST	100 ml 10x TBS 10 ml 10 % Tween 20 ad 1 L
3 % Blocking Solution	∑500 ml 15g nonfat dried milk in 500 ml TBST
Ampicillin-Stocklösung (100mg/ml)	1 g Ampicillin sodium salt 100 ml dest. H ₂ O
P1-Buffer	250 ml Buffer P1 250 µl RNase A
P2-Buffer	250 ml Buffer P2 Lysis buffer 250 µl LyseBlue®
PE-Buffer	add 24 ml Ethanol absolut
Puromycin-Lösung (10 µg/µl)	100 mg Puromycin dihydrochloride 10 ml dest. H ₂ O
Qubit Working Solution	1 µl Qubit protein reagent 199 µl Qubit protein buffer
RA3-Buffer	Add 100 ml Ethanol absolut
rDNase-Lösung	rDNase, ad 450 rDNase
Working Cell Extraction Buffer	12,5 µl 10x Protease Inhibitor Cocktail 25,5 µl 0,1 M PMSF-Lösung 2462 µl Cell Extraction Buffer

2.11 Plasmid-Isolierung von shRNA-Konstrukten

Für die Isolation der shRNA-Konstrukte aus den Escherichia Coli Bakterien wurde das kommerziell erhältliche Qiagen Plasmid *Plus* Maxi Kit von der Firma Qiagen verwendet. Die gewonnene reine Plasmid-DNA diente der Transfektion (siehe Punkt 2.19) und Transduktion (siehe Punkt 2.20) der Versuchszelllinien.

Für die Plasmid-Isolierung wurde ein Teil der Bakterienkultur mit einer Pipettenspitze aufgenommen, in 200 ml ampicillinhaltiges (100 mg/l) LB-Medium überführt und bei 37 °C und 120 g auf einem Schüttler über Nacht (16-18 h) vermehrt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-Isolierung durchgeführt. Dazu wurde die Kultur in einen Zentrifugenbecher überführt und bei 4800 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt, das Bakterienzellpellet mit 8 ml P1-Buffer resuspendiert und in ein 50 ml Falcon überführt. Durch die Zugabe von 8 ml P2-Buffer wurde das Gemisch invertiert. Nach einer Inkubation von 3 Minuten bei RT wurde die Reaktion mit 8 ml S3-Buffer gestoppt und das Gemisch bei 5000 g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde in die Maxi Cartridges gefüllt und mit einem Plunger in ein 50 ml Falcon gepresst. Zur Plasmid-Bindung wurden 5 ml BB-Puffer zugefügt. Nachdem der Filter und der Extender auf den Vac-Man® (Lab-Pig) gesteckt wurden, wurde das Gemisch überführt und mit Hilfe des Lab-Pig filtriert. Die Plasmide verblieben dabei im Filter. Dann wurde der Filter mit 0,7 ml ETR-Buffer und 0,7 ml PE-Buffer gewaschen und der Filter für 1 Minute bei fullspeed trocken zentrifugiert. Anschließend wurde der Filter auf ein beschriftetes Eppendorf Tube gesetzt und 400 µl dH₂O direkt auf den Filter pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde die Probe bei full-speed zentrifugiert und so die Plasmid-DNA aus dem Filter eluiert.

2.12 RNA Isolation aus Prostatazelllinien

Für die RNA-Isolation aus den Prostatazellen wurde zunächst eine Guanidin-Isothiocyant-Phenol-Chloroform-Fällung durchgeführt und anschließend das Nucleo-Spin®RNA II Kit von Machery-Nagel verwendet. Zu Beginn wurden circa 1×10^6 Zellen in einer 12-Well-Kulturplatte mit 400 µl Trizol® lysiert, in ein 2 ml Eppendorf Tube überführt, 100 µl Chloroform hinzugefügt und die Proben für 15 Sekunden gevortext. Mittels Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 21.460 g wurden die Proben anschließend in ihre wässrige und organische Phase aufgetrennt. Von der RNA-enthaltenden wässrigen Phase wurden circa 200 µl abpipettiert und mit 200 µl Ethanol (80%) gemischt. Die organische Phase, die unter anderem in Phenol gelöste Proteine enthielt, wurde verworfen. Zur Isolation der RNA aus der wässrigen Phase wurden die im Nucleo-Spin®RNA II Kit enthaltenen Filtersäulen auf das „Labpig“ gesteckt, die RNA-Ethanol-Mischung auf den Filter pipettiert und mittels eines Unterdrucks abgesaugt. Dann wurden 400 µl MDB Buffer (Entsalzung der Proben) auf den Filter pipettiert, abgesaugt und der Filter im Anschluss für 1 Minute bei 4 °C und 21.460 g trocken zentrifugiert. Durch die Zugabe von 95 µl DNase-Lösung und die darauf folgende Inkubation von 15 Minu-

ten bei RT wurden eventuell vorhandene -Reste abgebaut. Im Anschluss an den Waschprozess der Filtersäule mit 300 µl RA2 Buffer, 600 µl RA3 Buffer und 300 µl RA3 Buffer wurde diese für 1 Minute bei 4 °C und 21.460 g trocken zentrifugiert. Dann wurden 40 µl RNase freies Wasser direkt auf den Filter pipettiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Abschließend wurde die RNA mittels Zentrifugation für 1 Minute bei 21.460 g aus dem Filter eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte RNA bei -20 °C gelagert.

2.13 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von RNA- und DNA Proben

Zur Bestimmung der Konzentrationen und Reinheit von DNA- und RNA-Proben wurde das Peqlab NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer verwendet.

In beiden Fällen wurde zunächst der Leerwert bei 260 nm mit 1 µl RNase freiem Wasser eingestellt. Dann wurde die Absorption (A) von 1 µl der RNA- bzw. DNA-Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Bestimmung der Probenkonzentration erfolgte unter der Annahme, dass eine A von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml und einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht [41]. Die Messung bei 280 nm und 230 nm wurde zur Reinheitsbestimmung der Proben durchgeführt. Um Verunreinigungen der Proben mit Salzresten zu prüfen wurde der Quotient von $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$ berechnet. Dieser Wert sollte sowohl bei den DNA- als auch bei den RNA-Proben zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Proteinverunreinigungen wurden durch den Quotienten von $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ bestimmt. Ein Quotient unter 1,8 (DNA) bzw. 2,0 (RNA) deutet auf eine Verunreinigung hin.

2.14 Reverse Transkription

Die reverse Transkription dient der Synthese eines zur RNA komplementären DNA-Stranges (cDNA) katalysiert durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen. Die cDNA-Synthese ist Voraussetzung für die Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionen (PCR).

Für die reverse Transkription wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von der Firma Applied Bioscience verwendet. Zunächst wurden die unter Punkt 2.12 isolierten RNA-Proben mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 1000 ng/25 µl verdünnt. Anschließend wurde pro Probe eine cDNA-Synthese-Mischung aus 5 µl Reverse Transcription Buffer (10x), 2 µl dNTPs Mix (25x), 5 µl Random Primer, 8 µl RNase freies Wasser, 2,5 µl MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl) und 2,5 µl RNase Inhibitor (1 U/µl) hergestellt, zu 25 µl der verdünnten RNA-Probe pipettiert und gevortext. Dann wurden die Proben in einem Thermocycler 10 Minuten bei 25 °C, 120

Minuten bei 37 °C und 5 Sekunden bei 85 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl mit RNase freiem Wasser verdünnt.

2.15 TaqMan®-PCR

Die TaqMan®-PCR dient der Bestimmung der mRNA-Expression eines Zielgenes. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die spezifische Vervielfältigung eines Nukleinsäureabschnittes in Echtzeit erfasst wird und somit eine quantitative Bestimmung der Expression während der PCR erfolgen kann. Die Grundlage dieser Methode sind sogenannte TaqMan®-Sonden, die spezifisch an die Ziel-DNA binden und der Polymerase eine Vervielfältigung dieser ermöglichen. Die Sonden sind zusammengesetzt aus einem Reporter- und einem Quencherfarbstoff. Durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase werden die beiden Bestandteile voneinander getrennt. Dabei entsteht ein messbares Fluoreszenzsignal. Zur Bestimmung der Fluoreszenzstärke wird ein Ct-Wert (Cycle Threshold) festgelegt der den Beginn der exponentiellen Phase markiert.

Zur Durchführung der TaqMan®-PCR wurden zunächst 50 µl der unter Punkt 2.14 synthetisierten cDNA mit 150 µl dH₂O zu einer Endkonzentration von 5 ng/µl verdünnt. Dann wurde pro Probe ein MasterMix aus 15 µl Universal mix [2x], 1,5 µl TaqMan®-Sonde und 8,5 µl DEPC-Wasser hergestellt. Dieser wurde zusammen mit 5 µl cDNA in eine 96-Well Platte pipettiert. Im Anschluss an die Plattenzentrifugation wurde die Real-Time PCR mit dem 7900HT Fast Real-Time PCR System Cyler durchgeführt. Die Aktivierung der Taq-Polymerase erfolgte bei 95 °C und 10 Minuten. Dann wurde der cDNA-Strang bei 95 °C für 15 Sekunden aufgetrennt. Die Primerhybridisierung erfolgte bei 60 °C für eine Minute. Im Anschluss an eine 40-fache Wiederholung dieser Schritte wurde der Ct-Wert angezeigt. Abschließend wurde die nach *GAPDH* normalisierte virtuelle mRNA-Kopiezahl mittels der Standardkurven-Methode bezogen auf 10⁴ *GAPDH*-Kopien errechnet.

2.16 Proteinisolation

Für die Bestimmung der Expression auf Proteinebene mittels Western Blot (siehe Punkt 2.18) ist zu vor eine Isolation der Proteine aus den Prostatazellen notwendig. Um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern, wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Die Prostatazellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert und bis zu einer Konfluenz von 90% wachsen gelassen. Dann wurde das Medium abgesaugt, die Wells mit 1 ml kaltem PBS gewaschen, 500 µl Cell Extraction Buffer hinzugefügt, die Zellen mit einem Zell Scraper gelöst und die Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorf Tube überführt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis inkubiert wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Dadurch wurden die Proteine aus den Zellen in den Cell Extraction Buffer aufgenommen. Die Proteinlösung wurde in ein neues Tube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Zell-pellet wurde verworfen.

2.17 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben wurde mit dem Qubit 2.0 Fluorometer durchgeführt.

Dazu wurden zunächst folgende Lösungen angesetzt. Drei Proteinstandards zur Bestimmung einer Eichgerade aus 190 µl Qubit Working Solution und 10 µl Qubit protein standard und 1:10 Verdünnungen der Proteinproben mit dH₂O. Davon wurden 1 µl in 199 µl Qubit Working Solution pipettiert. Und ein Blindwert (Blank) aus 199 µl Qubit Working Solution und 1 µl Working Cell Extraction Buffer. Die Lösungen wurden gevortext und 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Konzentrationsmessung der Standards, des Blindwerts und der Proteinproben. Zur Berechnung der Proteinkonzentration der Ausgangsproben wurde folgende Formel verwendet.

$$\text{Proteinkonzentration} = (\text{gemessene Konz.} * \mathbf{200} \text{ (1:200 Verd.)} - \text{Konz.Blank} * \mathbf{200} \text{ (1:200Verd.)}) * \mathbf{10} \text{ (1:10 Verd.)}$$

2.18 Western Blot

Um die Depletion der Expression auf Proteinebene darzustellen wurden Western Blots durchgeführt. Dazu wurden die isolierten Proteine (siehe Punkt 2.16), nach Einsatz von 40 µg Proteinprobe und einer 1:1 Verdünnung mit Laemmli-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die stabilen Polyacrylamid-Gele® TGX™ Gels (Mini-Protean) erlaubten eine Auftrennung bei 400 Volt (V) in 15 Minuten.

Das Gel wurde im Anschluss auf eine Nitrozellulose Membran gelegt. Um die negativ geladenen, aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf die Membran zu transferieren, wurde durch den Trans-Blot® SD Semi-Dryer ein Elektrisches Feld von 2,5 Ampere für 15 Minuten erzeugt. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde mittels Ponceau S Färbung überprüft. Dann wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulose Membran mit Hilfe einer 3 prozentigen Milchpulverlösung für eine Stunde geblockt.

Um die gesuchten Proteine darzustellen wurden spezifische Antikörper (AK) verwendet. Dazu wurde ein proteinspezifischer erster AK verwendet (Inkubation über Nacht) und ein zweiter AK (Inkubation 4 Stunden). Die Verdünnungen der verschiedenen AK sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Der zweite AK erzeugt zusammen mit dem Substrat, Clarity™ Western ECL Substrate, (Inkubation 5 Minuten) das Signal für den Proteinachweis.

Nach einminütiger Inkubation mit dem Entwicklungsfilm (Kodak X-Sight G/RA Film) wurde dieser entwickelt und die Proteinbanden wurden sichtbar.

Die Größe der Proteinbanden konnten anhand der Ladder, Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards, die in jedem Western Blot mitlief, zugeordnet werden.

Im Anschluss an den Nachweis des Zielproteins, wurde der zweite AK mittels einer zehnpromzentigen Natriumacetatlösung blockiert und das Referenzprotein Tubulin nachgewiesen.

2.19 Transfektion von shRNA-DNA-Plasmiden mit Lipofectamin®2000

Die Transfektion mit Lipofectamin®2000 (Lipofektion) zählt zu den chemischen Transfektionsmethoden und beruht auf dem Prinzip der Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen DNA-Strängen und kationischen Lipiden. Durch diese Wechselwirkungen kommt es zur Ausbildung von DNA-Lipid-Komplexen (Liposomen), die durch Endozytose in das Zytoplasma der Zielzelle aufgenommen werden. Im Zytoplasma wird die DNA freigesetzt, in den Zellkern transportiert und dort exprimiert. Mit Hilfe dieser Methode wurden die unter Punkt 2.11 isolierten shRNA-Plasmide zur Depletion der Zielgene in die jeweiligen Prostatazelllinien eingebracht.

Die Prostatazelllinien wurden zunächst mit einer Zellzahl von 2×10^5 Prostatazellen/Well mit Vollmedium im 6-Well-Format ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70% bis 80% wachsen gelassen. Zur Vorbereitung der Transfektion wurde das Vollmedium gegen Opti-MEM® I Medium ausgetauscht. Dann wurde pro Well ein Transfektionsmix aus 4 µg shRNA-Plasmid, 100 µl Opti-MEM® I und 8 µl Lipofectamin®2000 hergestellt, zur Liposomenbildung 20 Minuten inkubiert und anschließend auf die Prostatazellen pipettiert und durch Kreuzbewegungen der 6-Well-Platte verteilt. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsmix für 8 bis 10 Stunden inkubiert. Dann wurde das Medium gegen Vollmedium ausgetauscht. Nach weiteren 24 Stunden wurde zur Selektion der transfezierten Zellen das Vollmedium gegen ein puromycinhaltiges Selektionsmedium ausgetauscht.

2.20 Transduktion von Prostatazellen mit Lentiviren

Mit Hilfe von viralen Vektoren kann Fremd-DNA in eine Zielzelle eingebracht werden. Dieses Verfahren wird als Transduktion bezeichnet. Durch die Transduktion wird die Fremd-DNA in das Genom der Zielzelle integriert und damit eine dauerhafte (stabile) Veränderung der Zielzelle erzielt.

Für die Produktion der viralen Vektoren wurden Phoenix-Zellen verwendet. Diese wurden mit Vollmedium im 6-Well-Format ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50% wachsen gelassen. Es wurde ein Transfektionsmix aus 1 ml Vollmedium, 6 µg shRNA-Plasmid, 3 µg pRev, 3 µg pRRE, 1,5 µg pVSV-G und 40 µl Polyethylenimin (PEI) her-

gestellt und zur Liposomenbildung 10 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die 293T-Zellen mit frischem DMEM-Vollmedium versorgt. Anschließend wurde der Transfektionsmix auf die Zellen pipettiert und durch Kreuzbewegungen der 6-Well-Platte verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden im Inkubator wurden die Zellen mit neuem DMEM-Vollmedium versorgt. Die Virusernte erfolgte 36 bis 48 Stunden nach der Transfektion. Dazu wurde das Medium mit einer Einmalspritze abgesaugt und durch einen Mikrofilter auf die Prostatazellen gegeben.

Die Prostatazellen wurden vorher pro Gen im Einfachansatz mit einer Zellzahl von 2×10^5 pro Well mit Vollmedium im 6- oder 12-Well-Format ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70% bis 80% wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen mit frischem Vollmedium versorgt. Anschließend wurden 400 μ l (6-Well) bzw. 200 μ l (12-Well) des Lentiviruses auf die Zellen gegeben. Zur Kontrolle der Selektion blieb ein Well unbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden im Inkubator wurde das Medium gegen frisches Vollmedium ausgetauscht. Nach weiteren 12 Stunden wurde das Vollmedium gegen ein puromycinhaltiges Selektionsmedium ausgetauscht. Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt und das Zellwachstum mikroskopisch kontrolliert. Die Selektion war abgeschlossen, als alle Zellen im Selektionskontrollwell gestorben waren. Die Wachstumszeit der transduzierten Zellen betrug circa 10 Tage. Alle Arbeiten im S2-Bereich wurden von Frau Martina Kluth durchgeführt.

2.21 Colony-Formation-Assay

Colony-Formation-Assays werden verwendet, um das klonogene Verhalten von Zelllinien zu untersuchen. Es kann so zum Beispiel die Auswirkung einer gezielten Gensuppression auf das Zellwachstum untersucht werden.

Die Prostatazellen wurden für jedes Gen im Doppelansatz mit einer Zellzahl von 2×10^5 pro Well mit Vollmedium im 6-Well-Format ausgesät. Das bekannte Tumorsuppressorgen *RB1* und das essentielle Tumorsuppressorgen *PTEN* wurden als Positivkontrollen verwendet. Außerdem wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt. Zum einen eine shRNA (*shGFP*), die gegen das im humanen Genom nicht vorkommende grün fluoreszierende Protein (*GFP*) gerichtet ist. Bei der anderen Negativkontrolle handelt es sich um eine shRNA (*shNeg*), die gegen die bakterielle Polymerase III gerichtet ist. Alle verwendeten Kontrollen, waren bereits am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf etabliert. Zusätzlich wurden zwei Wells zur Selektionskontrolle ausgesät. Für die Gensuppression wurden shRNA-Konstrukte mit einer Puromycinresistenz verwendet, die wie unter Punkt 2.11 beschrieben aus *E. coli* isoliert wurden. Alle verwendeten shRNA-Konstrukte wurden mittels Transfektion (siehe Punkt 2.19) bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % in die Zielzellen eingebracht. Die Selektionskontrollwells wurden nicht transfeziert. Die Selektion der transfezierten Zellen erfolgte 36 Stunden nach der Transfektion mit Selektionsmedium. Das Selektionsmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Zeitgleich wurde das Wachstum der Zellen mikrosko-

pisch beobachtet. Die Selektion war abgeschlossen, nachdem alle Zellen in den Selektionskontrollwells gestorben waren. Nach 10 bis 14 Tagen wurde das Selektionsmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Dann wurden die Zellen zur Fixierung mit 1,5 ml Methanol für 2 bis 3 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Giemsa gefärbt, die 6-Well-Platten mit Wasser ausgewaschen und über Nacht an der Luft getrocknet. Abschließend wurden die Zellkolonien makroskopisch gezählt. Berücksichtigt wurden dabei alle Kolonien ab einem Durchmesser von 1 mm. Um statistisch signifikante Unterschiede im Zellwachstum zu identifizieren wurde eine einfaktorische ANOVA-Analyse durchgeführt.

2.22 Invasion Assay

Mit Hilfe des Invasion Assays kann die Auswirkung der shRNA-vermittelten Suppression von potentiell tumorbiologischen Genen auf das Metastasierungspotential von Zellen *in-vitro* untersucht werden. Für die Durchführung des Invasion Assays wurden BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber (Invasion Inserts) und BD BioCoat™ Control 8.0 µm PET Membrane 24-well Cell culture inserts (Control Inserts) der Firma BD (Franklin Lakes, USA) verwendet. Der Versuch wurde im Doppelansatz mit den Zelllinien DU 145 und BPH-1 durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Negativkontrolle shGFP verwendet.

Als Erstes wurden die bei -20 °C gelagerten Invasion Inserts bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden 0,5 ml RPMI Medium (ohne Zusätze) in eine 24-Well-Platte pipettiert. Dann wurden die Invasion Inserts in die Wells gesetzt, mit 0,5 ml RPMI Medium (ohne Zusätze) befüllt und die Invasion Chamber im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 Stunden rehydriert. Während der Inkubationszeit wurden die transduzierten Zellen (siehe Punkt 2.20 Transduktion) wie unter Punkt 2.3 beschrieben mit RPMI-Medium (ohne Zusätze) trypsinisiert. Danach wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Punkt 2.4) und eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen / 0,5 ml hergestellt. Anschließend wurden 0,5 ml RPMI-Medium (10 % FCS) in zwei 24 Well-Platten pipettiert, die rehydrierten Invasion Inserts in die Wells der einen Platte gesetzt und das Medium aus den Invasion Inserts abgesaugt. Nachdem die Control Inserts in die zweite 24-Well-Platte gesetzt waren, wurden je 0,5 ml der Zellsuspension luftblasenfrei in die Invasion Inserts und Control Inserts pipettiert und die Platten für 24 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die nicht-invasiven Zellen mit einem in Medium getränkten Watte- stäbchen aus den Inserts entfernt. Zur Fixierung der invasiven Zellen wurden die Inserts anschließend in 1 ml Methanol für 2 Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen für 2 Minuten in 2 ml Giemsa inkubiert, die Inserts in Wasser gewaschen und 5 Minuten an der Luft getrocknet. Im Anschluss an die Färbung der Zellen wurde die Membran mit Hilfe eines Skalpell aus den Inserts entfernt, mit einem Tropfen Immersol™ auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Die Auswertung des

Invasion Assays erfolgte mit Hilfe eines Fotomikroskops. Dazu wurden vier repräsentative Bereiche der Membran fotografiert, die abgebildeten Zellen pro Bild gezählt und die mittlere Zellzahl errechnet. Dann wurden die Invasionsrate und der Invasion Index mit der unten angegebenen Formel berechnet. Ab einem Invasion Index > 1 wurde eine Erhöhung des Metastasierungspotentiales angenommen.

Invasionsrate = (mittlere Zellzahl Invasion Insert / mittlere Zellzahl Control Insert)*100

Invasion Index = Invasionsrate Gen / Invasionsrate Negativkontrolle

2.23 Datenbanken und Analyseprogramme

Ensembl, release 71 – April 2013: Zur Auswahl der analysierten Gene.

JMP, Version 9: Durchführung der einfaktoriellen ANOVA Analyse zur Bestimmung von signifikanten Wachstumsunterschieden in den Depletionsversuchen

TILL Photonics Imaging System Software Version 3.31: Anfertigung der Aufnahmen für den Invasion Assay.

IrfanView Freeware Version 3.33 ©1996-2001: Konvertierung von Bilddateien

3 Ergebnisse

3.1 Expression der 13 ausgewählten Kandidatengene in vier Prostata-(karzinom)Zelllinien

Mit Hilfe der TaqMan®-PCR konnte für die Gene *SMAP1*, *EEF1A1*, *PHIP*, *HMGN3*, *TTK*, *HACE1*, *ATG5*, *CD164*, *TRAF3IP2*, *MARCKS*, *HDAC2* und *ASF1A* eine geringe bis hohe mRNA-Expression in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP sowie in der Prostataepithelzelllinie BPH-1 gemessen werden. Eine besonders hohe Expression (≥ 100 mRNA-Kopien) in mindestens einer der getesteten Zelllinien konnte für 10 der untersuchten Gene gemessen werden (siehe Abbildung 3.1 und 3.2). Da vorherige Untersuchungen in der Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass eine Expression von ≥ 50 mRNA-Kopien ausreichend ist für eine shRNA-vermittelte Gensuppression wurden alle 13 Gene in den weiteren Depletionsversuchen untersucht.

Abbildung 3.1 Untersuchung des Expressionsniveaus ausgewählter Gene im Bereich 6q12-q14 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP und der Prostataepithelzelllinie BPH-1 mittels TaqMan®-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mit Hilfe der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt.

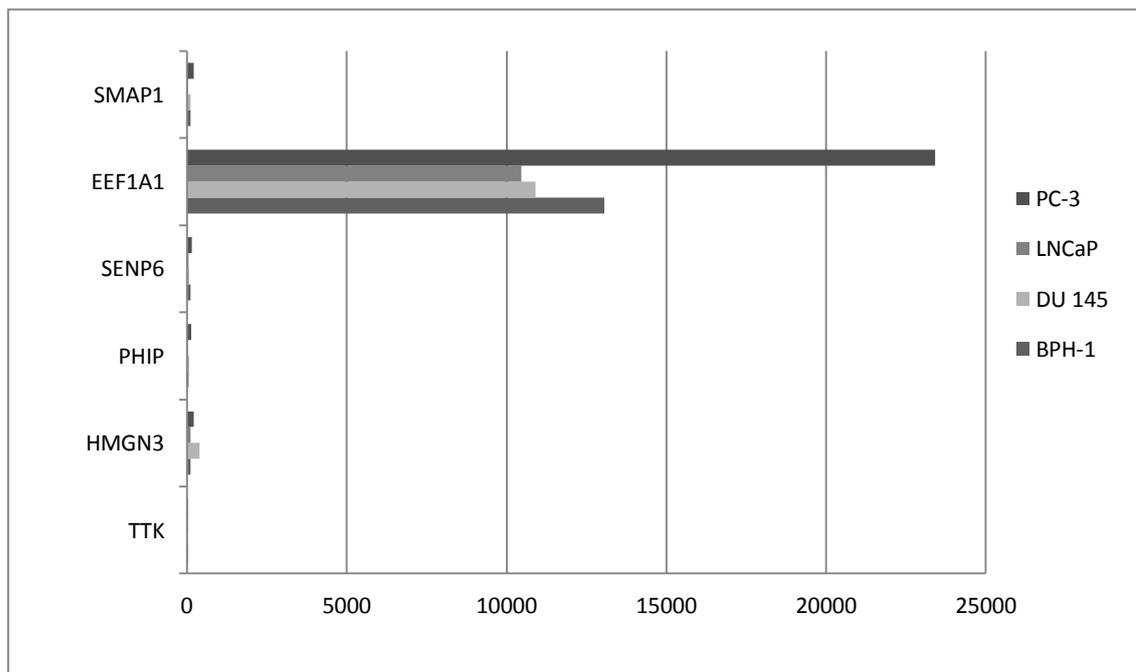
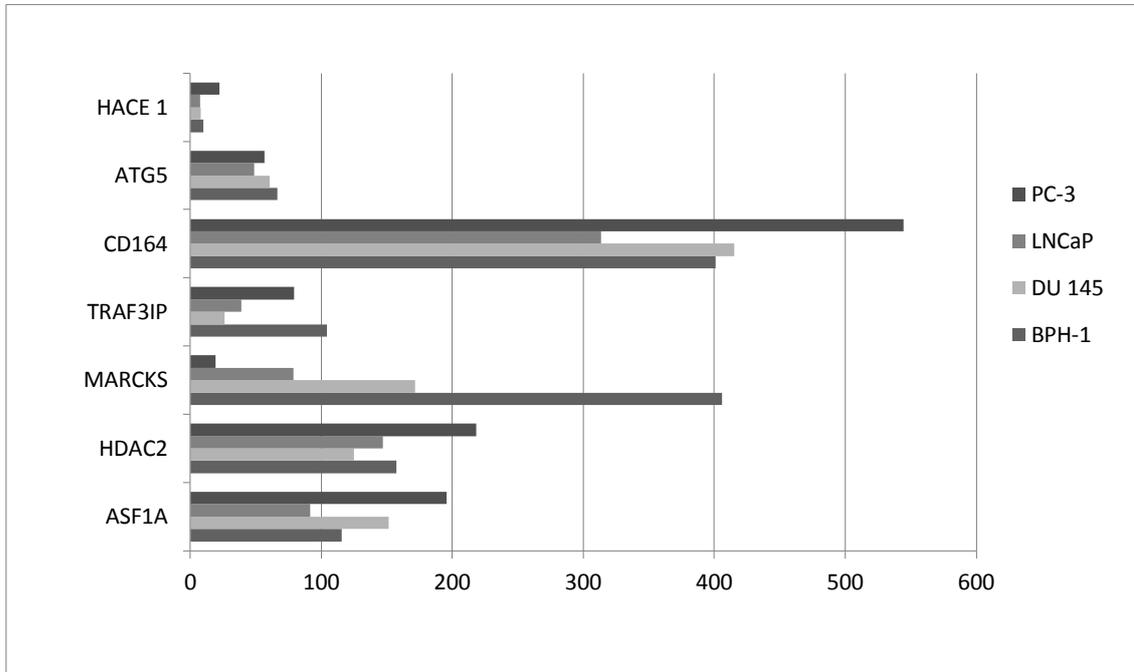


Abbildung 3.2 Untersuchung des Expressionsniveaus ausgewählter Gene im Bereich 6q16-q22 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP und der Prostataepithelzelllinie BPH-1 mittels TaqMan®-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mit Hilfe der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt.



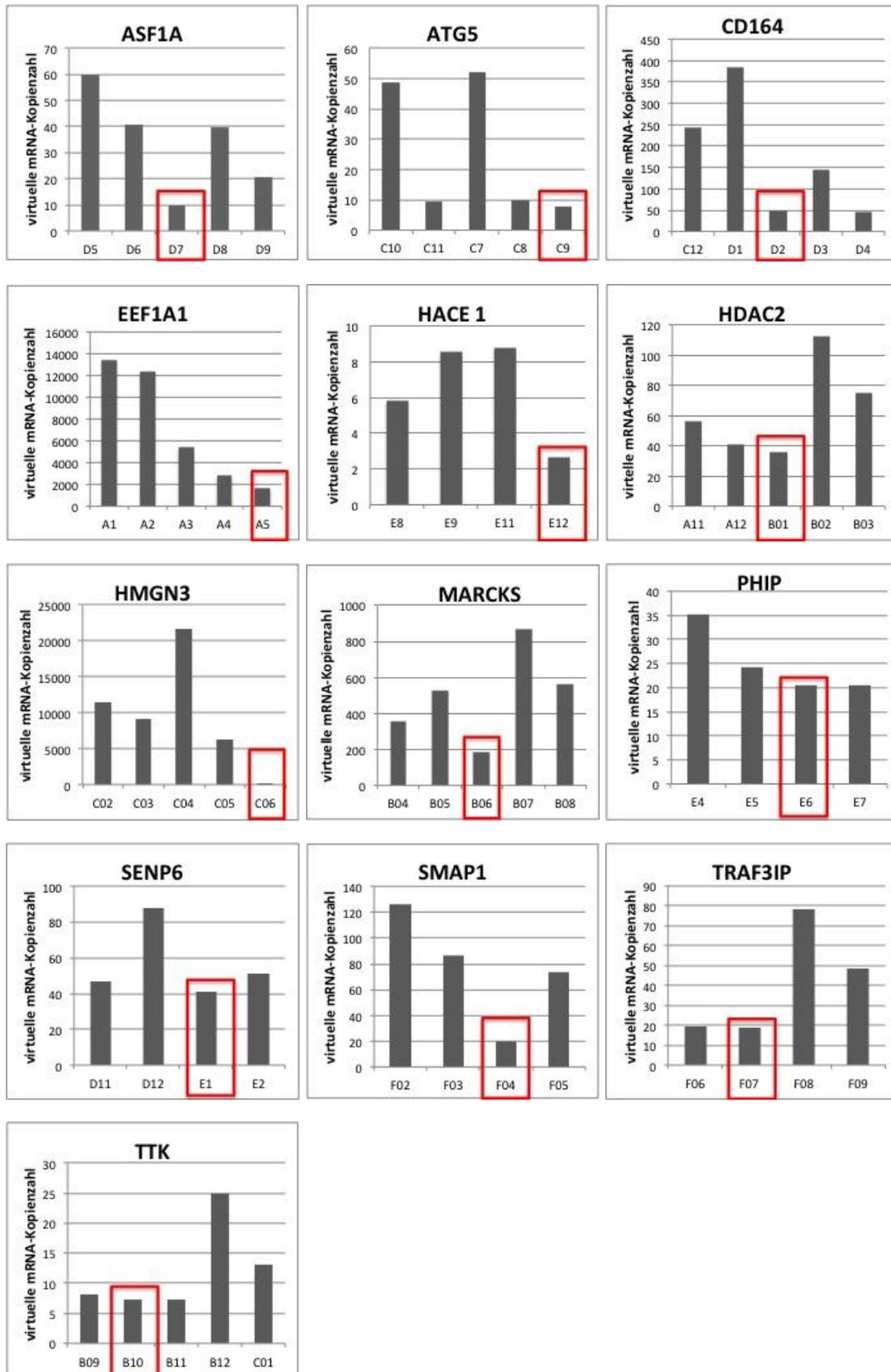
3.2 Auswahl der optimalen shRNA-Konstrukte für die Depletionsexperimente

Um die Auswirkungen einer Suppression der ausgewählten Gene auf das Wachstum von Prostatatumorzellen und Prostataepithelzellen zu untersuchen, wurden shRNA-vermittelte Depletionsversuche durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 5 kommerzielle shRNA-Konstrukte pro Gen (siehe Punkt 3.1) auf ihren Depletionseffekt getestet. Da alle ausgewählten Gene in der Zelllinie BPH-1 exprimiert waren, wurde diese Analyse mit den BPH-1 Zellen durchgeführt. Die Analyse war in folgende Schritte gegliedert:

1. Synthese eines lentiviralen Vektors für die shRNA-Konstrukte
2. Transduktion der shRNA-Konstrukte mit Hilfe des lentiviralen Vektors in die BPH-1 Zellen
3. Inkubation der transduzierten BPH-1 Zellen unter Puromycin-Selektion (circa 14 Tage)
4. RNA-Isolierung aus den transduzierten BPH-1 Zellen und cDNA-Synthese
5. Bestimmung der mRNA-Expression mittels TaqMan®-PCR

Bei 8 der untersuchten Gene konnte die Depletionseffizienz für alle 5 kommerziell erhältlichen shRNA-Konstrukte mittels TaqMan®-PCR bestimmt werden. Für die Gene *HACE1*, *PHIP*, *SENP6*, *SMAP1* und *TRAF3IP2* konnten nur 4 der 5 kommerziellen shRNA-Konstrukte auf ihre Depletionseffizienz hin getestet werden. Grund dafür war, dass nach Transduktion des fünften shRNA-Konstruktes und anschließender Puromycin-Selektion die Zellmenge nicht ausreichte für eine erfolgreiche RNA-Isolation. Zur Durchführung der Depletionsversuche wurde pro Gen das shRNA-Konstrukt ausgewählt, welches den stärksten suppressiven Effekt auf die mRNA-Expression zeigte (siehe Abbildung 3.3, roter Kasten)

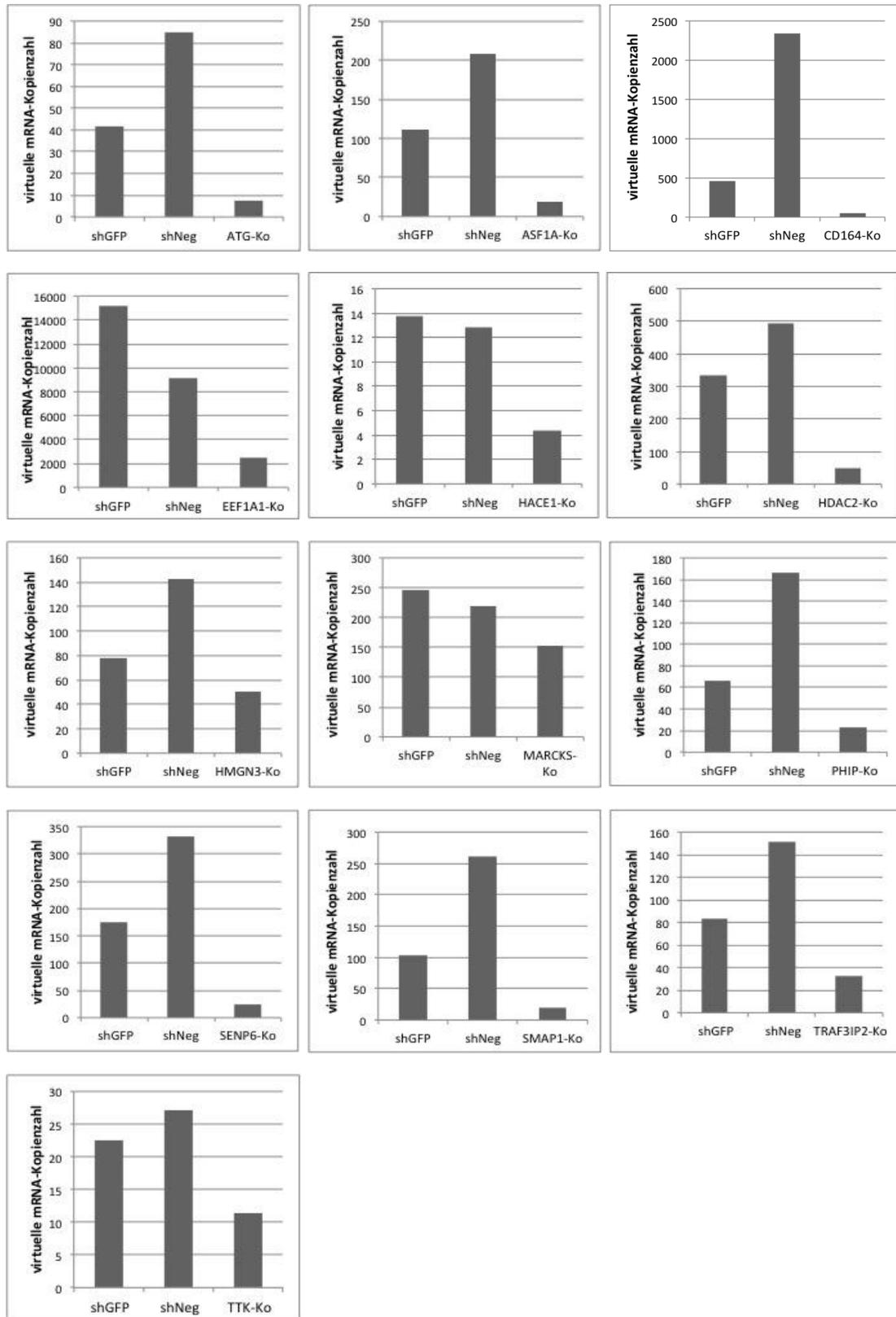
Abbildung 3.3. Untersuchung der Depletionseffizienz von 5 kommerziell erhältlichen shRNA-Konstrukten pro Gen mittels lentiviraler Vektor-Transduktion und TaqMan®-PCR in der Zelllinie BPH-1. Der rote Kasten markiert das shRNA-Konstrukt mit der höchsten Depletionseffizienz.



3.3 Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die Genexpression (shRNA-Konstruktvalidierung)

Die shRNA-Konstruktvalidierung wurde durchgeführt, um Effekte der lentiviralen Transduktion auf die Genexpression der untersuchten Gene auszuschließen. Für die shRNA-Konstruktvalidierung wurden BPH-1 Zellen mit dem für das jeweilige Kandidatengen optimalen shRNA-Konstrukt lentiviral transduziert. Zusätzlich dazu wurden in einem weiteren Ansatz die Negativkontrollen *shGFP* und *shNeg* mittels Transduktion in die BPH-1 Zellen eingeschleust. Beide Negativkontrollen enthalten eine shRNA die zu einer nicht humanen mRNA komplementär ist. *shGFP* ist gegen das grün fluoreszierende Protein (*GFP*) und *shNeg* gegen die bakterielle Polymerase I gerichtet. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu den unter Punkt 3.2 beschriebenen Analysen. Für alle untersuchten Gene konnte eine signifikante Reduktion der Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Negativkontrollen gemessen werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle *shGFP* konnte die höchste Depletionseffizienz für *EFF1A1* (74 % , $p=0,0076$) und die niedrigste Depletionseffizienz für *HMGN3* (36 % , $p=0,0002$) ermittelt werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle *shNeg* konnte die höchste Depletionseffizienz für *CD164* (98 % , $p=0,0002$) und die niedrigste Depletionseffizienz für *MARCKS* (30 % , $p=0,0786$) errechnet werden (siehe Abbildung 3.4).

Abbildung 3.4 shRNA-Konstruktvalidierung in der lentiviral transduzierten Prostataepithelzelllinie BPH-1. Als Negativkontrollen dienten ein *shGFP*- und *shNeg*-Konstrukt. Die Expression auf mRNA-Ebene wurde mittels TaqMan®-PCR bestimmt. Zur Darstellung der Daten wurde die virtuelle mRNA-Kopiezahl mit Hilfe der Standardkurvenmethode errechnet und gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien gesetzt.



3.4 Bestimmung der depletionsbedingten Wachstumseinflüsse mittels Colony-Formation Assay

Zur Identifizierung potentiell tumorsuppressiver Gene innerhalb der 6q12-q22 Deletion, deren erniedrigte Expression zu einem gesteigertem Zellwachstum führen sollte, wurde der Einfluss der shRNA-vermittelten Reduktion der Expression auf das Zellwachstum in der Prostataepithelzelllinie BPH-1 und der Prostatakarzinomzelllinie DU 145 in einem Colony-Formation Assay getestet. Als Negativkontrollen wurden zwei shRNA-Konstrukte (*shGFP* und *shNeg*) verwendet, zu denen keine komplementäre humane mRNA vorhanden ist. Als Positivkontrollen wurden gegen das bekannte Tumorsuppressorgen *RB1* und das essentielle Tumorsuppressorgen *PTEN* gerichtet shRNA-Konstrukte verwendet. Sowohl die Positivkontrollen als auch die Negativkontrollen waren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Zur Bestimmung der depletionsbedingten Zellwachstumsunterschiede wurden makroskopisch alle Zellkolonien ab einem Durchmesser von 1 mm gezählt. Depletionsbedingte signifikante Unterschiede im Zellwachstum im Vergleich zu den Negativkontrollen wurden anschließend mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse bestimmt. Mit Hilfe des Colony-Formation-Assay-Screenings konnten zwei potentiell tumorsuppressive Gene identifiziert werden. Die shRNA-vermittelte Depletion der Expression von *HMGN3* und *SMAP1* führten in beiden Zelllinien zu einem stark erhöhten Zellwachstum im Vergleich zu den Negativkontrollen *shGFP* und *shNeg* ($p \leq 0,04$). Diese Effekte waren außerdem vergleichbar mit den depletionsbedingten Einflüssen auf das Zellwachstum in der Positivkontrolle *RB1*. Da die Wachstumsverstärkende Wirkung in beiden Zelllinien sichtbar war, kann ein Zelllinien spezifischer Effekt ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.5 bis 3.8).

Abbildung 3.5 Colony-Formation-Assay Screening im Doppelansatz in der mittels Lipofektamin®2000 transient transfizierten Prostataepithelzelllinie BPH-1. Abgebildet sind die Zellkolonien pro Well nach einer Giemsa-Färbung.

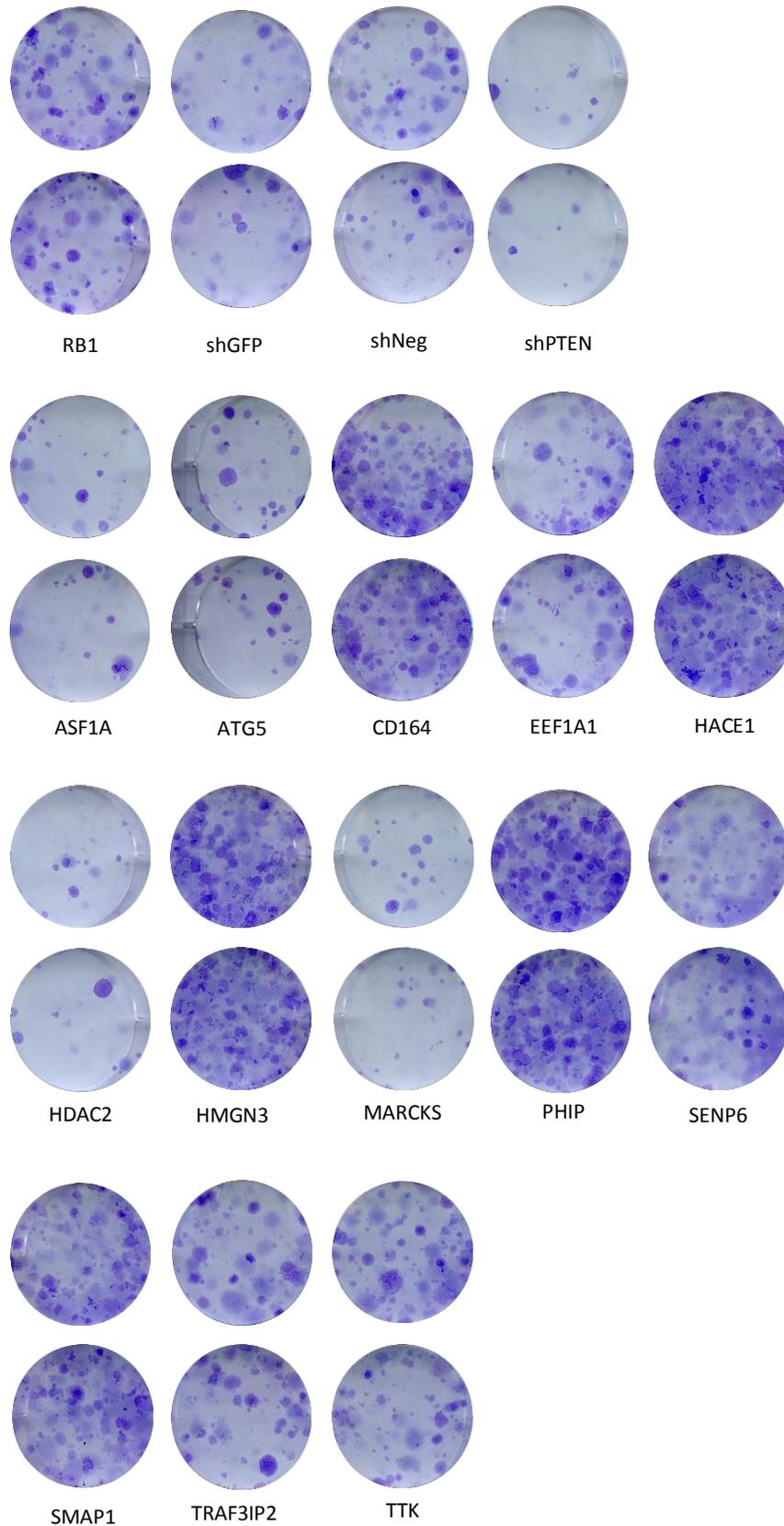


Abbildung 3.6 Colony-Formation Assay Screening im Doppelansatz in der mittels Lipofektamin®2000 transient transfizierten Prostatazelllinie BPH-1. Gezählt wurden makroskopisch alle Kolonien ab einem Durchmesser von 1 mm. Unterschiede im Koloniewachstum wurden mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse gegen die Kontrollen a) *shGFP* und b) *shNeg* ermittelt. Die Darstellung erfolgte als Boxplot. Potentiell tumorsuppressive Gene sind mit einem roten Kasten markiert.

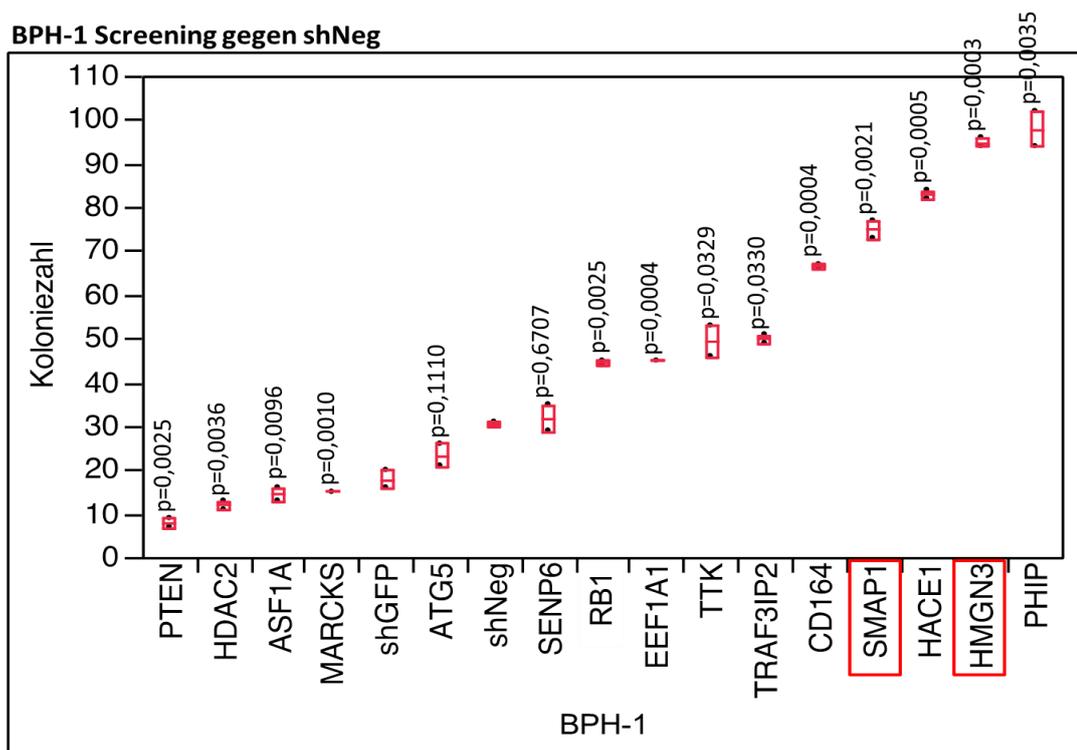
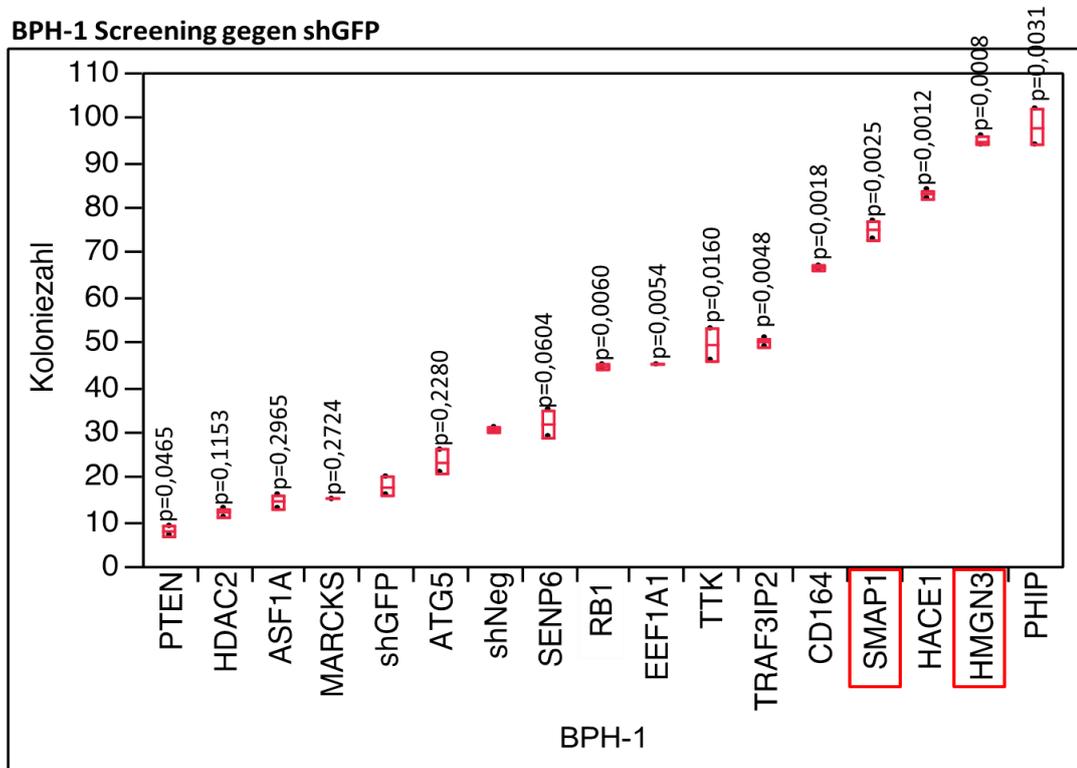


Abbildung 3.7 Colony-formation Assay Screening im Doppelansatz in der mittels Lipofekta-min@2000 transient transfizierten Prostatakarzinomzelllinie DU 145. Abgebildet sind die Zellkolonien pro Well nach einer Giemsa-Färbung.

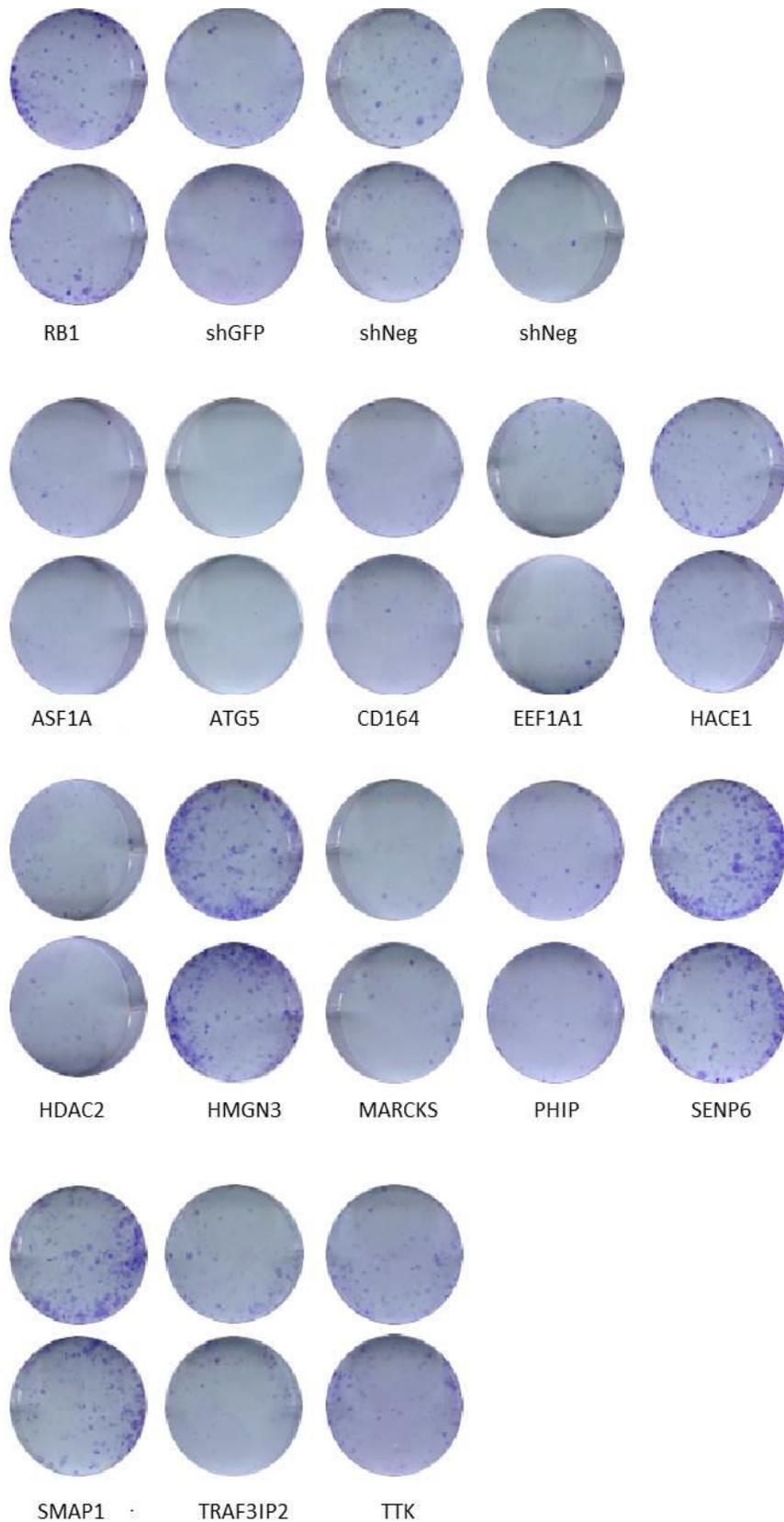
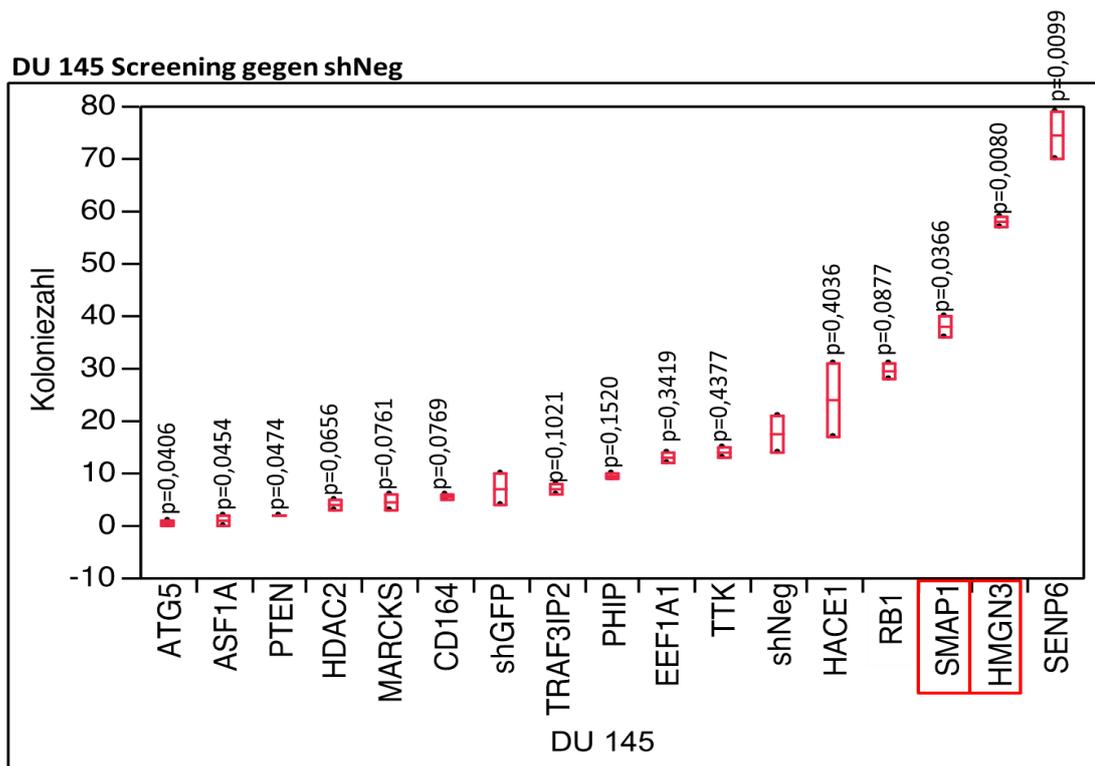
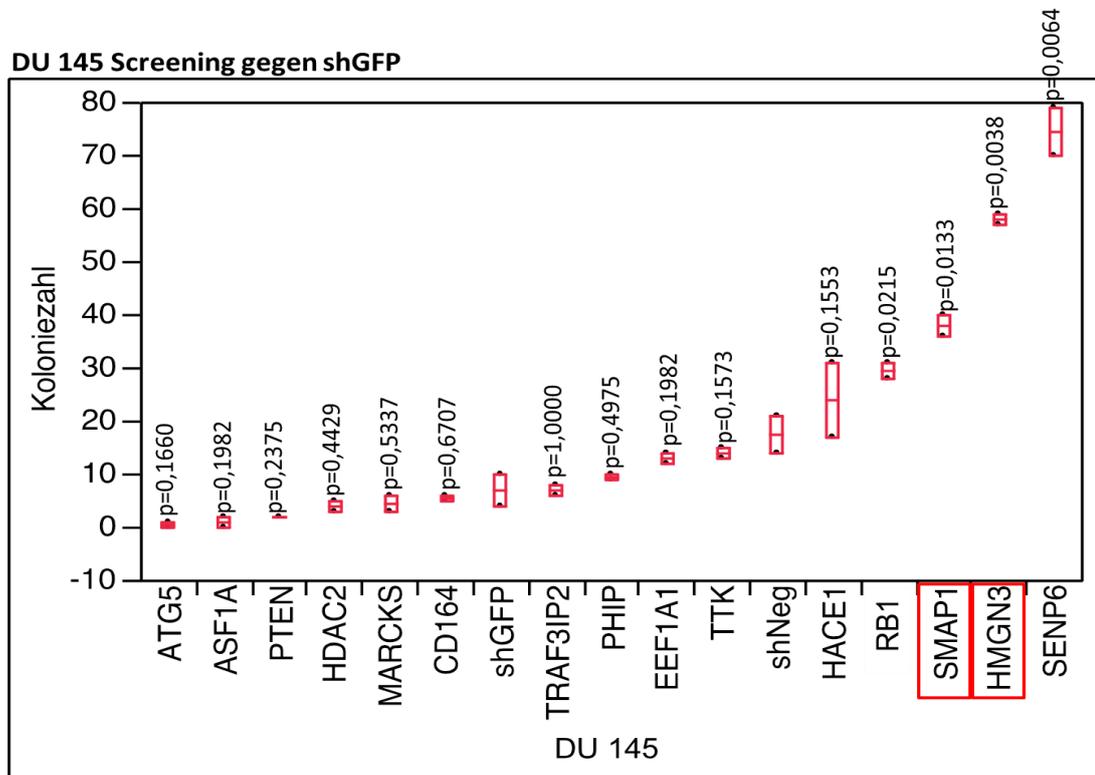


Abbildung 3.8 Colony-Formation Assay Screening im Doppelansatz in der mittels Lipofektamin®2000 transient transfizierten Prostatazelllinie DU 145. Gezählt wurden makroskopisch alle Kolonien ab einem Durchmesser von 1 mm. Unterschiede im Koloniewachstum wurden mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse gegen die Kontrollen a) *shGFP* und b) *shNeg* ermittelt. Die Darstellung erfolgte als Boxplot. Potentiell tumorsuppressive Gene sind mit einem roten Kasten markiert.



3.5 Validierung der potentiellen Zielgene der 6q-Deletion

Zur Validierung der unter Punkt 3.4 identifizierten potentiellen Tumorsuppressorgene *HMGN3* und *SMAP1* wurde ein weiterer Colony-Formation-Assay in den Zelllinien DU 145 und BPH-1 durchgeführt. Des Weiteren wurde die shRNA-vermittelte Suppression der beiden Gene im Vergleich zu den Negativkontrollen *shNeg* und *shGFP* auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen.

3.5.1 Colony-Formation Assay

Zur Validierung der im Colony-Formation Assay-Screening identifizierten putativen Zielgene der 6q-Deletion wurde ein zusätzlicher Colony-Formation Assay im vierfach-Ansatz durchgeführt. Für diese Versuche wurden nochmals die Ziellinien DU 145 und BPH-1 mittels Lipofectamin®2000 mit einer shRNA, die gegen das jeweilige Zielgen (*HMGN3* und *SMAP1*) gerichtet war, transfeziert. Als Negativkontrollen wurden *shGFP* und *shNeg* und als Positivkontrollen *shRB1* und *shPTEN* verwendet. Die Suppressions-vermittelten Unterschiede im Zellwachstum wurden sowohl für die potentiellen Zielgene der 6q-Deletion als auch für die Positivkontrollen im Vergleich zu beiden Negativkontrollen mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse ermittelt. In beiden Assays konnten die Ergebnisse des ersten Colony-Formation Assays bestätigt werden. In der benignen Prostatazelllinie BPH-1 führte die Suppression von *HMGN3*, *SMAP1* und *RB1* zu einer signifikanten Steigerung des Zellkoloniewachstums im Vergleich zu den Negativkontrollen *shGFP* und *shNeg* ($p \leq 0,005$, siehe Abbildung 3.9). In der malignen Zelllinie DU 145 führte die Suppression von *HMGN3*, *SMAP1* und *RB1* ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung des Zellkoloniewachstums im Vergleich zur Negativkontrolle *shGFP* ($p \leq 0,006$). Der Vergleich mit der Negativkontrolle *shNeg* zeigte eine signifikante Verminderung des Zellwachstums bedingt durch die Suppression der beiden potentiellen Tumorsuppressorgene ($p \leq 0,0005$). Allerdings zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Zellkoloniezahl zwischen den beiden Negativkontrollen *shGFP* und *shNeg* ($p < 0,0001$). Dies ist vermutlich zurückzuführen auf einen starken Unterschied in der Transfektionseffizienz und damit einer höheren Ausgangszellzahl in der Negativkontrolle *shNeg*. Aus diesem Grund wurde der Vergleich mit der Negativkontrolle *shNeg* nicht bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt. Insgesamt konnten mit Hilfe des zusätzlichen Colony-Formation Assays die Gene *HMGN3* und *SMAP1* als potentielle Tumorsuppressorgene der großen 6q-Deletion validiert werden.

Abbildung 3.9 Colony-Formation Assay Validierung im Vierfachansatz in der mittels Lipofektamin®2000 transient transfizierten Prostatazelllinie BPH-1. Gezählt wurden makroskopisch alle Kolonien ab einem Durchmesser von 1 mm. Unterschiede im Koloniewachstum wurden mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse gegen die Kontrollen a) *shNeg* und b) *shGFP* ermittelt. Die Darstellung erfolgte als Boxplot. Zwischen den Boxplots ist exemplarisch jeweils ein Well der untersuchten Proben dargestellt.

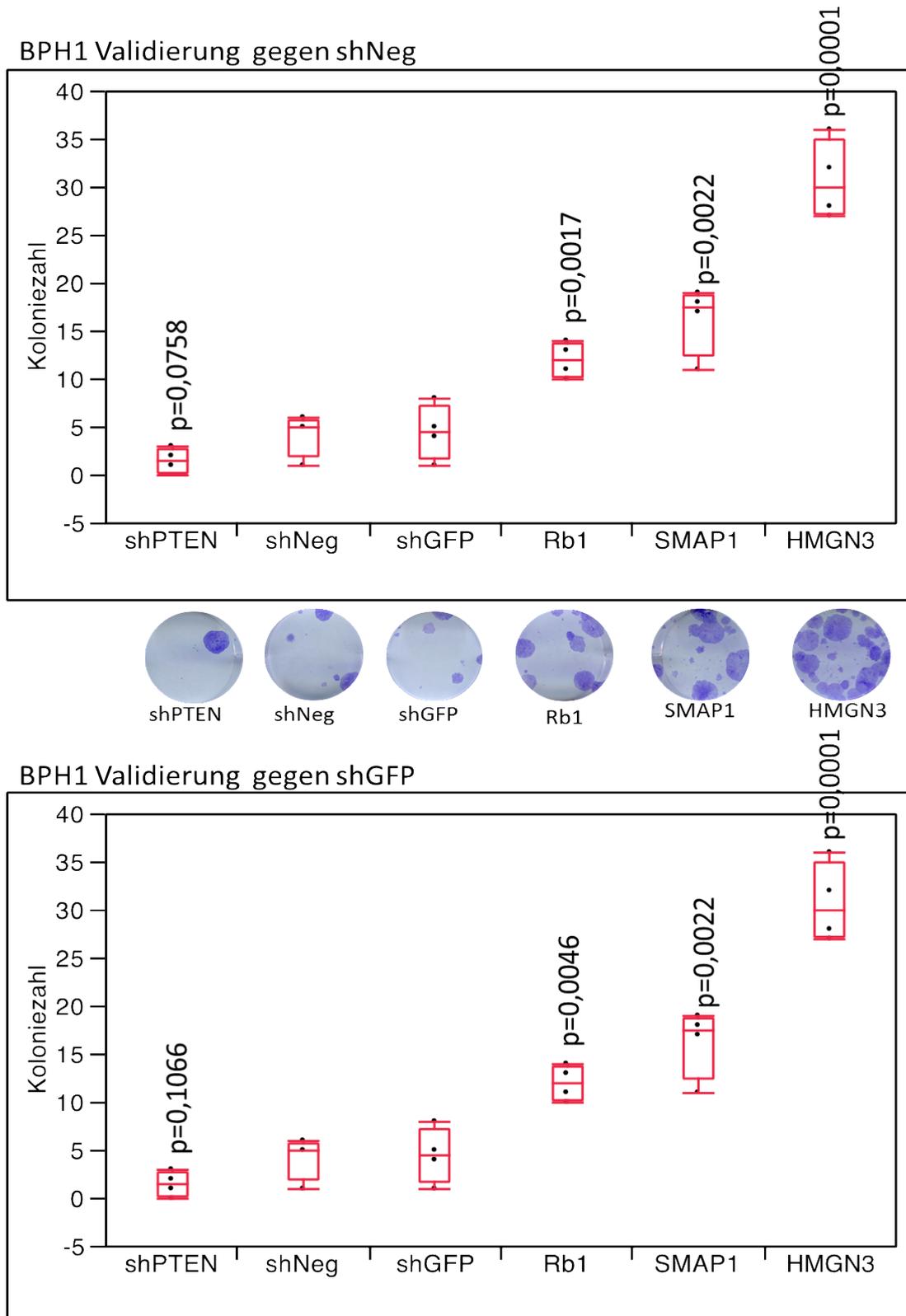
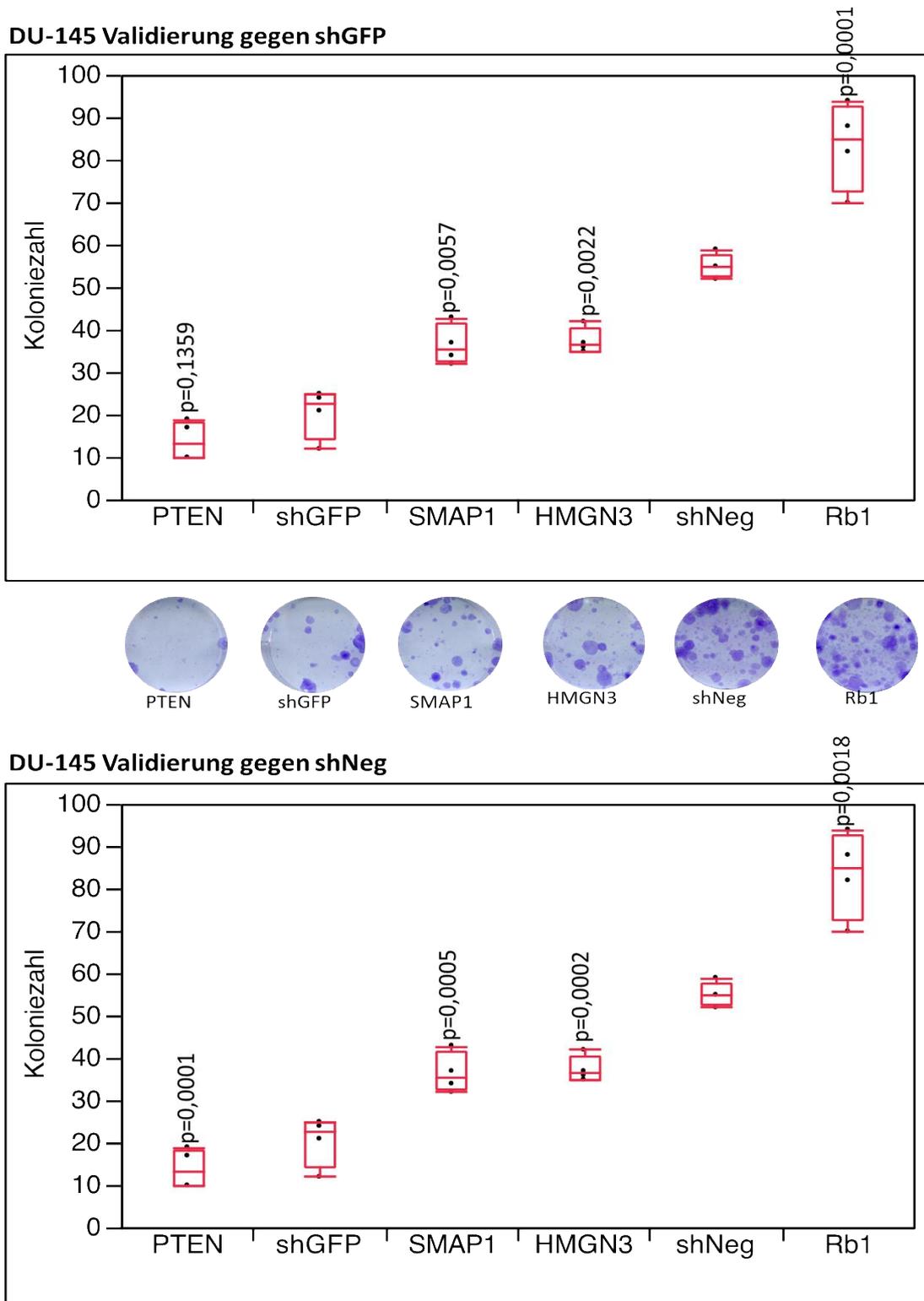


Abbildung 3.10 Colony-Formation Assay Validierung im Vierfachansatz in der mittels Lipofektamin®2000 transient transfizierten Prostatazelllinie DU 145. Gezählt wurden makroskopisch alle Kolonien ab einem Durchmesser von 1 mm. Unterschiede im Koloniewachstum wurden mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse gegen die Kontrollen a) *shNeg* und b) *shGFP* ermittelt. Die Darstellung erfolgte als Boxplot. Zwischen den Boxplots ist exemplarisch jeweils ein Well der untersuchten Proben dargestellt.



3.5.2 Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion auf mRNA-Ebene in den transduzierten Zelllinien BPH-1 und DU 145

Der Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion der beiden potentiellen Zielgene *HMGN3* und *SMAP1* in den lentiviral transduzierten Zelllinien BPH-1 und DU 145 wurde durchgeführt um 1. Einen Effekt des lentiviralen Transduktions-Prozesses auf die mRNA-Expression auszuschließen und 2. Zur Kontrolle der erfolgreichen stabilen Depletion der mRNA-Expression vor der Verwendung der beiden transduzierten Zelllinien im Invasion-Assay (siehe Punkt 3.6). Die Durchführung der Experimente in beiden Zelllinien erfolgte wie bereits unter Punkt 3.2 beschrieben. Die Depletionseffizienz der Expression der beiden Gene *HMGN3* und *SMAP1* wurde im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen *shGFP* und *shNeg* bestimmt. Beide Negativkontrollen sind gegen nicht-humane mRNAs gerichtet und sind daher geeignet, einen möglichen Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die mRNA-Expression zu ermitteln. Für die beiden Gene *HMGN3* und *SMAP1* konnte in beiden untersuchten Zelllinien eine signifikante Suppression im Vergleich zu beiden Negativkontrollen gemessen werden. Die Depletionseffizienz wurde ermittelt durch den Vergleich der mit Hilfe der Standardkurvenmethode ermittelten virtuellen mRNA-Kopiezahl der beiden Gene in den verschiedenen Proben (siehe Abbildung 3.11 und 3.12).

In der Zelllinie BPH-1 wurde folgende Depletionseffizienz erzielt:

- *HMGN3*: circa 1,9-fache Suppression im Vergleich zur Kontrolle *shGFP* und circa 2,3-fache Suppression im Vergleich zur Kontrolle *shNeg* ($p < 0,0001$ für Beide)
- *SMAP1*: circa 3,7-fache Suppression im Vergleich zur Kontrolle *shGFP* und circa 5,8-fache Suppression im Vergleich zur Kontrolle *shNeg* ($p < 0,0001$ für Beide)

In der Zelllinie DU 145 wurde folgende Depletionseffizienz erzielt:

- *HMGN3*: circa 1,8-fache Suppression im Vergleich zur Kontrolle *shGFP* und circa 3,4-fache Suppression im Vergleich zur Kontrolle *shNeg* ($p < 0,0001$ für Beide)
- *SMAP1*: circa 3,4-fache Suppression im Vergleich zur Kontrolle *shGFP* und circa 4,9-fache Suppression im Vergleich zur Kontrolle *shNeg* ($p < 0,0001$ für Beide)

Abbildung 3.11 Nachweis der Depletionseffizienz auf mRNA-Ebene in der lentiviral transduzierten Zelllinie BPH-1 für die potentiellen tumorsuppressiven Zielgene *HMGN3* und *SMAP1*. Als Negativkontrollen dienten *shGFP* und *shNeg*. Die Expression wurde mittels TaqMan®-PCR ermittelt und die virtuelle mRNA Kopiezahl anhand der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien errechnet

BPH-1

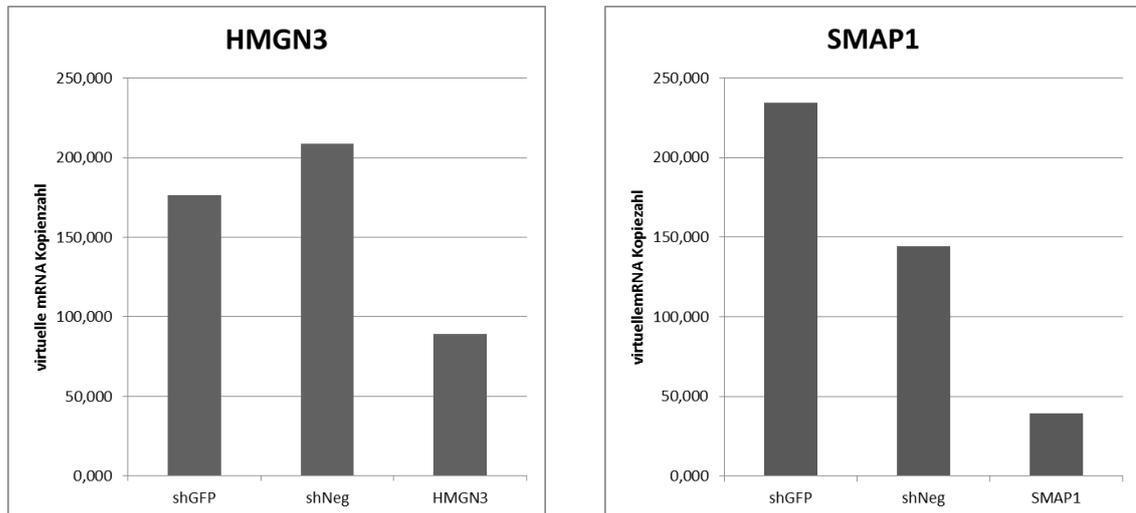
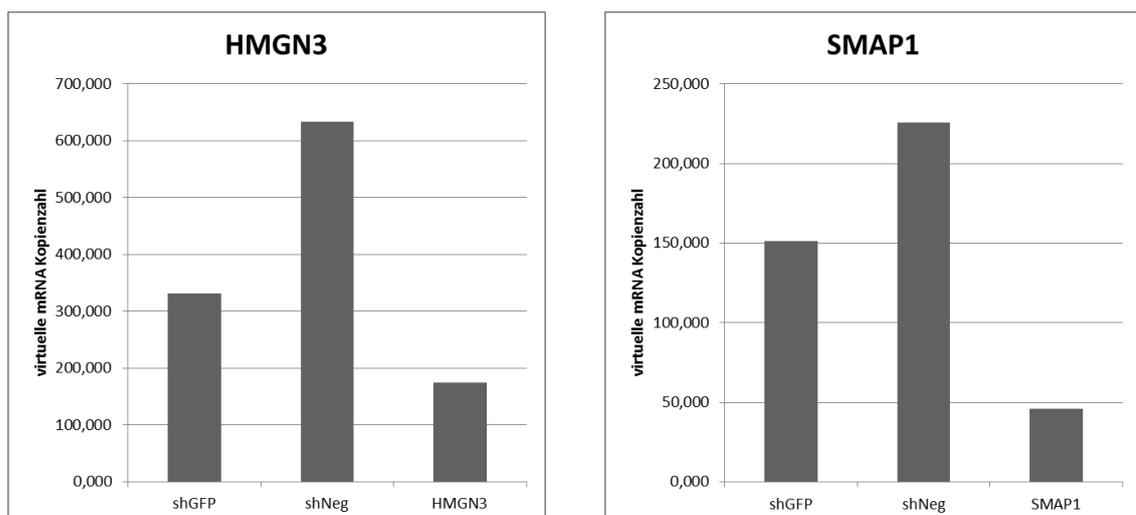


Abbildung 3.12 Nachweis der Depletionseffizienz auf mRNA-Ebene in der lentiviral transduzierten Zelllinie DU 145 für die potentiellen tumorsuppressiven Zielgene *HMGN3* und *SMAP1*. Als Negativkontrollen dienten *shGFP* und *shNeg*. Die Expression wurde mittels TaqMan®-PCR ermittelt und die virtuelle mRNA Kopiezahl anhand der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien errechnet

DU 145



3.5.3 Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion auf Protein-Ebene in den transduzierten Zelllinien BPH-1 und DU 145

Der Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion der Gene *HMGN3* und *SMAP1* auf Protein-Ebene in den lentiviral transduzierten Zelllinien BPH-1 und DU 145 wurde durchgeführt um 1. Einen Effekt des lentiviralen Transduktions-Prozesses auf die Protein-Expression auszuschließen und 2. Zur Kontrolle der erfolgreichen stabilen Depletion der Protein-Expression vor der Verwendung der beiden transduzierten Zelllinien im Invasion-Assay (siehe Punkt 3.6). Die Durchführung der Experimente in beiden Zelllinien erfolgte wie bereits unter Punkt 2.16 bis 2.18 beschrieben. Die Depletionseffizienz der Expression der beiden Gene *HMGN3* und *SMAP1* wurde im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen *shGFP* und *shNeg* bestimmt. Beide Negativkontrollen sind gegen nicht-humane mRNAs gerichtet und sind daher geeignet einen möglichen Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die Protein-Expression zu ermitteln. Zur Ermittlung der jeweiligen Proteinbande wurde ein Größenmarker verwendet. Zusätzlich wurden eventuelle Schwankungen in der Proteinauftragsmenge mittels der Detektion des Referenzproteins Tubulin überprüft. Für die beiden Gene *HMGN3* und *SMAP1* konnte in beiden untersuchten Zelllinien eine deutliche Suppression im Vergleich zu beiden Negativkontrollen gemessen werden (siehe Abbildung 3.13 und 3.14). In der Zelllinie BPH-1 konnte das *HMGN3* Protein in der suppremierten Probe bei einer Größe von 20 kD nicht mehr nachgewiesen werden und das *SMAP1* Protein zeigte in der depletierten Probe eine sehr schwache Bande im Bereich von 50 kD. Beide Proteine waren allerdings auch nicht in der BPH-1 Wildtyp-Probe (Wt) nachweisbar. Dies kann durch eine zu geringe Proteinkonzentration in dieser Probe erklärt werden, da auch das Referenzprotein Tubulin in dieser Probe nur eine schwache Bande im Bereich von 50 kD zeigte. In der Zelllinie DU 145 war der Effekt der shRNA-vermittelten Depletion auf die Protein *HMGN3* und *SMAP1* wesentlich geringer. In beiden suppremierten Proben konnte eine deutliche Proteinbande für *HMGN3* bzw. *SMAP1* nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Negativkontrollen *shGFP* und *shNeg* und unter Berücksichtigung des Referenzprotein Tubulin war jedoch eine deutliche Reduzierung der Proteinbanden für beide Proteine erkennbar.

Abbildung 3.13 Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion auf Protein-Ebene in der lentiviral transduzierten Zelllinie BPH-1 für die potentiellen tumorsuppressiven Zielgene *HMGN3* und *SMAP1*. Als Negativkontrollen dienten *shGFP* und *shNeg*. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot semiquantifiziert. Als Referenzprotein diente Tubulin.

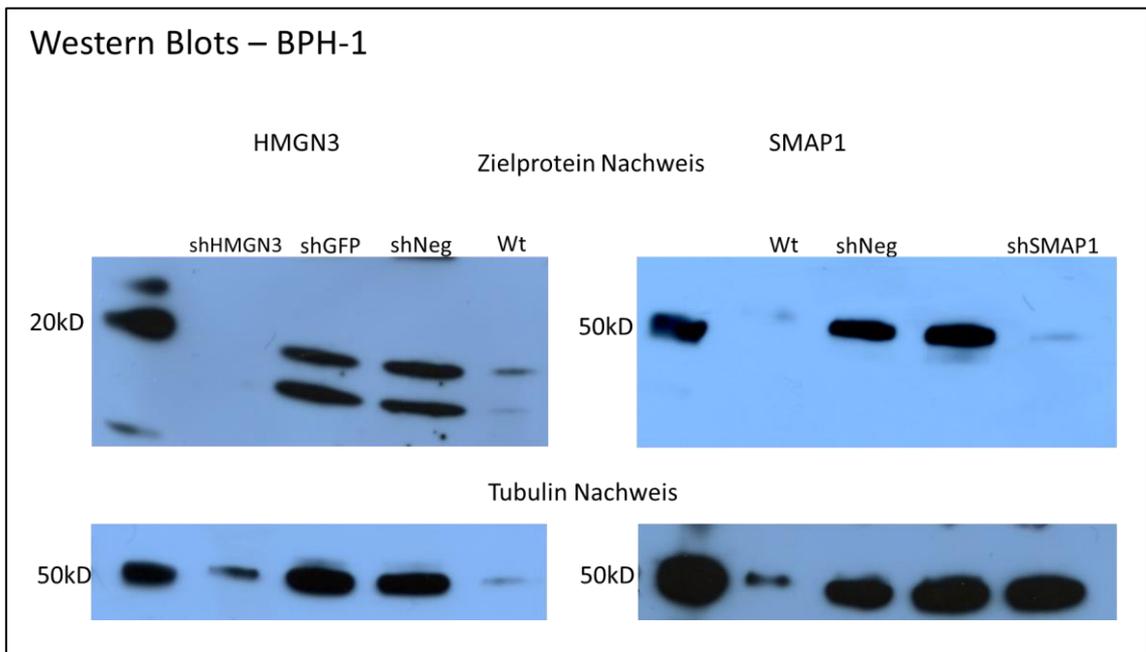
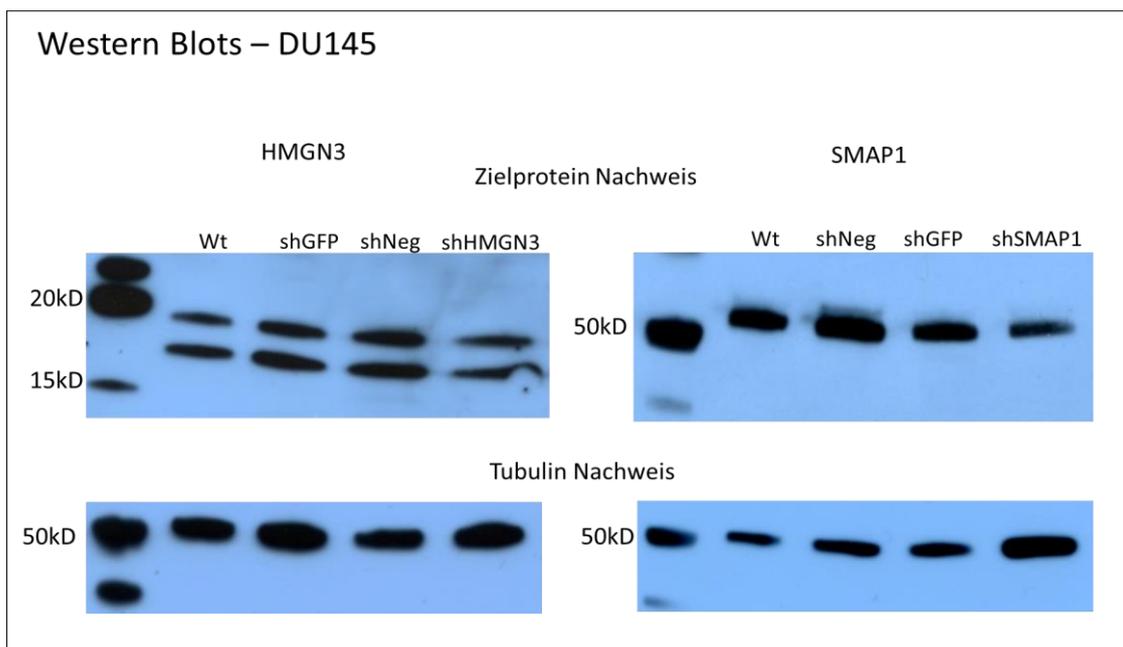


Abbildung 3.14 Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion auf Protein-Ebene in der lentiviral transduzierten Zelllinie DU 145 für die potentiellen tumorsuppressiven Zielgene *HMGN3* und *SMAP1*. Als Negativkontrollen dienten *shGFP* und *shNeg*. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot semiquantifiziert. Als Referenzprotein diente Tubulin.



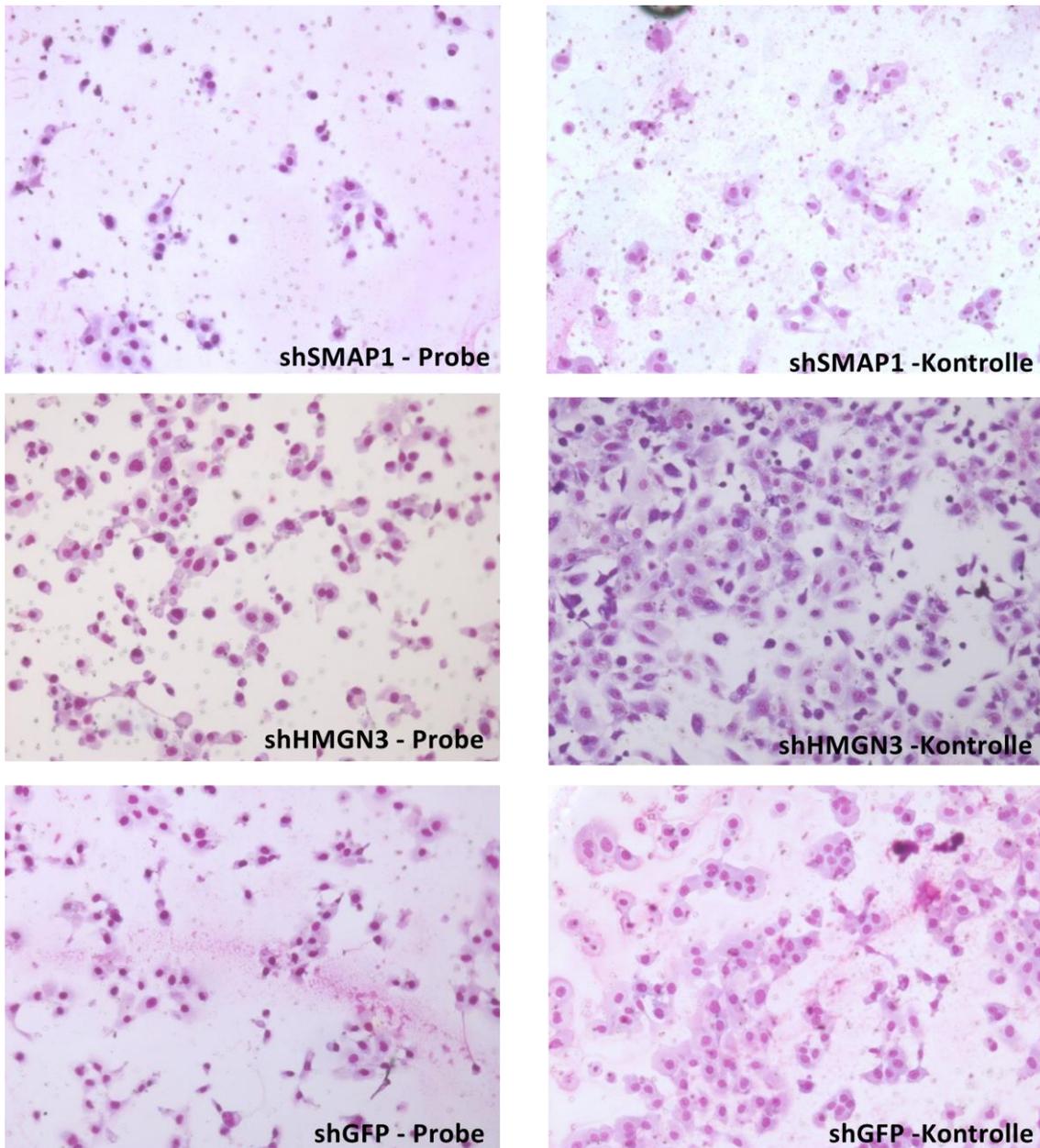
3.6 Auswirkungen der *HMGN3*- und *SMAP1*-Suppression auf das invasive Zellwachstum

Um die Auswirkungen der *HMGN3*- und *SMAP1*-Suppression auf das invasive Zellwachstum zu testen, wurde die Wachstumsfähigkeit der depletierten Zellen in einem Invasion Assay getestet. Für diese Experimente wurden die lentiviral transduzierten Zelllinien BPH-1 und DU 145 verwendet. Als Negativkontrolle diente *shGFP*. Die Durchführung des Invasion Assay ist unter Punkt 2.22 detailliert beschrieben. Im Anschluss an den Invasion Assay wurde die Invasionsrate und der Invasion Index berechnet. Ein Invasion Index von 1 wurde als normaler Grenzwert angenommen. In der Zelllinie DU 145 führte die Suppression beider Gene zu einer leichten Erhöhung des Invasion Index mit 1,48 für *SMAP1* und 1,43 für *HMGN3* (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.15). In der benignen Zelllinie BPH-1 waren im Anschluss an den Invasion Index keine Zellen mehr sichtbar. Dies bedeutet, dass die Suppression der Gene *HMGN3* und *SMAP1* nicht zu der Entstehung eines invasiven Zellwachstums führt.

Tabelle 3.1. Auswirkungen der shRNA-vermittelten Suppression der Gene *HMGN3* und *SMAP1* auf das invasive Zellwachstum der Zelllinie DU 145. Der Einfluss auf das invasive Zellwachstum wurde anhand der Invasionsrate und des Invasion Index bestimmt. Invasionsrate: mittlere Zellzahl der Probe / mittlere Zellzahl der Kontrolle. Invasion Index: Invasionsrate der Probe / Invasionsrate der Kontrolle. Als Kontrolle wurde *shGFP* verwendet.

Probe	Probe 1.Ansatz	Probe 2.Ansatz	Mittelwert	Kontrolle 1.Ansatz	Kontrolle 2.Ansatz	Mittelwert	Invasionsrate (%)	Invasion Index
shSMAP1	n.a	22	29,50	64	55	52,63	56	1,48
	n.a	25		51	54			
	49	24		46	53			
	44	13		52	46			
shHMGN3	202	68	129,38	263	244	239,25	54	1,43
	126	100		226	234			
	101	127		240	208			
	202	109		236	263			
17 (Kontrolle)	36	120	64,25	177	154	169,88	38	
	63	70		182	134			
	53	27		200	124			
	77	68		213	175			

Abbildung 3.15 Exemplarische Darstellung der Auswirkungen der shRNA-vermittelten Suppression der Gene *HMGN3* und *SMAP1* auf das invasive Zellwachstum der Zelllinie DU 145. Als Kontrolle wurde *shGFP* verwendet. Links: invasiv wachsende Zellen im Anschluss an den Invasion Assay. Rechts: invasiv und nicht-invasiv wachsende Zelle im Anschluss an das Passagieren durch die Kontrollmembran.



4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von potentiell tumorrelevanten Genen außerhalb der minimal deletierten 6q15 Region der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom. Dazu wurden 13 Gene in den Regionen 6q12-q14 und 6q16-q22 randomisiert ausgewählt und die Auswirkungen der reduzierten Expression dieser Gene auf das Wachstumsverhalten in einem Prostata-Zelllinienmodell getestet.

Ein charakteristisches Merkmal klassischer Tumorsuppressorgene ist der hemmende Effekt auf das Zellwachstum [42, 43]. Aus diesem Grund ist die Untersuchung von wachstumsrelevanten Effekten einer Suppression von Genen im Zelllinienmodell ein häufig verwendetes Verfahren zur ersten Identifizierung von potentiell tumorsuppressiven Genen. Die reduzierte Expression eines klassischen Tumorsuppressorgenes sollte dabei erwartungsgemäß in einer deutlichen Steigerung des Zellwachstums resultieren. Es ist jedoch zu beachten, dass auch sogenannte für das Zellwachstum „essentielle“ Tumorsuppressorgene bekannt sind, deren übermäßige Herabregulierung zu einem Suppressions-bedingten Tod der Zellen führt [42, 43]. Zur Unterscheidung dieser beiden Gruppen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Positivkontrollen verwendet: 1. Das klassische Tumorsuppressorgen *RB1*, dessen mono- und biallelische Inaktivierung zu einer Steigerung des Zellwachstums führt [18-20, 43, 44] und 2. Das „essentielle“ Tumorsuppressorgen *PTEN*, dessen Suppression in Abhängigkeit vom Grad der Herabregulierung in der indirekten Induktion von apoptotischen Signalkaskaden resultiert [18-20, 43, 45, 46].

Zur Bestimmung des Einflusses der mittels shRNA supprimierten 13 Gene auf das Zellwachstum wurde in der vorliegenden Arbeit ein Colony-Formation-Assay durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass innerhalb kürzester Zeit (2-3 Wochen) die Einflüsse der Suppression auf das Zellwachstum bereits erkennbar sind. Dabei wird der Effekt auf das Zellwachstum in der Fähigkeit zur Koloniebildung der Zellen anhand der Größe und der Anzahl der Zellkolonien gemessen [18-20, 47]. Basierend auf der Definition eines klassischen Tumorsuppressorgenes sollte die reduzierte Expression dieser Gene in einer deutlich höheren Anzahl an makroskopisch sichtbaren Zellkolonien im Vergleich zu einer Negativkontrolle führen. Um einen Transfektions-bedingten Einfluss auf das Zellwachstum auszuschließen, sollten die Negativkontrollen shRNA-Konstrukte enthalten, welche nicht gegen eine humane mRNA gerichtet sind. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Negativkontrollen verwendet: 1. Eine shRNA gerichtet gegen das nicht humane grün-fluoreszierende Protein (*shGFP*) [39, 40] und 2. Eine shRNA gerichtet gegen die prokaryotische DNA-Polymerase I (*shNeg*) [39, 40]. Zur Vermeidung von Zelllinien-spezifischen Effekten wurden die Versuche in einer benignen (BPH-1) und einer malignen (DU 145) Prostatazelllinie durchgeführt. Ein potentiell tumorsuppressives Gen wurde angenommen, wenn die reduzierte Expression in beiden Zelllinien im Vergleich zu beiden Negativkontrollen in einer

signifikanten Steigerung des Zellwachstums resultierte. Um darüber hinaus zu testen, ob die Suppression der als Tumor-relevant identifizierten Gene einen Einfluss auf die Aggressivität der Zellen besitzt, wurde ein Invasion Assay durchgeführt. Im Invasion Assay kann geprüft werden, ob Zellen auf Grund einer Veränderung in der Lage sind eine „künstliche“ Basalmembran zu durchwandern [48]. Dies wäre *in-vivo* die Voraussetzung für die Ausbildung von soliden Tumoren.

Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten die beiden Gene *HMGN3* (6q14.1) und *SMAP1* (6q13) als potentielle Tumorsuppressorgene der 6q12-q22 Deletion identifiziert werden. Beide Gene zeigten im Colony-Formation-Assay eine deutliche Steigerung des Zellwachstums in Vergleich zu den Negativkontrollen in beiden untersuchten Zelllinien. Zusätzlich dazu führte die Suppression der Gene *HMGN3* und *SMAP1* zu einer mit der Herabregulierung des Genes *RB1* vergleichbaren Wachstumssteigerung. Für *RB1* konnte bereits in zahlreichen Tumorentitäten eine tumorsuppressive Wirkung im Bezug auf das Wachstum der Tumorzellen nachgewiesen werden [42-44]. Im Invasion Assay konnte keine Steigerung des Aggressivitätspotentials der Zellen gezeigt werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sowohl *HMGN3* als auch *SMAP1* zu den putativen Tumorsuppressorgenen der 6q12-q22-Deletion beim Prostatakarzinom zählen, deren Suppression zum Tumorwachstum bzw. der Tumorprogression beiträgt.

Eine tumorsuppressive Wirkung beider Gene steht zudem in Einklang mit der bekannten zellulären Funktion dieser Gene. *HMGN3* (High Mobility Group Nucleosomal Binding Protein Domain 3) gehört zur großen Familie der HMG-Proteine. Die HMG-Proteine sind kleine basische Transkriptionsfaktoren die auf Grund ihrer positiven Ladung mit dem negativ geladenen Rückgrat der DNA, vor allem im Bereich der kleinen Furche, interagieren [42]. Es ist bereits bekannt, dass die HMGN-Proteine durch Bindung an die Nukleosomen die Chromatinstruktur beeinflussen [49]. Zusätzlich dazu sind die HMGN-Proteine an der Modifikation von Histon-Proteinen beteiligt [49, 50]. Dies deutet auf eine Funktion dieser Proteine in der epigenetischen Regulation der Genexpression hin. Basierend auf der bekannten Funktion der HMGN-Proteine spielen diese eine zentrale Rolle bei zahlreichen Tumor-relevanten Prozessen, wie zum Beispiel bei der Regulation der Transkription und der Replikation sowie bei Mechanismen zur DNA-Reparatur [42, 51, 52]. Neben der allgemeinen Funktion der HMGN-Proteine bei der Regulation von Chromatin-abhängigen Prozessen fungiert *HMGN3* außerdem als spezifischer Transkriptionsfaktor zahlreicher Gene innerhalb des Glukose- und Lipidstoffwechsels. Zu diesen Genen zählt unter anderem das potentielle Tumorsuppressorgen *AZGP1* [53]. Studien anderer Arbeitsgruppen und eine eigene Studie unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die *AZGP1*-Suppression mit einem gesteigerten Zellwachstum, ungünstigen Tumoreigenschaften und einem frühen PSA-Rezidiv beim Prostatakarzinom assoziiert ist [54, 55]. Darüber hinaus wird der Nachweis der *AZGP1*-Expression für die klinisch-diagnostische Anwendung alleine oder in Multiparameter-Tests empfohlen [56]. Basierend auf der *HMGN3*-vermittelten Regulation der *AZGP1*-Expression ist es vorstellbar, dass die Deletions-bedingte *HMGN3*-Suppression

zumindest einen indirekten Einfluss auf die Steigerung des Wachstums der Prostata-tumorzellen besitzt.

SMAP1 (small ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein) gehört zur Gruppe der ADP-Ribosylierungsfaktoren aktivierenden GTPasen. Die ADP-Ribosylierung spielt eine Rolle bei zahlreichen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel bei der zellulären Signalübertragung von membranständigen Rezeptoren, der Histon-Modifikation und dem Aufbau des Zytoskelletes [42, 57, 58]. *SMAP1* ist für die spezifische Aktivierung des ADP-Ribosylierungsfaktor 6 zuständig. Damit spielt *SMAP1* eine Rolle beim Membrantransport von *Proteinen* und der Aktin-Remodelierung [59-61]. Des Weiteren wird vermutet, dass *SMAP1* eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Mikrosatelliten-Instabilität besitzt, welche in der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten nachweislich eine Rolle spielt [62]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen außerdem in Einklang mit einer früheren Studie von Sanger et al. [62]. In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Mutations-bedingte *SMAP1* Inaktivierung in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 zu einer erhöhten Zellproliferation und damit zur Ausbildung von großen Zellkolonien führt. Dieser Effekt konnte auf einen verkürzten Übergang der *SMAP1* mutierten Zellen von der G2-Phase in die Mitose innerhalb des Zellzyklus zurückgeführt werden [62].

Der Nachweis von zwei putativen Tumorsuppressorgenen außerhalb der minimal deletierten 6q15-Region bestätigt die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese, dass die deutlich schlechtere Prognose von Tumoren mit einer großen 6q-Deletionen durch eine Beeinträchtigung weiterer Tumorsuppressorgene außerhalb der 6q15-Region verursacht wird. Diese Entdeckung zeigt, dass eines der populärsten Verfahren zur Identifizierung von Tumor-relevanten Genen nicht in jedem Fall zielführend ist. So wurde oftmals die kleinste gemeinsam deletierte Region innerhalb eines Tumorkollektivs unter der Annahme bestimmt, dass derjenige Genort, der in allen untersuchten Tumoren betroffen ist, auch das „eine“ Tumor-biologisch relevante Gen enthalten muss. Weiter wurde angenommen, dass diejenigen Genorte die nur in einer Untergruppe der Tumoren von der Deletion betroffen waren, mindestens weniger wichtig wenn nicht sogar unbedeutend waren. Diese Strategie wurde besonders in Kopiezahl-Screening-Studien (CGH, aCGH) angewendet um neue Tumorsuppressorgene oder Onkogene zu finden [20-22, 31, 32]. Basierend auf diesem Verfahren wurden in früheren Prostatakarzinom-Studien insbesondere Gene innerhalb der 6q15 Region auf eine potentiell tumorsuppressive Funktion hin untersucht. Dazu zählt unter anderem das Gen *MAP3K7*, das mitten in der 2 Megabasen großen 6q15-Region mit lediglich 11 weiteren Genen lokalisiert ist und infolge dessen wiederholt – und mit Erfolg - auf eine tumorsuppressive Funktion untersucht worden ist [19, 37]. Zudem konnte in der Arbeitsgruppe um Frau Kluth aber auch noch für ein weiteres der 11 Gene (*UBE2J1*) eine Tumorsuppressorfunktion belegt werden [38]. Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deuten diese Befunde darauf hin, dass innerhalb von großen Deletionen eine Funktionseinschränkung einer Vielzahl von tumorsuppressiven Genen vorliegt. Insgesamt sind von der großen 6q12-q22 Deletion mehr als 200 Gene betroffen von denen mehr als 180

außerhalb der 6q15-Region lokalisiert sind. Basierend auf dem Befund das von 13 untersuchten Genen 2 (15%) Gene eine tumorsuppressive Funktion haben, muss angenommen werden, dass bei der Analyse aller Gene bis zu 20 weitere tumorsuppressive Gene identifiziert werden könnten. Es ist daher nicht erstaunlich, dass in der Literatur weitere Gene, wie *SNX14* (6q14.3) [63], *ANKRD6* (6q15) [21], *CASP8AP4* (6q15) [21, 22], *HEK11* (6q16.1) [64], *CCNC* (16q.2) [64, 65], *FOXO3* (6q21)[29, 30], *AIM1* (6q21) [64], *FYN* (6q21) [63] und *GOPC* (6q22.1) [29], als potentielle Zielgene der 6q-Deletion vorgeschlagen werden, obwohl deren Tumor-relevante Funktion beim Prostatakarzinom bislang noch nicht belegt ist.

Eine weitere Besonderheit der potentiellen 6q-Tumorsuppressorgene ist, dass sie offensichtlich nicht der klassischen Definition eines Tumorsuppressorgenes nach Knudson entsprechen. Nach Knudson ist ein Tumorsuppressorgen durch eine biallelische Inaktivierung charakterisiert, die häufig auf Grund zweier unabhängiger genetischer Alterationen entsteht [66]. Diese Annahme beruht auf Untersuchungen des Tumorsuppressorgenes *RB1* beim Retinoblastom. Hier konnte Knudson zeigen, dass bei einer erblich-bedingten Mutation eines *RB1*-Allels ein zweites inaktivierendes Ereignis notwendig ist, damit es zu einer Tumorentstehung kommt [66]. In einer Studie innerhalb der Arbeitsgruppe um Frau Kluth, wurden fünf verschiedene Regionen der 6q-Deletion mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht. Erstaunlich dabei war, dass alle detektierten 6q12-q22-Deletionen ausschließlich heterozygot waren [19, 38]. Zusätzlich dazu sind aus Next-Generation-Sequenzierungsstudien keine anderen genetischen Alterationen, wie zum Beispiel Punktmutationen, bekannt, die zu einer Inaktivierung des zweiten Allels einzelner 6q-deletierter Gene führen könnten [67-70]. Es ist daher annehmbar, dass es sich bei den tumorsuppressiven Genen der 6q-Deletion um haploinsuffiziente Gene handelt, bei denen bereits die monoallelische Inaktivierung ausreicht um den Tumor-begünstigenden Effekt hervorzurufen [71] und die gemeinsam den tumor-begünstigenden Effekt verursachen.

Diese Hypothese wird unterstützt durch eine frühere Studie in der Arbeitsgruppe um Frau Kluth in der gezeigt werden konnte, dass die Größe der 6q-Deletion einen Einfluss auf die Prognose von Prostatakarzinom-Patienten besitzt. In dieser Studie wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) der Einfluss der 6q-Deletionsgröße an mehr als 7.000 Prostatatumoren untersucht. Insgesamt konnten drei häufige Deletionsgrößen identifiziert werden. Eine „kleine“ 6q14-q16-Deletion, eine „mittlere“ 6q14-q22-Deletion und eine „große“ 6q12-q22-Deletion. Interessanterweise wurde die Prognose, gemessen am PSA-Rezidiv, für die Patienten mit zunehmender Deletionsgröße im Tumor immer schlechter. Dies bedeutet, dass Patienten mit einer „kleinen“ 6q14-q16-Deletion zwar eine schlechtere Prognose hatten als Patienten deren Tumoren keine 6q-Deletion aufwiesen, aber die schlechteste Prognose konnte für Patienten gemessen werden, deren Tumoren von einer „großen“ 6q12-q22-Deletion betroffen waren [38]. Vergleichbare Ergebnisse konnten in anderen Tumorentitäten erzielt werden. Dal Bo et al. untersuchten den Einfluss der Größe der 13q-Deletion auf die Prognose von Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie. In dieser Studie hatten Pati-

enten mit einer großen 13q14-Deletionen, die von den Genen *DLEU* bis *RB1* reichte, eine wesentlich schlechtere Prognose als Patienten bei denen die Deletion ausschließlich das Gen *DLEU* betraf [72]. In der Studie von Xue et al. wurde der Einfluss der 8p-Deletionsgröße, welche die häufigste Deletion in soliden Tumoren darstellt, auf die Progression von Leberkarzinomen untersucht. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Tumor-Progression von der Anzahl der supprimierten Gene abhängig war. Des Weiteren konnten fünf von insgesamt 14 getesteten Genen als potentielle Tumorsuppressorgene der 8p-Deletion identifiziert werden [73].

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit mit *HMGN3* und *SMAP1* zwei potentielle Tumorsuppressorgene der 6q12-q22-Deletion identifiziert werden, die nicht in der sogenannten gemeinsam minimal deletierten 6q15-Region lokalisiert sind. Dies spricht dafür, dass der Tumor-relevante Effekt der 6q-Deletion durch die Inaktivierung mehrere vermutlich haploinsuffizienter Tumorsuppressorgene hervorgerufen wird, die nicht zwingend in der minimal deletierten Region lokalisiert sein müssen. Des Weiteren wiederlegt die vorliegende Arbeit klar die Hypothese, dass beim Prostatakarzinom innerhalb der häufigen großen 6q-Deletion nur ein wesentliches Zielgen existiert.

5 Zusammenfassung

Die 6q-Deletion zählt mit einer Prävalenz von circa 20% zu den häufigsten Deletionen des Prostatakarzinoms. Die Deletion ist dadurch charakterisiert, dass sie häufig große Bereich (bis zu 40 Megabasen) des langen Arms des Chromosoms 6 und damit bis zu 200 Gene umfasst. Das Zentrum der Deletion befindet sich in der 6q15-Region (minimal deletierte Region), in der in früheren Studien bereits drei potentielle Tumorsuppressorgen identifiziert werden konnten. In einer Studie des Instituts für Pathologie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Deletionsgröße einen Einfluss auf die Prognose des Patienten beim Prostatakarzinom besitzt. Basierend darauf untersuchte die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass auch außerhalb der minimal deletierten Region tumorsuppressive Gen(e) lokalisiert sein dürften. Ziel war es daher, an einem zufällig ausgewählten Set von 13 Genen außerhalb der 6q15-Region zu prüfen, ob diese potentielle Tumorsuppressoren sind. Dazu wurden die 13 Gene mittels shRNAs supprimiert und der Einfluss der Suppression auf das Zellwachstum in den Prostata-Zelllinien BPH-1 (benigne) und DU 145 (maligne) im Vergleich zu den Negativkontrollen *shGFP* und *shNeg* im Colony-Formation-Assay geprüft. Des Weiteren wurde der Einfluss der identifizierten Kandidatengene auf die Aggressivität in DU 145 im Invasions-Assay getestet. Bei 8 Genen führte die Suppression in BPH-1 und bei 3 Genen in DU 145 zu einer signifikanten Steigerung des Zellwachstums im Vergleich zu beiden Negativkontrollen ($P \leq 0,04$ für alle). Zwei Gene (*HMGN3* und *SMAP1*) zeigten in beiden Zelllinien eine wachstumssuppressive Funktion: Die Suppression von *SMAP1* führte in *BPH1* ($p=0,0022$ für *shNeg*, $p=0,0022$ für *shGFP*) und DU 145 ($p=0,0005$ für *shNeg*, $p=0,0057$ für *shGFP*) zu einer deutlichen Steigerung des Zellwachstums ähnlich wie die Suppression von *HMGN3* in BPH1 ($p=0,0001$ für *shNeg*, $p=0,0001$ für *shGFP*) und DU 145. Der Effekt beider Gene auf das Zellwachstum war vergleichbar mit dem Effekt des bekannten Tumorsuppressorgenes *RB1*. Demgegenüber zeigte keines der beiden Gene einen Einfluss auf das Invasionspotential im Invasionsassay: Der Invasions Index betrug für die *shHMGN3*-Probe nur 1,48 und für die *shSMAP1*-Probe 1,43.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit mit *HMGN3* (6q13) und *SMAP1* (6q14) zwei weitere potentielle Tumorsuppressorgene außerhalb der Kernregion (6q15) der 6q-Deletion identifiziert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die 6q-Region mehrere Tumorsuppressorgene enthält und damit die Hypothese „eine Deletion ein Zielgen“ für die 6q-Deletion des Prostatakarzinoms nicht zu trifft.

6 Abstract

Deletions at chromosome 6q belong to the most frequent genomic alterations in prostate cancer, spanning from 2 to 40 mega bases with up to 200 genes. Previous studies have found a minimal deleted region at 6q15 and suggest multiple potential tumor suppressor genes at this locus. Own data from our group even suggest additional tumor suppressor genes based on the finding that deletions of larger size (extending beyond 6q15) have a worst prognosis as compared to small deletions limited to 6q15.

To search for additional tumor suppressor genes outside 6q15, we performed shRNA-mediated knockdown of 13 genes located at 6q13, 6q14 and 6q16 in the cell lines BPH-1 and DU 145. The cell growth impact of gene down-regulation was tested by colony formation assay in comparison to two negative controls (shGFP and shNeg). Down-regulation of 8 genes (BPH-1) or 2 genes (DU 145) results in a significant stronger cell growth in comparison to both negative controls ($p \leq 0.04$ for each). Suppression of two of these genes, HMG3 (6q13) and SMAP1 (6q14), leads to stronger cell growth in both cell lines. In addition, the cell growth impact was comparable to the shRNA-mediated down-regulation of RB-1 for both genes in both cell lines. However, down-regulation of both genes had no impact on the invasive cell growth in an invasion assay (invasion assay index for shHMG3 = 1.48 and for shSMAP1 = 1.43).

In summary, the results of our study identify HMG3 (6q13) and SMAP1 (6q14) as potential tumor suppressor genes inside the 6q deletion. Our findings supported the assumption that large deletions can harbor multiple tumor suppressor genes. We conclude that the "one gene one deletion" hypothesis is not necessarily true in prostate cancer.

II. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

2.1 Verwendete Zelllinien	9
2.2 Zellpflege.....	11
2.3 shRNA-Konstrukte von der Firma Sigma-Aldrich in Hamburg	12
2.4 TaqMan®-Sonden	15
2.5 Western Blot Antikörper	16
2.6 Reagenzien und kommerzielle Kits.....	16
2.7 Material und Geräte	18
2.8 Verwendete Lösungen	19
3.1. Auswirkungen der shRNA-vermittelten Suppression der Gene <i>HMGN3</i> und <i>SMAP1</i> auf das invasive Zellwachstum der Zelllinie DU 145.....	46

Abbildungsverzeichnis

3.1 Untersuchung des Expressionsniveaus ausgewählter Gene im Bereich 6q12-q14 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP und der Prostataepithelzelllinie BPH-1 mittels TaqMan®-PCR.....	28
3.2 Untersuchung des Expressionsniveaus ausgewählter Gene im Bereich 6q16-q22 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP und der Prostataepithelzelllinie BPH-1 mittels TaqMan®-PCR.....	29
3.3 Untersuchung der Depletionseffizienz von 5 kommerziell erhältlichen shRNA-Konstrukten pro Gen mittels lentiviraler Vektor-Transduktion und TaqMan®-PCR in der Zelllinie BPH-1	31
3.4 shRNA-Konstruktvalidierung in der lentiviral transduzierten Prostataepithelzelllinie BPH-1	33
3.5 Colony-Formation-Assay Screening im Doppelansatz in der mittels Lipofektamin®2000 transient transfizierten Prostataepithelzelllinie BPH-1. Well-Darstellung	35
3.6 Colony-Formation Assay Screening im Doppelansatz in der mittels Lipofektamin®2000 transient transfizierten Prostatazelllinie BPH-1, Boxblot-Darstellung.....	36

3.7 Colony-Formation Assay Screening im Doppelansatz in der mittels Lipofekta- min®2000 transient transfizierten Prostatakarzinomzelllinie DU 145. Well- Darstellung.....	37
3.8 Colony-Formation Assay Screening im Doppelansatz in der mittels Lipofekta- min®2000 transient transfizierten Prostatazelllinie DU 145. Boxblot- Darstellung.....	38
3.9 Colony-Formation Assay Validierung im Vierfachansatz in der mittels Lipofekta- min®2000 transient transfizierten Prostatazelllinie BPH-1. Boxblot-Darstellung und exemplarische Well- Darstellung	40
3.10 Colony-Formation Assay Validierung im Vierfachansatz in der mittels Lipofekta- min®2000 transient transfizierten Prostatazelllinie DU 145. Boxblot-Darstellung und exemplarische Well-Darstellung	41
3.11 Nachweis der Depletionseffizienz auf mRNA-Ebene in der lentiviral transduzierten Zelllinie BPH-1 für die potentiellen tumorsuppressiven Zielgene <i>HMGN3</i> und <i>SMAP1</i>	43
3.12 Nachweis der Depletionseffizienz auf mRNA-Ebene in der lentiviral transduzierten Zelllinie DU 145 für die potentiellen tumorsuppressiven Zielgene <i>HMGN3</i> und <i>SMAP1</i>	43
3,13 Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion auf Protein-Ebene in der lentiviral transduzierten Zelllinie BPH-1 für die potentiellen tumorsuppressiven Zielgene <i>HMGN3</i> und <i>SMAP1</i>	45
3,14 Nachweis der shRNA-vermittelten Depletion auf Protein-Ebene in der lentiviral transduzierten Zelllinie DU 145 für die potentiellen tumorsuppressiven Zielgene <i>HMGN3</i> und <i>SMAP1</i>	45
3.15 Exemplarische Darstellung der Auswirkungen der shRNA-vermittelten Suppressi- on der Gene <i>HMGN3</i> und <i>SMAP1</i> auf das invasive Zellwachstum der Zelllinie DU 145.....	47

III. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
AK	Antikörper
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Cycle Threshold
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRU	Digital rektale Untersuchung
FCS	Fetal Bovine Serum Gold
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde(n)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
NEAA	Non Essential Amino Acids
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PSA	Prostata spezifisches Antigen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
V	Volt

IV. Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2):87-108.
2. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012.
3. Rohde V, Katalinic A, Wasem J and Aidelsburger P. (2007). Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 36: Prostataerkrankungen.
4. Djavan B, Ravery V, Zlotta A, Dobronski P, Dobrovits M, Fakhari M, Seitz C, Susani M, Borkowski A, Boccon-Gibod L, Schulman CC and Marberger M. Prospective evaluation of prostate cancer detected on biopsies 1, 2, 3 and 4: when should we stop? *J Urol.* 2001; 166(5):1679-1683.
5. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. (<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>, pp. Registernummer: 043/022OL.
6. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992; 23(3):273-279.
7. Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Schmid HP, Gasser TC, Jordan P and Mihatsch MJ. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Pathol.* 1996; 178(4):437-441.
8. Bubendorf L, Tapia C, Gasser TC, Casella R, Grunder B, Moch H, Mihatsch MJ and Sauter G. Ki67 labeling index in core needle biopsies independently predicts tumor-specific survival in prostate cancer. *Hum Pathol.* 1998; 29(9):949-954.
9. Zellweger T, Gunther S, Zlobec I, Savic S, Sauter G, Moch H, Mattarelli G, Eichenberger T, Curschellas E, Rufenacht H, Bachmann A, Gasser TC, Mihatsch MJ and Bubendorf L. Tumour growth fraction measured by immunohistochemical staining of Ki67 is an independent prognostic factor in preoperative prostate biopsies with small-volume or low-grade prostate cancer. *Int J Cancer.* 2009; 124(9):2116-2123.
10. Phin S, Moore MW and Cotter PD. Genomic Rearrangements of PTEN in Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2013; 3:240.
11. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, Kotschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhauser C, Mader M, Kurtz S, Sirma H, Saad F, Steuber T, Graefen M, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *The American journal of pathology.* 2012; 181(2):401-412.
12. Schlomm T, Erbersdobler A, Mirlacher M and Sauter G. Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. *World J Urol.* 2007; 25(1):19-30.
13. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kollermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G and Erbersdobler A. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol.* 2008; 21(11):1371-1378.

14. Zellweger T, Ninck C, Bloch M, Mirlacher M, Koivisto PA, Helin HJ, Mihatsch MJ, Gasser TC and Bubendorf L. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2005; 113(4):619-628.
15. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, Gjoni J, Hass T, Galal R, Graefen M, Haese A, Simon R, Huhne-Simon J, Koop C, Korbel J, Weischenfeld J, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J Cancer*. 2014; 135(6):1369-1380.
16. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA and Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005; 310(5748):644-648.
17. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Muller J, Scholz L, Brase JC, Liu AY, Schluter H, Pantel K, Schumacher U, Bokemeyer C, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(18):5878-5888.
18. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Sauter G, Sirma H and Simon R. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res*. 2013; 73(9):2795-2805.
19. Kluth M, Hesse J, Heini A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, Izbicki JR, Pantel K, Dikomey E, Korbel JO, Plass C, Sauter G, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol*. 2013; 26(7):975-983.
20. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M, Huland H, Kurtz S, Steurer S, Tsourlakis MC, Minner S, Michl U, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol*. 2013; 231(1):130-141.
21. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, Ferrari M, Hernandez-Boussard T, Brooks JD and Pollack JR. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007; 67(18):8504-8510.
22. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major JE, Wilson M, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 2010; 18(1):11-22.
23. Burdelski C, Bujupi E, Tsourlakis MC, Hube-Magg C, Kluth M, Melling N, Lebok P, Minner S, Koop C, Graefen M, Heinzer H, Wittmer C, Sauter G, Wilczak W, Simon R, Schlomm T, et al. Loss of SOX9 Expression Is Associated with PSA Recurrence in ERG-Positive and PTEN Deleted Prostate Cancers. *PLoS one*. 2015; 10(6):e0128525.
24. Grupp K, Habermann M, Sirma H, Simon R, Steurer S, Hube-Magg C, Prien K, Burkhardt L, Jedrzejewska K, Salomon G, Heinzer H, Wilczak W, Kluth M, Izbicki JR, Sauter G, Minner S, et al. High nuclear karyopherin alpha 2 expression is a strong and independent predictor of biochemical recurrence in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Mod Pathol*. 2013.
25. Grupp K, Ospina-Klinck D, Tsourlakis MC, Koop C, Wilczak W, Adam M, Simon R, Sauter G, Izbicki JR, Graefen M, Huland H, Steurer S, Schlomm T, Minner S and Quaas A. NY-ESO-1 expression is tightly linked to TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer. *The Prostate*. 2014; 74(10):1012-1022.

26. Melling N, Harutyunyan L, Hube-Magg C, Kluth M, Simon R, Lebok P, Minner S, Tsourlakis MC, Koop C, Graefen M, Adam M, Haese A, Wittmer C, Steurer S, Izbicki J, Sauter G, et al. High-Level HOOK3 Expression Is an Independent Predictor of Poor Prognosis Associated with Genomic Instability in Prostate Cancer. *PloS one*. 2015; 10(7):e0134614.
27. Tsourlakis MC, Weigand P, Grupp K, Kluth M, Steurer S, Schlomm T, Graefen M, Huland H, Salomon G, Steuber T, Wilczak W, Sirma H, Simon R, Sauter G, Minner S and Quaas A. betaIII-Tubulin Overexpression Is an Independent Predictor of Prostate Cancer Progression Tightly Linked to ERG Fusion Status and PTEN Deletion. *The American journal of pathology*. 2013.
28. Muller J, Ehlers A, Burkhardt L, Sirma H, Steuber T, Graefen M, Sauter G, Minner S, Simon R, Schlomm T and Michl U. Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. *Int J Cancer*. 2013; 132(6):1333-1340.
29. Sun J, Liu W, Adams TS, Sun J, Li X, Turner AR, Chang B, Kim JW, Zheng SL, Isaacs WB and Xu J. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *The Prostate*. 2007; 67(7):692-700.
30. Williams JL, Greer PA and Squire JA. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genet*. 2014; 207(10-12):474-488.
31. Ishkanian AS, Malloff CA, Ho J, Meng A, Albert M, Syed A, van der Kwast T, Milosevic M, Yoshimoto M, Squire JA, Lam WL and Bristow RG. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer. *The Prostate*. 2009; 69(10):1091-1100.
32. Liu W, Chang BL, Cramer S, Koty PP, Li T, Sun J, Turner AR, Von Kap-Herr C, Bobby P, Rao J, Zheng SL, Isaacs WB and Xu J. Deletion of a small consensus region at 6q15, including the MAP3K7 gene, is significantly associated with high-grade prostate cancers. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(17):5028-5033.
33. Kauraniemi P, Kuukasjarvi T, Sauter G and Kallioniemi A. Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *The American journal of pathology*. 2003; 163(5):1979-1984.
34. Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R and Sauter G. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer*. 2006; 118(9):2190-2194.
35. Delaney JR and Mlodzik M. TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity. *Cell Cycle*. 2006; 5(24):2852-2855.
36. Katoh M and Katoh M. Comparative integromics on non-canonical WNT or planar cell polarity signaling molecules: transcriptional mechanism of PTK7 in colorectal cancer and that of SEMA6A in undifferentiated ES cells. *Int J Mol Med*. 2007; 20(3):405-409.
37. Wu M, Shi L, Cimic A, Romero L, Sui G, Lees CJ, Cline JM, Seals DF, Sirintrapun JS, McCoy TP, Liu W, Kim JW, Hawkins GA, Peehl DM, Xu J and Cramer SD. Suppression of Tak1 promotes prostate tumorigenesis. *Cancer Res*. 2012; 72(11):2833-2843.
38. Kluth M. (2016). Bedeutung und Charakterisierung der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom: Universität Hamburg:E-Dissertation: <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2016/7712/pdf/Dissertation.pdf>).

39. Everett RD, Rechter S, Papior P, Tavalai N, Stamminger T and Orr A. PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol.* 2006; 80(16):7995-8005.
40. Glass M and Everett RD. Components of promyelocytic leukemia nuclear bodies (ND10) act cooperatively to repress herpesvirus infection. *J Virol.* 2013; 87(4):2174-2185.
41. Holtzhauser M. (1997). *Biochemische Labormethoden.* (3. Auflage: Springer-Verlag/Berlin Heidelberg).
42. Wagener C and Müller O. (2009). *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte;* 3. Auflage: Thieme Verlag).
43. Cooper G and Sunderland M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach.* Chapter 15. Cancer - Tumor Suppressor Genes: 2nd edition. NCBI Bookshelf).
44. Di Fiore R, D'Anneo A, Tesoriere G and Vento R. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2013; 228(8):1676-1687.
45. Ming M and He YY. PTEN in DNA damage repair. *Cancer Lett.* 2012; 319(2):125-129.
46. Yin Y and Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.* 2008; 27(41):5443-5453.
47. Schmitz S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur:* Springer Spektrum).
48. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschlager M and Dolznig H. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res.* 2013; 752(1):10-24.
49. Kugler JE, Deng T and Bustin M. The HMGN family of chromatin-binding proteins: dynamic modulators of epigenetic processes. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1819(7):652-656.
50. Barkess G, Postnikov Y, Campos CD, Mishra S, Mohan G, Verma S, Bustin M and West KL. The chromatin-binding protein HMGN3 stimulates histone acetylation and transcription across the Glyt1 gene. *Biochem J.* 2012; 442(3):495-505.
51. Zhu N and Hansen U. Transcriptional regulation by HMGN proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1799(1-2):74-79.
52. West KL. HMGN proteins play roles in DNA repair and gene expression in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32(Pt 6):918-919.
53. Kugler JE, Horsch M, Huang D, Furusawa T, Rochman M, Garrett L, Becker L, Bohla A, Holter SM, Prehn C, Rathkolb B, Racz I, Aguilar-Pimentel JA, Adler T, Adamski J, Beckers J, et al. High mobility group N proteins modulate the fidelity of the cellular transcriptional profile in a tissue- and variant-specific manner. *J Biol Chem.* 2013; 288(23):16690-16703.
54. Burdelski C, Kleinhans S, Kluth M, Hube-Magg C, Minner S, Koop C, Graefen M, Heinzer H, Tsourlakis MC, Wilczak W, Marx A, Sauter G, Wittmer C, Huland H, Simon R, Schlomm T, et al. Reduced AZGP1 expression is an independent predictor of early PSA recurrence and associated with ERG-fusion positive and PTEN deleted prostate cancers. *Int J Cancer.* 2016; 138(5):1199-1206.
55. Jung WY, Sung CO, Han SH, Kim K, Kim M, Ro JY, Kang MJ, Ahn H and Cho YM. AZGP-1 immunohistochemical marker in prostate cancer: potential predictive marker of biochemical recurrence in post radical prostatectomy specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014; 22(9):652-657.
56. Severi G, FitzGerald LM, Muller DC, Pedersen J, Longano A, Southey MC, Hopper JL, English DR, Giles GG and Mills J. A three-protein biomarker panel assessed in

- diagnostic tissue predicts death from prostate cancer for men with localized disease. *Cancer Med.* 2014; 3(5):1266-1274.
57. Hottiger MO. Nuclear ADP-Ribosylation and Its Role in Chromatin Plasticity, Cell Differentiation, and Epigenetics. *Annu Rev Biochem.* 2015; 84:227-263.
58. Randazzo PA, Nie Z, Miura K and Hsu VW. Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci STKE.* 2000; 2000(59):re1.
59. Marcos I, Borrego S, Rodriguez de Cordoba S, Galan JJ and Antinolo G. Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SMAP1 gene. *Gene.* 2002; 292(1-2):167-171.
60. Tanabe K, Kon S, Ichijo N, Funaki T, Natsume W, Watanabe T and Satake M. A SMAP gene family encoding ARF GTPase-activating proteins and its implication in membrane trafficking. *Methods Enzymol.* 2008; 438:155-170.
61. Kon S, Tanabe K, Watanabe T, Sabe H and Satake M. Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. *Exp Cell Res.* 2008; 314(7):1415-1428.
62. Sangar F, Schreurs AS, Umana-Diaz C, Claperon A, Desbois-Mouthon C, Calmel C, Mauger O, Zaanan A, Miquel C, Flejou JF and Praz F. Involvement of small ArfGAP1 (SMAP1), a novel Arf6-specific GTPase-activating protein, in microsatellite instability oncogenesis. *Oncogene.* 2014; 33(21):2758-2767.
63. Sorensen KD, Borre M, Orntoft TF, Dyrskjot L and Topping N. Chromosomal deletion, promoter hypermethylation and downregulation of FYN in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2008; 122(3):509-519.
64. Srikantan V, Sesterhenn IA, Davis L, Hankins GR, Avallone FA, Livezey JR, Connelly R, Mostofi FK, McLeod DG, Moul JW, Chandrasekharappa SC and Srivastava S. Allelic loss on chromosome 6Q in primary prostate cancer. *Int J Cancer.* 1999; 84(3):331-335.
65. Hyytinen ER, Saadut R, Chen C, Paull L, Koivisto PA, Vessella RL, Frierson HF, Jr. and Dong JT. Defining the region(s) of deletion at 6q16-q22 in human prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 34(3):306-312.
66. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971; 68(4):820-823.
67. Grasso CS, Cani AK, Hovelson DH, Quist MJ, Douville NJ, Yadati V, Amin AM, Nelson PS, Betz BL, Liu CJ, Knudsen KE, Cooney KA, Feng FY, McDaniel AS and Tomlins SA. Integrative molecular profiling of routine clinical prostate cancer specimens. *Ann Oncol.* 2015; 26(6):1110-1118.
68. Huang J, Wang JK and Sun Y. Molecular pathology of prostate cancer revealed by next-generation sequencing: opportunities for genome-based personalized therapy. *Curr Opin Urol.* 2013; 23(3):189-193.
69. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, Sboner A, Esgueva R, Pflueger D, Sougnez C, Onofrio R, Carter SL, Park K, Habegger L, Ambrogio L, Fennell T, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature.* 2011; 470(7333):214-220.
70. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, Wuttig D, Warnatz HJ, Stehr H, Rausch T, Jager N, Gu L, Bogatyrova O, Stutz AM, Claus R, Eils J, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell.* 2013; 23(2):159-170.
71. Berger AH, Knudson AG and Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature.* 2011; 476(7359):163-169.

72. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, Palumbo G, Nanni M, Rinaldi A, Kwee I, Tissino E, Corradini G, Gozzetti A, Cencini E, Ladetto M, Coletta AM, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011; 50(8):633-643.

73. Xue W, Kitzing T, Roessler S, Zuber J, Krasnitz A, Schultz N, Revill K, Weissmueller S, Rappaport AR, Simon J, Zhang J, Luo W, Hicks J, Zender L, Wang XW, Powers S, et al. A cluster of cooperating tumor-suppressor gene candidates in chromosomal deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(21):8212-8217.

V. Danksagung

An dieser Stelle bietet sich mir die Gelegenheit allen Menschen zu danken, die mich bei der erfolgreichen Fertigstellung dieser Dissertation geleitet und unterstützt haben. Besonders zu erwähnen ist hier neben meinem Doktorvater Prof. Dr. Guido Sauter, meine immer motivierte und motivierende Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Martina Kluth, ohne deren Engagement, allseits offenes Ohr und Herzlichkeit ich mich nicht in der Lage gewusst hätte, meine Arbeit mit so viel Freude durchzuführen.

Zudem gilt mein Dank auch allen anderen Institutskollegen und Doktoranden, wie Sawinee Masser, Bianca Kelp und Dr. Omar Habib, die immer zu helfen bereit waren und mit denen ich eine gute Zeit hatte.

Natürlich gebührt auch mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mir den Weg ebneten und mir zeigten, dass ich alles sein und schaffen kann, meinen Geschwistern, ohne die ich nicht ich bin, meiner restlichen Familie und meinen Freunden, die mir immer viel Kraft und Halt gegeben und mich ausgehalten haben, wenn es mal nicht so rund lief.
Für all das kann ich gar nicht genug danken.

VI. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Mina Eshagzaïy
Geburtsort Hamburg

Studium

10/2010 – 04/2017 Studium der Humanmedizin,
Universität Hamburg

11/2015 - 03/2016 Auslandstertial des Praktischen Jahres im **Groote Schuur Hospital, University of Capetown (UCT), Südafrika**

09/2014 - 01/2015 Auslandsstudium im Fach Humanmedizin,
Universidad de Sevilla, Spanien

04/2013 – 10/2013 Wahlfach experimentelle Pathologie, anschließende studentisch-wissenschaftliche Mitarbeit mit dem Ziel der Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin, **Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

VII. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, 18.10.2016

Ort, Datum

M.Eshagzaiy

Unterschrift