

Aus der Fachrichtung 2.4
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie,
Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften,
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, Homburg/ Saar

**Der Einfluss allelischer Varianten des trpv6-Gens auf die Malignität
des Prostatakarzinoms**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2010

Vorgelegt von: Thorsten Keßler,
geb. am 13.02.1984 in Quierschied

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Zusammenfassung.....	9
Summary.....	11
2 Einleitung.....	12
2.1 Kalziumionen als zelluläre Signalmoleküle.....	12
2.2 Die Superfamilie der TRP-Kanäle.....	13
2.2.1 Die TRPV-Unterfamilie.....	15
2.2.2 Das Kanalprotein TRPV6.....	15
2.3 Maligne Neoplasien der Prostata.....	21
2.4 Ziele dieser Arbeit.....	22
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Bezugsquellen.....	24
3.1.2 Geräte.....	24
3.1.3 Kits.....	25
3.1.4 Software, Datenbanken.....	25
3.1.5 Materialien.....	26
3.1.6 Feinchemikalien.....	26
3.1.7 H ₂ O _{steril} und DEPC-H ₂ O.....	26
3.1.8 Prostatakarzinomgewebeproben.....	27
3.1.9 Bakterienstamm.....	27
3.1.10 Nährmedien.....	28
3.1.11 Antibiotikum.....	28
3.1.12 Puffer- und weitere Lösungen.....	29
3.1.13 Modifizierende Enzyme.....	31
3.1.14 Restriktionsendonukleasen.....	31
3.1.15 Oligonukleotid-Primer.....	31
3.1.16 Sequenzgel.....	33
3.1.17 Plasmide und Konstrukte.....	34
3.2 Methoden.....	36
3.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden.....	36
3.2.2 Präparation und Transformation von kompetenten Zellen.....	36
3.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus Prostatagewebe.....	38
3.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus Wangenepithelzellen in Speichel.....	38
3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA.....	39
3.2.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Prostatagewebe.....	39
3.2.7 Erststrangsynthese aus Gesamt-RNA.....	40
3.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	41
3.2.9 Herstellung eines Größenstandards (MP-Marker).....	45
3.2.10 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus- (RFLP-) Analysen.....	45
3.2.11 Gezielte Punktmutagenese.....	46
3.2.12 DNA-Sequenzierung.....	46
3.2.13 Blau-Weiß-Test.....	49
3.2.14 Statistische Auswertung.....	50

4 Ergebnisse	51
4.1 Untersuchungen zur Beziehung zwischen den trpv6-Allelvarianten und dem Auftreten des Prostatakarzinoms	52
4.1.1 Genotypisierung von Kontrollpersonen und Prostatakarzinompatienten.....	52
4.1.2 Vergleich der trpv6-Allelfrequenzen zwischen gesunden Probanden und Prostatakarzinompatienten	68
4.1.3 Untersuchung nach Ausbreitungsgrad des Primärtumors	69
4.1.4 Untersuchung nach <i>Gleason-Score</i> des Primärtumors.....	72
4.1.5 Untersuchung nach Alter zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors	74
4.2 Untersuchung der TRPV6-Expression in Prostatakarzinomgewebe mit RT-PCR	76
4.3 Untersuchungen zur Kopplung der Polymorphismen	78
4.4 Einführung von Mutationen in die trpv6b-Sequenz	85
5 Diskussion	89
5.1 Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen den Allelvarianten trpv6a und trpv6b und dem Auftreten des Prostatakarzinoms	89
5.2 Expression von TRPV6 in Prostatakarzinomen	92
5.3 Kopplung der Polymorphismen in den Allelvarianten trpv6a und trpv6b	92
5.4 Konstruktion der TRPV6b-Mutanten G503C und G503S	93
5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick	96
6 Literaturverzeichnis.....	97
7 Publikation/ Dank.....	102
8 Lebenslauf	104

Abbildungsverzeichnis

	Seite	
2.1	Schematische Darstellung von Lage und Orientierung von TRPV6 auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q33-34).	17
2.2	Schematische Darstellung der cDNA der trpv6-Allelvarianten trpv6a und trpv6b.	18
2.3 a	Schematische Darstellung des TRPV6-Proteins.	20
b	Mögliche Anordnung von homotetrameren TRPV6-Proteinkomplexen.	20
3.1	Schematische Darstellung des pBluescript II KS- Phagemid-Vektors. (© Stratagene - La Jolla, CA, USA; http://www.stratagene.com)	35
4.1	Genotypisierung von trpv6-Allelen.	53
4.2	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP).	54
4.3	Relative Häufigkeiten der beobachteten Genotypen in der Gruppe Kontrollpersonen.	60
4.4	Relative Häufigkeiten der Genotypen in der Patientengruppe.	66
4.5	Relative Häufigkeiten der Genotypen in allen untersuchten Proben.	67
4.6	Relative Häufigkeiten aller trpv6-Genotypen bei Patienten und Kontrollpersonen.	69
4.7	Verteilung der untersuchten Prostatakarzinomgewebeprobe nach Tumorstadien.	71
4.8	Relative Häufigkeiten der beobachteten trpv6-Genotypen in Patientenproben nach Tumorstadium.	72
4.9	Relative Häufigkeiten der beobachteten trpv6-Genotypen in Patientenproben nach Gleason-Score.	74
4.10	Relative Häufigkeiten der beobachteten trpv6-Genotypen in Patientenproben nach Alter bei Prostataktomie.	75
4.11	Schematische Darstellung der Lage der Primer 776 bis 781.	77
4.12	Prinzip der RFLP-Analyse mit der Restriktionsendonuklease FauI.	78
4.13	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP).	80
4.14	Schematische Darstellung von trpv6-Allelvarianten der Probe PCA 87.	83
4.15	Schematische Darstellung der auf cDNA-Ebene isolierten Allelvarianten der Probe PCA 87.	84
4.16	Strategie für die Einführung der Mutationen M1 und M2 in die humane cDNA des trpv6b-Allels.	86
4.17	Schematische Darstellung der Strategie zur Umklonierung der Mutationen M1 und M2 in den Expressionsvektor pCAGGS-IRES-GFP_hTRPV6b_WT.	87
5.1	Schematische Darstellung der TRPV6-Mutanten G503C und G503S.	95

Tabellenverzeichnis

	Seite	
2.1	Unterfamilien der TRP-Superfamilie und die Anzahl ihrer Mitglieder bei der Maus und beim Menschen.	13
2.2	Relative Häufigkeiten der trpv6-Genotypen.	19
2.3	Prävalenz des Prostatakarzinoms in den Vereinigten Staaten von Amerika.	21
3.1	Eigenschaften des verwendeten Bakterienstammes.	27
3.2	Verwendete Oligonukleotide.	31
3.3	Eigenschaften und Verwendung der Plasmide.	34
3.4	Verwendete DNA-Polymerasen.	43
3.5	Zur Genotypisierung verwendete Restriktionsendonukleasen.	45
4.1	Genotypisierung von Kontrollpersonen.	54
4.2	Absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen in der Kontrollgruppe.	60
4.3	Ergebnis der Genotypisierung der Prostatakarzinomgewebeproben.	61
4.4	Ergebnis der Genotypisierung aller 142 untersuchten Patientenproben: absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen.	66
4.5	Absolute Häufigkeiten der Genotypen aller untersuchten Proben.	67
4.6	Beobachtete und erwartete absolute Häufigkeiten der möglichen Genotypen.	68
4.7	Absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen in den untersuchten Patientenproben nach Ausbreitungsstadium.	71
4.8	Absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen in den untersuchten Patientenproben nach Gleason-Score.	73
4.9	Absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen in den untersuchten Patientenproben nach Alter bei Prostatektomie.	75
4.10	Ergebnis der Expressionsanalyse mit RT-PCR.	77
4.11	Ergebnis der Genotypisierung der untersuchten Proben anhand des 1. Polymorphismus durch RFLP-Analyse.	80
4.12	Ergebnis der Genotypisierung der untersuchten Proben anhand des 4. und des 5. Polymorphismus durch Sequenzierung.	81
4.13	Sequenzierung von trpv6-Allelvarianten der Probe PCA 87.	82
4.14	Isolierung genomischer trpv6-Allelvarianten der Probe PCA 87.	84

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3'	3'-Ende der DNA (Hydroxylgruppe)
5'	5'-Ende der DNA (Phosphatgruppe)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Ca ²⁺	Kalziumionen
cDNA	<i>Copy-DNA</i>
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
dNTPs	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
g	1. Gramm 2. Multiplikation mit der Erdbeschleunigung ($\cdot g$)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HGPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phospho- ribosyltransferase 1
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LacZ	β -Galactosidase
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
M	molare Masse
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar, mmol/l
mmol	Millimol
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
n	Anzahl
Na^{2+}	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriummonohydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS-Puffer	<i>Phosphat-buffered-saline</i> , Phosphatpuffer
PCA	Prostatakarzinom
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	Pondus Hydrogenii
pmol	Picomol
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
STET-Puffer	Saccharose-Triton-EDTA-Tris-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T_m	Schmelztemperatur
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-Methylamin
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
TRPM	melastatinrezeptorartige TRP-Kanäle
TRPV	vanniloidrezeptorartige TRP-Kanäle
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	<i>Unit</i>
WT	Wildtyp
x-Gal	5-chloro-4-bromo-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid

1 Zusammenfassung

Kalziumionen sind an vielen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Zellproliferation, an sensorischen Prozessen wie der Wahrnehmung von Wärme und Kälte oder Geschmackqualitäten (wie süß, sauer oder umami), an der Detektion von Lichtreizen, mechanischer Stimulation oder osmotischem Stress, beteiligt. Ein möglicher Eintrittsmechanismus für Kalziumionen durch die Plasmamembran eukaryontischer Zellen ist der Einstrom durch Kanalproteine wie den Ionenkanal TRPV6. TRPV6 ist ein kalziumselektiver Ionenkanal, der durch das *trpv6*-Gen, das beim Menschen auf Chromosom 7 liegt, kodiert wird. Beim Menschen sind zwei allelische Varianten des *trpv6*-Gens bekannt, *trpv6a* und *trpv6b*. Die Transkripte dieser Varianten unterscheiden sich in 5 Basen, die einen gekoppelten Polymorphismus darstellen. Die Basenunterschiede führen zu der Änderung von drei Aminosäuren im TRPV6-Protein, so dass durch die zwei Allele die unterschiedlichen Proteine TRPV6a und TRPV6b kodiert werden. Die Frequenz der Allelvarianten ist in verschiedenen ethnischen Gruppen sehr unterschiedlich: Untersuchungen des International HapMap-Projects haben gezeigt, dass Afroamerikaner meist homozygot die *trpv6a*-Variante aufweisen, während weiße Amerikaner oder Asiaten fast ausschließlich homozygot die *trpv6b*-Variante zeigen. Interessanterweise werden Transkripte des *trpv6*-Gens in Prostatakarzinomen exprimiert, während gesunde Prostatagewebe keine nachweisbare Expression aufweisen. Da Prostatakarzinome häufiger bei Afroamerikanern auftreten als bei weißen Amerikanern oder Amerikanern asiatischer Abstammung, stellte sich die Frage, ob das *trpv6a*-Allel einen Einfluss auf das Auftreten, die Invasivität oder die Malignität des Prostatakarzinoms hat.

In dieser Arbeit konnte mit RT-PCR gezeigt werden, dass *trpv6*-Transkripte in Prostatakarzinomen nachweisbar sind. Genomische DNA wurde aus Speichelproben von gesunden Probanden und aus Prostatakarzinomgewebeproben von Patienten kaukasischer Herkunft isoliert. Die in früheren Arbeiten postulierte Kopplung der fünf Polymorphismen, die die beiden Allelvarianten definieren, konnte bestätigt werden. Mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus und Sequenzierung wurden die *trpv6*-Allele genotypisiert. Die Häufigkeiten der Genotypen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test statistisch ausgewertet.

86,8% aller untersuchten Proben enthielten homozygot die *trpv6b*-Variante. Dabei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypen zwischen den Patienten und den gesunden Probanden festgestellt werden (B/B: 88,0% vs. 85,8%). Ähnliche

Ergebnisse zeigten die Vergleiche zwischen Patienten mit lokal fortgeschrittenen und organbegrenzten Tumoren (B/B: 88,2% vs. 89,6%) und Patienten mit niedrigem Gleason-Score < 7 oder hohem Gleason Score > 7 (B/B: 83,3% vs. 90,3%). Auch hinsichtlich des Erkrankungsalters konnte zwischen Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation älter oder jünger als 60 Jahre waren, kein Unterschied in der Genotypenhäufigkeit festgestellt werden (B/B: 87,6% vs. 94,1%).

Obwohl die TRPV6-Expression mit der Malignität des Prostatakarzinoms korreliert, scheint der trpv6-Genotyp weder den Zeitpunkt des Ausbruchs der Erkrankung noch die Invasivität des Prostatakarzinoms zu beeinflussen.

1 Summary

The cation channel TRPV6: About the correlation between the allelic variants trpv6a and trpv6b and progression of prostate cancer

Many cellular processes like cell proliferation or sensory perception depend on the influx of calcium ions into cells from extracellular space or intracellular stores. There are several mechanisms for ions to enter into the cytoplasm. One mechanism is the influx through ion channels like TRPV6, a highly calcium selective channel. Two allelic variants, trpv6a and trpv6b, are coding for TRPV6a and TRPV6b proteins in humans, respectively. The distribution of these allelic variants differs in ethnic populations: African Americans show high frequencies of the trpv6a allele while trpv6b alleles are predominantly present in white Americans and Americans of Asian origin as shown by data of the International HapMap-Project. Beside placenta and pancreatic tissue, TRPV6 is expressed in locally advanced and metastatic prostatic adenocarcinoma whereas healthy prostate tissue does not show detectable level of trpv6 transcripts. Prostate cancer is a tumour with a higher prevalence in African Americans than in white Americans or in Americans of Asian origin. This finding raised the question, whether the trpv6a allele influences the onset or the progression of prostate cancer.

In the present work, we show by RT-PCR that TRPV6 is expressed in prostatic adenocarcinoma tissue. Genomic DNA was isolated from prostatic adenocarcinoma tissue and saliva from healthy controls. We show that the five single nucleotide polymorphisms defining the allelic variants trpv6a and trpv6b are coupled, as it was suggested earlier. Trpv6 alleles were genotyped by restriction length polymorphism and sequencing analysis. The data sets were analysed by Chi-Square analysis.

86.8% of the individuals showed the homozygous trpv6b-genotype. Between prostate cancer patients and healthy individuals, no difference in distribution of genotypes could be shown (B/B: 88.0% vs. 85.8%). Patients with a locally advanced prostate cancer or a Gleason-Score > 7 did not show higher trpv6a-allele frequencies than controls (B/B: 88.2% vs. 89.6%; 90.3% vs. 83.3%). The comparison of patients affected at an age younger (early-onset) or older than 60 years (late-onset) showed similar allele frequencies (B/B: 94,1% vs. 87,6%).

Although TRPV6 expression correlates with the malignancy of prostate cancer, the trpv6 genotype does not influence its onset or progression.

2 Einleitung

2.1 Kalziumionen als zelluläre Signalmoleküle

Kalziumionen (Ca^{2+}) spielen bei der Exozytose von Neurotransmittern in erregbaren Zellen, dem Kontraktionszyklus in Myozyten, der Hormonausschüttung in endokrinen Drüsen, der Immunantwort und vielen weiteren zellulären Prozessen eine wichtige Rolle als intrazelluläre Botenstoffe („*second messenger*“). Aber auch Genexpression, Zellproliferation und Apoptose werden durch Änderungen der intrazellulären Kalziumionenkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) beeinflusst (zum Überblick siehe Clapham, 1995, Carafoli, 2002).

In nicht-erregbaren Zellen beträgt die zytosolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ca. 100-200 nM, während die extrazelluläre Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) bei ca. 1-2 mM liegt. Dieser erhebliche Konzentrationsunterschied und der daraus resultierende elektrochemische Gradient werden durch Ionenpumpen (Ca^{2+} -ATPasen), Ionenaustauscher und Ionenkanäle aufrechterhalten und bei Bedarf verändert. Neben dem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol hat auch die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen bzw. Sarkoplasmatischen Retikulum (ER/ SR) eine wichtige Bedeutung bei der Änderung der zytosolischen Kalziumionenkonzentration (zum Überblick siehe Clapham, 2007).

Bei den Kalziumkanalproteinen unterscheidet man drei Gruppen (zum Überblick siehe Bootman *et al.*, 2001):

- Ligandengesteuerte Kalziumkanäle (*Receptor-operated Calcium Channels*, ROCCs), die durch die Bindung von Liganden aktiviert werden.
- Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (*Voltage-operated Calcium Channels*, VOCCs), die bei Überschreiten eines bestimmten Membranpotentials aktiviert werden.
- Speicheraktivierte Kalziumkanäle (*Store-operated Calcium Channels*, SOCCs), die in Abhängigkeit vom Füllungszustand intrazellulärer Speicher aktiviert werden.

Eine Senkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann durch die Aktivierung von Ionenpumpen in der Zellmembran (*Plasma Membrane Calcium ATPase*, PMCA) oder in der Membran des Endo- bzw. Sarkoplasmatischen Retikulums (*Sarco-/ Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*, SERCA) erreicht werden. Auch Ionenaustauscher wie der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter (*Sodium-Calcium-Exchanger*, NCX) führen zu einer Senkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (zum Überblick siehe Clapham, 2007). Zudem können freie Ca^{2+} -Ionen im Zytosol durch kalziumbindende Proteine wie

Calmodulin, Calbindin oder Calsequestrin abgepuffert werden, so dass die effektive Änderung des freien zytosolischen Kalziums verringert wird (zum Überblick siehe Clapham, 1995).

2.2 Die Superfamilie der TRP-Kanäle

Das erste Mitglied der TRP-Familie wurde bei einer Mutante der Schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*) entdeckt. Beim Ableiten eines Elektoretinogramms wurde nicht wie erwartet eine langanhaltende Antwort der Photorezeptoren auf einen Lichtreiz registriert sondern ein lediglich vorübergehender Strom (transient). Es konnte gezeigt werden, dass diese Fliege eine Mutation in einem Gen aufweist, das für die Proteinsequenz eines kalziumpermeablen Ionenkanals kodiert. Die Stromcharakteristik dieser Mutante, *Transient Receptor Potential*, war namensgebend für das trp-Protein (Minke, 1977, Montell *et al.*, 1985, Montell & Rubin, 1989, Hardie & Minke, 1992).

Im Laufe der Zeit wurden strukturell verwandte Proteine auch in anderen Organismen gefunden. So sind etwa bei der Fliege 16, beim Fisch 25, bei der Maus 28 und beim Menschen 27 TRP-Kanäle bekannt (zum Überblick siehe Flockerzi, 2007). Ein gemeinsames Merkmal der TRP-Kanäle ist die Anzahl der sechs putativen Transmembrandomänen (S1-S6), wobei die Porenregion von der extrazellulär gelegenen Aminosäureschleife zwischen den Transmembrandomänen S5 und S6 (S5-S6-Loop) gebildet wird (zum Überblick siehe Flockerzi, 2007, Venkatachalam & Montell, 2007). Die TRP-Proteine können sowohl homo- als auch heterotetramere Membranproteine bilden (Kedei *et al.*, 2001, Hoenderop *et al.*, 2003, Erler *et al.*, 2004).

Die bei Säugetieren bekannten 28 TRP-Kanäle können anhand von Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz in sechs Unterfamilien aufgeteilt werden (zum Überblick siehe Ramsey *et al.*, 2006).

Tabelle 2.1: Unterfamilien der TRP-Superfamilie und die Anzahl ihrer Mitglieder bei der Maus und beim Menschen.

Unterfamilie	Bezeichnung	Anzahl (Maus)	Anzahl (Mensch)
TRPA	„Ankyrin“	1	1

TRPC	„Canonical“ oder „Classical“	7	6
TRPM	„Melastatin“	8	8
TRPML	„Mucolipin“	3	3
TRPP	„Polycystin“	3	3
TRPV	„Vanilloid“	6	6

Den TRP-Kanälen werden unter anderem Funktionen bei der chemischen und elektrischen Reizweiterleitung im Rahmen verschiedener sensorischer Prozesse wie der Schmerz- oder Temperaturwahrnehmung (zum Überblick siehe Caterina, 2003, Clapham, 2003), bei der Regulation des Gefäßtonus (Freichel *et al.*, 2001), aber auch bei der Zellzykluskontrolle (West *et al.*, 2001) zugeschrieben.

Für einige TRP-Kanäle wurde zudem ein Zusammenhang von Mutationen in den kodierenden Genen mit resultierenden Fehlfunktionen der Proteine und dem Auftreten verschiedener Krankheiten gezeigt (zum Überblick siehe Bödding, 2007, Nilius, 2007). So ist z.B. eine Dysfunktion des Kanalproteins TRPP2 bei der autosomal-dominant vererbten Form der polyzystischen Nierenerkrankung (Typ III nach Potter) beobachtet worden (zum Überblick siehe Woudenberg-Vrenken *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte experimentell bei TRPM4-defizienten Mäusen eine Regulationsstörung der Mastzelldegranulation beobachtet werden, die eine schwere, akute allergische Reaktion verursacht (Vennekens *et al.*, 2007).

Auch bei Krebserkrankungen lässt sich ein Zusammenhang mit der Expression von TRP-Proteinen erkennen: Der Ionenkanal TRPM1 wird in den Zellen von Frühstadien maligner Melanome exprimiert, während das Ausmaß der Expression mit steigender Aggressivität des Melanoms abnimmt. Beim Prostatakarzinom kann beobachtet werden, dass der Ionenkanal TRPM8 in androgen-abhängigen Stadien exprimiert wird, während die Expression in androgen-unabhängigen Stadien, die typischerweise eine Progression des Tumorleidens mit sich bringen, zurückgeht (Prevarskaya *et al.*, 2007). Außerdem wurde beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom nachgewiesen, dass der Ionenkanal TRPV6 exprimiert wird. trpv6-Transkripte sind in gesundem Prostatagewebe nicht nachweisbar (Wissenbach *et al.*, 2001, Fixemer *et al.*, 2003).

2.2.1 Die TRPV-Unterfamilie

Die TRPV-Unterfamilie hat 6 Mitglieder. Das prominenteste Mitglied ist der unselektive Kationenkanal TRPV1, der von Caterina *et al.* als *Vanilloid Receptor Subtype 1* (VR1) bezeichnet wurde. Dieses Kanalprotein wird durch Capsaicin, einen zu den Vanilloiden gehörigen Inhaltsstoff der Chilischote, und Hitze aktiviert und ist an der Wahrnehmung noxischer Hitze beteiligt (Caterina *et al.* 1997). Auch die TRPV-Proteine TRPV2, TRPV3 und TRPV4 sind durch Hitze aktivierbar.

Die kalziumselektiven Ionenkanäle TRPV5 und TRPV6 sind weder durch Capsaicin noch durch Hitze aktivierbar, werden aber aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft zu den TRPV-Proteinen gezählt.

2.2.2 Das Kanalprotein TRPV6

Die cDNA von TRPV6 wurde aus humanem Plazentagewebe isoliert und das Protein wurde aufgrund seiner Aminosäuresequenz mit ca. 90% identischen Aminosäuren zum Kalziumkanal *CaT1*, der aus dem Duodenum der Ratte kloniert wurde (Peng *et al.*, 1999, 2000), zunächst als *CaT-like* bezeichnet (Wissenbach *et al.*, 2001).

Es zeigte sich, dass *CaT1* und *CaT-like* orthologe Genprodukte sind. Aufgrund der Sequenzhomologie zu Mitgliedern der TRPV-Familie wird heute der Begriff TRPV6 verwendet (Montell, 2002).

Das 15 Exons beinhaltende Gen *trpv6* befindet sich beim Menschen auf Chromosom 7 in direkter Nachbarschaft zum Genlocus des Ionenkanals TRPV5 mit dem es ~75% identische Aminosäuren aufweist (Hoenderop *et al.*, 1999, Peng *et al.*, 2000, 2001, Hirnet *et al.*, 2003).

Das TRPV6-Protein besteht beim Menschen aus 725 Aminosäuren und wie alle anderen TRP-Kanäle aus sechs Transmembrandomänen mit einer putativen Porenregion zwischen den Transmembrandomänen S5 und S6, wobei N- und C-Terminus intrazellulär gelegen sind (Wissenbach *et al.*, 2001; Hirnet *et al.*, 2003; Hoenderop *et al.*, 2003). Es kann homo- und mit TRPV5 heterotetramere Proteinkomplexe bilden (Erler *et al.*, 2004).

Bei niedriger $[Ca^{2+}]_i$ ist TRPV6 ein hochselektiver Kalziumkanal, dessen Strom einwärts gerichtet ist (Peng *et al.*, 1999, Hoenderop *et al.*, 2001, Wissenbach *et al.*, 2001, Bödding 2005). Bei anhaltender Hyperpolarisation der Zellmembran findet eine biphasische

Inaktivierung von TRPV6 statt, die durch Bindung von Ca^{2+} -Calmodulin bei hoher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an eine C-terminale Bindungsstelle verstärkt werden kann (Niemeyer *et al.*, 2001).

Spezifische pharmakologische Kanalblocker für TRPV6 sind nicht bekannt, jedoch wird die Kanalfunktion durch den unspezifischen Kanalblocker Ruthenium-Rot und das Antimykotikum Econazol gehemmt (Hoenderop *et al.*, 2001, Schwarz *et al.*, 2006).

Beim Menschen existieren zwei *trpv6*-Allele, die als *trpv6a* und *trpv6b* bezeichnet werden (Wissenbach *et al.*, 2001), wobei sich das *trpv6b*-Allel vermutlich aus dem evolutionär früher entstandenen *trpv6a*-Allel entwickelt hat (Stajich und Hahn, 2004, Akey *et al.*, 2006, Hughes *et al.*, 2008). Die *trpv*-Allele unterscheiden sich in fünf Nukleotiden (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs), die gekoppelte Polymorphismen darstellen, also vermutlich immer in der gleichen Kombination auftreten (Wissenbach *et al.*, 2001). Die resultierenden Proteinsequenzen unterscheiden sich zwischen TRPV6a und TRPV6b in drei Aminosäuren: R158C, V378M und T681M (Wissenbach *et al.*, 2001). In elektrophysiologischen Untersuchungen konnten keine wesentlichen funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Varianten TRPV6a und TRPV6b gezeigt werden; bei TRPV6a ließ sich allerdings eine geringer ausgeprägte Inaktivierung durch Ca^{2+} -Ionen beobachten (Hughes *et al.*, 2008).

In menschlichen Organismen können folglich mindestens drei *trpv6*-Genotypen beobachtet werden:

- Zwei *trpv6a*-Allele: homozygoter A-Genotyp, Genotyp A/A.
- Zwei *trpv6b*-Allele: homozygoter B-Genotyp, Genotyp B/B.
- Ein *trpv6a*- und ein *trpv6b*-Allel: heterozygoter Genotyp, Genotyp A/B.

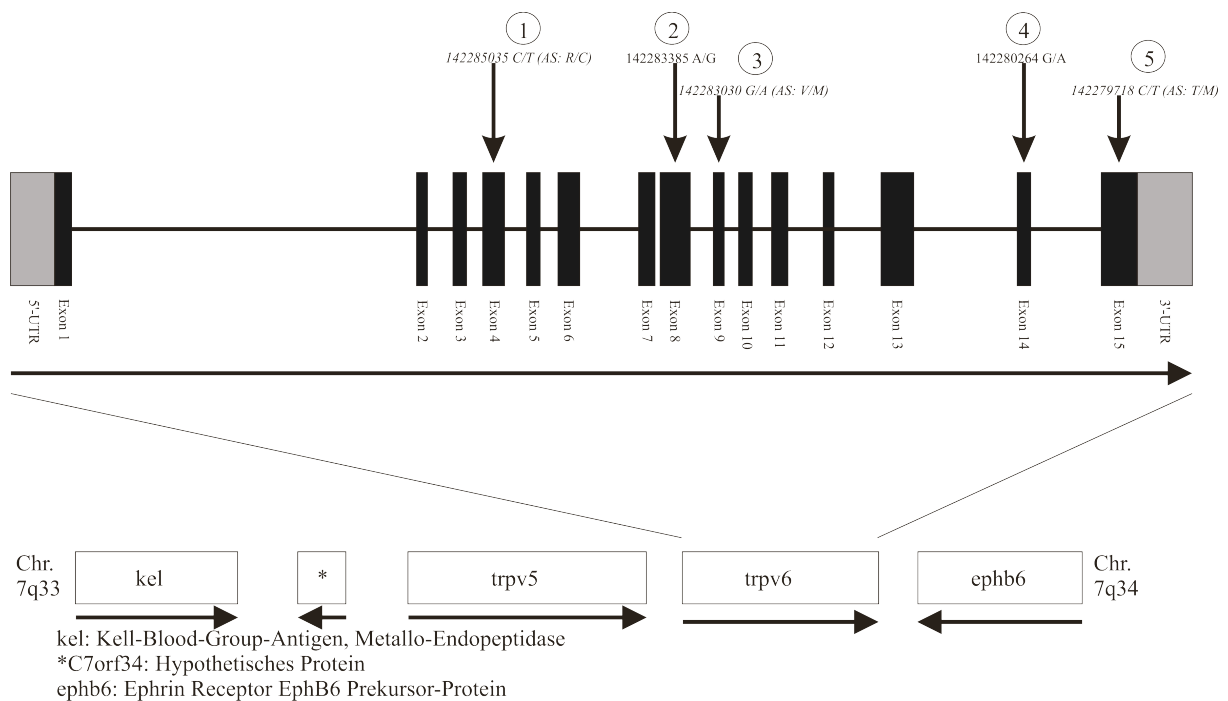


Abbildung 2.1:

Oberer Teil: Schematische Darstellung des *trpv6*-Gens auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q33-34).

Unterer Teil: Das *trpv6* Gen ist zwischen dem Gen des nächstverwandten TRP-Kanals TRPV5 und dem *Ephrin-receptor precursor*-Gen *ephB6* lokalisiert.

Beim Menschen sind zwei *trpv6*-Allele bekannt, *trpv6a* und *trpv6b*, die sich durch 5 Basenpaaraustausche unterscheiden (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs). Die in dieser Arbeit untersuchten SNPs sind von 1 bis 5 nummeriert. Die Polymorphismen 1, 3 und 5 führen zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des TRPV6-Proteins. Die von den Allelen *trpv6a* und *trpv6b* kodierten Proteine werden als TRPV6a und TRPV6b bezeichnet. (1. Base = *trpv6a*, 2. Base = *trpv6b*, Aminosäureaustausche in Klammern (AS)).

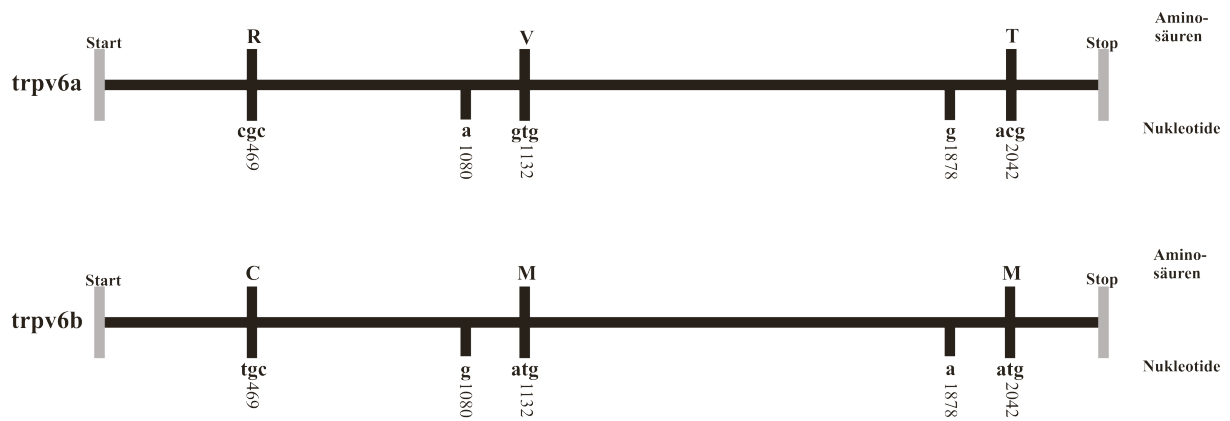


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der cDNA der trpv6-Allelvarianten trpv6a und trpv6b.

Die Allele unterscheiden sich durch fünf Basenpaaraustausche, die zu Änderungen in der Aminosäuresequenz der resultierenden TRPV6a- und TRPV6b-Proteine führen (Nummerierung der Nukleotide ausgehend vom Adenin (=1) des Startcodons).

Bei Afrikanern und Afroamerikanern kommt das trpv6a-Allel häufiger vor als in anderen Populationen (Amerikaner kaukasischer Abstammung und Asiaten; siehe Tab. 2.2, siehe auch Akey *et al.*, 2006). Die Genotypisierung von 50 Nigerianern ergab, dass 45% der Probanden homozygot trpv6a-Allele aufweisen, während in asiatischen Populationen überwiegend der homozygote trpv6b-Genotyp vorkommt (95 bzw. 97% der Probanden). Weiterhin zeigten Analysen von trpv6-Genen verschiedener Säugetiere, dass diese ausschließlich homozygot trpv6a-Allele besitzen (Wissenbach, unveröffentlichte Daten).

Diese Beobachtungen führten zur der Vermutung, dass die trpv6b-Variante in Afrika entstanden ist und sich durch positive Selektion bei der Migration der Menschen aus Afrika nach Europa und Amerika vor etwa 40.000 Jahren etabliert hat (Seojima *et al.*, 2009).

Tabelle 2.2: Relative Häufigkeiten der trpv6-Genotypen (jeweils n=30; Daten: HapMap-Projekt, www.hapmap.org).

Im Rahmen von Untersuchungen des Hapmap-Projekts wurden Polymorphismen innerhalb des trpv6-Gens von vier ethnischen Populationen identifiziert. Die trpv6-Sequenzen wurden von mir hinsichtlich der Polymorphismen analysiert.

Population	homozygot A	heterozygot	homozygot B
Amerikaner (Utah)	0%	12%	88%
Afrikaner, Yoruba (Nigeria)	43%	42%	15%
Chinesen, Peking	0%	3%	97%
Japaner, Tokio	0%	5%	95%

Beim Menschen wird TRPV6 in der Plazenta, im Pankreas und in Speicheldrüsen exprimiert (Wissenbach *et al.* 2001). Außerdem konnte eine Expression in maligne entartetem Prostatagewebe, nicht aber in gesundem oder benigne hyperplastischem Prostatagewebe (*Benign Prostate Hyperplasia*, BPH), nachgewiesen werden (Wissenbach *et al.*, 2001, 2004, Fixemer *et al.*, 2003). Da man bei Amerikanern afrikanischer Abstammung eine deutliche erhöhte Prävalenz (2-3fach) für Prostatakrebs (siehe Tab. 2.3, Crawford, 2003) im Vergleich zu Amerikanern europäischer oder asiatischer Herkunft vorfindet, stellt sich die Frage, ob die erhöhte Prävalenz durch den trpv6-Genotyp beeinflusst wird bzw. ob das vermehrte Auftreten von trpv6a-Allelen in Afrikanern/Amerikanern afrikanischer Herkunft mit der erhöhten Prostatakrebs-Prävalenz korreliert.

Der Nachweis von trpv6-Transkripten in verschiedenen maligne entarteten Geweben (Wissenbach *et al.*, 2001, 2004; Zhuang *et al.*, 2002; Fixemer *et al.*, 2003; Bolanz *et al.*, 2008) gibt Freiraum für Spekulationen über die Rolle von TRPV6 in der Tumorbilogie. Schwarz *et al.* (2006) konnten experimentell einen verstärkenden Einfluss von TRPV6 auf die Proliferation von Zellen und Lehen'kyi *et al.* (2007) auf die Proliferation speziell von Prostatakarzinomzellen nachweisen.

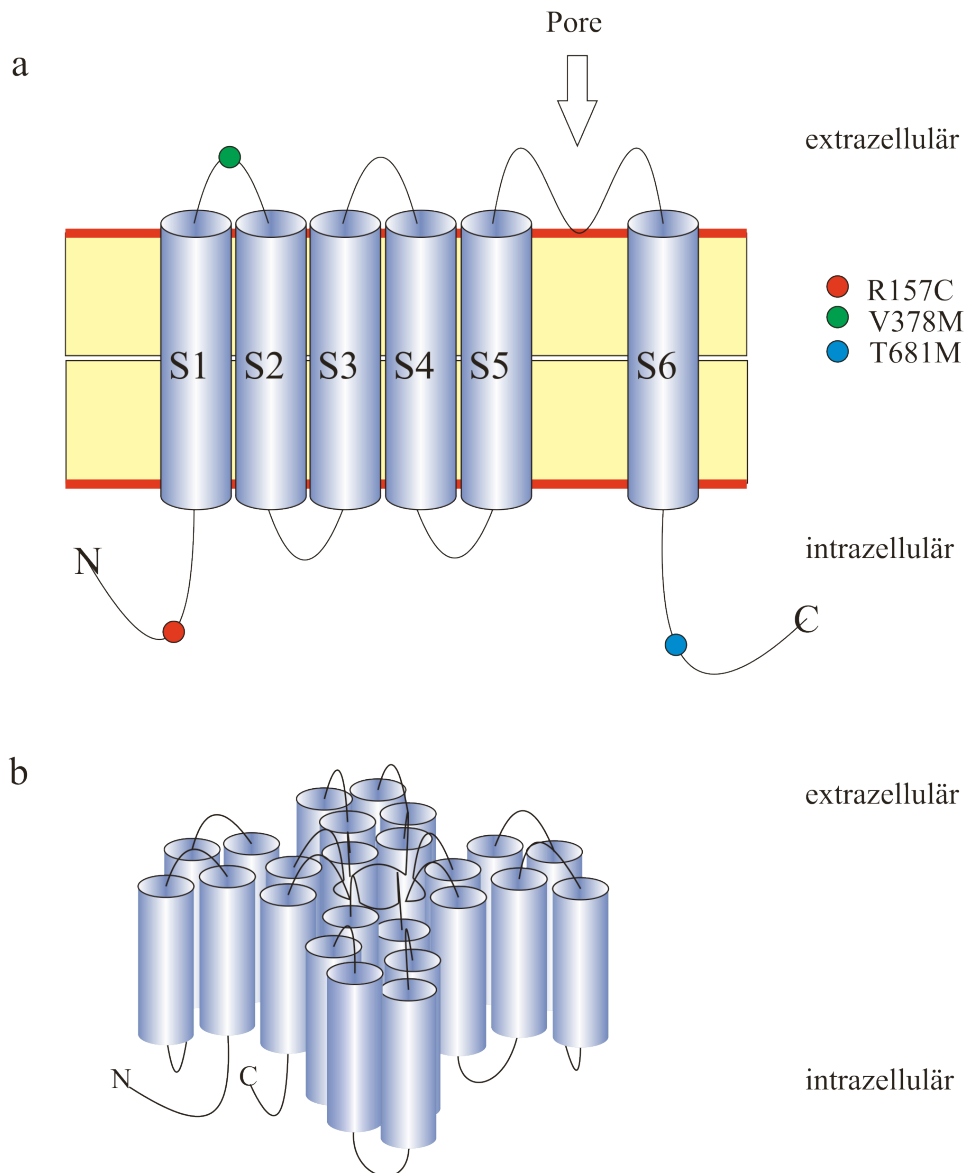


Abbildung 2.3:

a) Schematische Darstellung des TRPV6-Proteins.

Farbige Kreise markieren drei Aminosäureaustausche, die sich in den allelischen TRPV6-Varianten TRPV6a und TRPV6b unterscheiden und aus den Nukleotidpolymorphismen 1, 3 und 5 resultieren (siehe Abb. 2.2); die Zahl gibt die AS-Position an; vor der Ziffer die AS in TRPV6a, hinter der Ziffer die AS in TRPV6b.

b) Mögliche Anordnung von homotetrameren TRPV6-Proteinkomplexen (C = C-Terminus, N = N-Terminus).

2.3 Maligne Neoplasien der Prostata

Die Prostata ist eine Drüse im männlichen Urogenitaltrakt, deren Funktion hauptsächlich in der Produktion von Bestandteilen der Samenflüssigkeit besteht.

Man unterscheidet gutartige und bösartige Tumoren der Prostata. Die Benigne Prostatahyperplasie (BPH) stellt eine gutartige Vergrößerung der Prostata dar, während das Prostatakarzinom durch das Vorhandensein entarteter Zellen gekennzeichnet ist. Vorstufen des Prostatakarzinoms werden als intraepitheliale Neoplasien bezeichnet (*Prostatic Intraepithelial Neoplasia*, PIN).

Das Prostatakarzinom ist einer der häufigsten bösartigen Tumoren des älteren Mannes und eine der häufigsten Todesursachen in Industrienationen. Bei bis zu 64% der Männer zwischen 60 und 70 Jahren liegen Prostatakarzinome vor (Sakr *et al.*, 1994). Als Ursachen sind neben diätetischen, hormonellen und soziokulturellen Faktoren Suszeptibilitätsgene bekannt, die die Bereitschaft, ein Prostatakarzinom zu entwickeln, erhöhen können (zum Überblick siehe De Marzo *et al.*, 2003, Nelson *et al.*, 2003).

Das Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken, variiert stark zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen. Am höchsten ist es bei schwarzen Amerikanern während es bei Amerikanern asiatischer Abstammung am niedrigsten ist (Hsing *et al.*, 2000; Crawford, 2003). Der Einfluss von Umweltfaktoren wie Ernährung oder Noxen wird deutlich, wenn man berücksichtigt, dass das Risiko von asiatischen Immigranten an Prostatakrebs zu erkranken sich im Laufe der in den USA verbrachten Lebenszeit an das Risiko der Einheimischen annähert (Haenszel & Kurihara, 1968, Shimizu *et al.*, 1991, Whittemore *et al.*, 1995).

Tabelle 2.3:

Prävalenz des Prostatakarzinoms in den Vereinigten Staaten von Amerika (Crawford, 2003).

Gruppe	Prävalenz (pro 100.000 Einwohner)
- afrikanische Abstammung	275,3
- weiße Amerikaner	172,9
- hispanische Abstammung	127,6
- asiatische Abstammung	107,2

Therapieoptionen zur Behandlung des Prostatakarzinoms sind die operative Entfernung der maligne entarteten Drüse (*radikale Prostatektomie*) und befallener Lymphknoten,

verschiedene Formen der Radiotherapie und die Androgenentzugstherapie (Damber & Aus, 2008). Alle diese Verfahren gehen mit Einschränkungen der Lebensqualität einher, die vor allem die sexuelle Aktivität und die Kontinenz betreffen (Damber & Aus, 2008; Sanda *et al.*, 2008). Problematisch ist, dass bei Patienten mit Prostatakarzinomen im Frühstadium meist keine Symptome auftreten, diese Patienten jedoch oftmals massiv unter den Folgen der Therapie leiden (Talcott *et al.*, 1998). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Patienten, die sich einer radikalen Prostatektomie unterzogen, eine bessere Prognose hatten als Patienten, die keine Therapie erhielten und lediglich engmaschig beobachtet wurden (Bill-Axelsson *et al.*, 2005).

Aus diesen Gründen wäre es wünschenswert abschätzen zu können, in welcher Art und Weise und mit welcher Geschwindigkeit sich ein Prostatakarzinom entwickeln wird. Bislang gibt es jedoch keinen verlässlichen Marker, der das Wachstumsverhalten eines Prostatakarzinoms individuell vorhersagen kann, weshalb die Entscheidung für die Durchführung und die Art der Therapie vom Ausbreitungsgrad des Tumors und von der restlichen Lebenserwartung des betroffenen Patienten abhängig gemacht wird (Heidenreich *et al.*, 2008). Auch die Serumkonzentration des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) kann lediglich eine Hilfestellung geben, da eine Erhöhung dieses Wertes zwar sehr sensitiv Erkrankungen der Prostata anzeigen, nicht aber spezifisch zwischen verschiedenen möglichen Erkrankungen wie Entzündungen oder tumorösen Veränderungen diskriminieren kann.

2.4 Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die Rolle des kalziumselektiven Kationenkanals TRPV6 im Rahmen der Entstehung von malignen Neoplasien der Prostata zu verstehen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es dabei zu überprüfen, ob das Auftreten von trpv6a-Allelen im Menschen mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung eines Prostatakarzinoms korreliert.

Grundlagen für diese Untersuchungen sind folgende Beobachtungen:

Transkripte des trpv6-Gens werden in Prostatakarzinomzellen gebildet, sind jedoch nicht in gesunden Prostatazellen oder in Zellen benigner Prostataveränderungen nachweisbar. Das Auftreten von trpv6-Transkripten korreliert dabei mit der Malignität des Prostatakarzinoms (Fixemer *et al.*, 2003).

Im Menschen sind zwei verschiedene Allele des trpv6-Gens, trpv6a und trpv6b, bekannt. Im Vergleich mit Kaukasiern haben Afrikaner und Afroamerikaner eine erhöhte trpv6a-Allelfrequenz. Bei Afroamerikanern werden außerdem häufiger Prostatakarzinome beobachtet als bei Kaukasiern. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Frage, ob das vermehrte Auftreten von trpv6a-Allelen in Afroamerikanern mit der erhöhten Prostatakarzinom-Prävalenz korreliert.

In Kaukasiern wurde durch Genotypisierung der trpv6-Allele festgestellt, dass ca. 90% der Bevölkerung homozygot trpv6b-Allele (B/B) aufweisen, während ca. 9.9% den heterozygoten Genotyp (A/B) aufweisen. Der homozygote trpv6a-Genotyp (A/A) kommt bei Kaukasiern außerordentlich selten vor. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Prostatakarzinompatienten kaukasischer Herkunft eine höhere trpv6a-Allelfrequenz aufweisen als gesunde männliche Kontrollpersonen.

Außerdem wurde in dieser Arbeit überprüft, ob das Vorliegen von trpv6a-Allelen als Risikofaktor für organüberschreitendes Wachstum, höhere Malignität oder frühes Erkrankungsalter angesehen und somit als Marker zur Therapieentscheidung genutzt werden kann.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich trpv6-Transkripte in Prostatakarzinomgeweben mit RT-PCR nachweisen lassen und ob sich die Kopplung der fünf in den Exons gelegenen Nukleotidpolymorphismen, die die Zugehörigkeit zu den Alleltypen trpv6a oder trpv6b definieren, bestätigen lässt.

TRPV6a- und TRPV6b-Proteine sind kalziumselektive Ionenkanäle, die sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften nicht signifikant unterscheiden. Das trpv6b-Allel und somit das TRPV6b-Protein werden vermutlich aufgrund von Selektionsdruck häufiger in vielen ethnischen Gruppen gefunden als das trpv6a-Allel und entsprechend das TRPV6a-Protein. Um gegebenenfalls vorhandene elektrophysiologische Unterschiede zwischen TRPV6a- und TRPV6b-Proteinen zu demaskieren wurden zwei TRPV6b-Varianten erzeugt, die sich durch Punktmutationen unterscheiden, die zu einer konstitutiven Öffnung des Kanals führen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bezugsquellen

Accelrys Software Inc. (San Diego, USA)	Merck (Darmstadt, D)
Amersham Pharmacia Biotec (Freiburg, D)	MWG Biotech (Ebersberg, D)
Applied Biosystems (Foster City, USA)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
BD Biosciences (Bedford, USA)	New Brunswick Scientific (Edison NJ, USA)
Beckman (München, D)	Operon (Köln, D)
Biozym (Hessisch Oldendorf, D)	PeqLab Biotechnologie (Erlangen, D)
Corel Corporation (Ottawa, CDN)	Qiagen (Hilden, D)
Eppendorf (Hamburg, D)	Roth (Karlsruhe, D)
Fermentas (St. Leon-Rot, D)	Sarstedt (Nürnbrecht, D)
Gilson (Middleton WI, USA)	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation (Barsbüttel, D)
Greiner Bio One (Frickenhausen, D)	Sigma (Deisenhofen, D)
Heidolph Instruments (Schwabach, D)	Stratagene (Heidelberg, D)
Invitrogen (San Diego, USA)	Whatman (Brentford, UK)
Kinematica (Luzern, CH)	
Li-Cor (Lincoln, USA)	

3.1.2 Geräte

Autoklav:	Tuttnauer 3870 ELV
Dispergiergerät:	Polytron PT 1200 (Kinematica)
DNA-Sequenziergeräte:	ABI Prism 310 Sequenzer (Applied Biosystems) LI-COR DNA-Sequenzier 4200 (LI-COR Inc.)
Geldokumentationssystem:	Herolab E.A.S.Y. Win32
Gelelektrophorese-Apparaturen:	Eigenbau (M. Simon-Thomas)
Pipetten:	Pipetman (Gilson)
Photometer:	Gene quant II (Pharmacia Biotech)
Reinstwassersystem:	Reinstwassersystem Clear plus (SG)

Wasseraufbereitung und Regenerierstation)

Rührer:	Heidolph MR 3002
Thermocycler:	ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
UV-Tisch:	Transilluminator 4000 (Stratagene)
Schüttelinkubator:	Scientific Series 25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)
Zentrifugen:	Tischzentrifuge Heraeus pico J2-HS centrifuge (Beckman) 96-well-Plattenzentrifuge 4-15c (Sigma)

3.1.3 Kits

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
peqGold RNA Pure (peqLab Biotechnologie)
SuperScript II for RT-PCR (Invitrogen)
ABI Prism Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems)
Thermosequense Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotec)

3.1.4 Software, Datenbanken

Abbildungen:	Corel Draw X4 (Corel Corporation)
DNA-Sequenzierung:	310 Data Collection Software (Applied Biosystems) Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems) Accelrys Gene (Accelrys Software Inc.)
Genomdatenbanken:	Ensembl Genome Browser (http://www.ensembl.org)

Literaturrecherche: International HapMap Project
(<http://www.hapmap.org>)
PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.1.5 Materialien

Dialyseschläuche: Dialysis Tubing MWCO 12000 (Sigma)
PCR-Spitzen: Filter Tip FT 20, 200, 1000 (Greiner Bio One)
H₂O_{HPLC} für DNA-Sequenzierung: LiChrosolv (Merck)
96-well-Lochplatten mit Filtrationseinheit: Whatman Microplate Devices Unifilter
(Whatman)
Petrischalen: 94 x 16 mm (Greiner Bio One)
Sepharose für 96-well-Lochplatten: SephadexTM G50 (Amersham Pharmacia Biotec)
Sterile Einmalgefäße: Falcon (BD Biosciences)
Plastikröhrchen mit Schraubverschluss (Greiner
Bio One)
Sterile Einmalpipetten: Serological pipettes (Sarstedt)

3.1.6 Feinchemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Feinchemikalien hatten analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Firmen Sigma, Roth und Merck bezogen.

3.1.7 H₂O_{steril} und DEPC-H₂O

Es wurde für alle Arbeiten, wenn nicht anders angegeben, H₂O verwendet, das durch ein Reinstwassersystem deionisiert und für 20 min bei 2,1 bar und 121 °C dampfsterilisiert wurde (H₂O_{steril}).

Für die Isolation, Lagerung und Verarbeitung von RNA ist die Verwendung von H₂O_{steril} nicht zweckmäßig, da es Enzyme enthalten kann, die RNA-Moleküle hydrolysieren (RNasen). Aus diesem Grund wurde H₂O_{steril} mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt (DEPC-H₂O). DEPC

modifiziert Histidylreste von Proteinen durch das Anhängen einer Carboxy-Gruppe. Durch diese Modifikation werden RNasen inaktiviert.

DEPC-H₂O:

0,1% (v/v) DEPC-Lösung (10 mM)

Der Ansatz wurde unter Rühren bei Raumtemperatur 12-16 h inkubiert. Anschließend wurde DEPC-H₂O zur Inaktivierung von DEPC zweimal 20 min bei 2,1 bar und 121 °C dampfsterilisiert.

3.1.8 Prostatakarzinomgewebeprobe

Die Prostatakarzinomgewebeprobe wurden vom Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes (Prof. Dr. Grobholz, Direktor: Prof. Dr. med. Bohle) bereitgestellt. Alle Experimente wurden durch die Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes (Saarbrücken, Deutschland) genehmigt.

Bei allen untersuchten Gewebeprobe war histopathologisch die Diagnose eines Adenokarzinoms der Prostata gestellt worden. Bei 100 Proben waren zudem Ausbreitungsgrad, Differenzierungsmuster und weitere Patientendaten bekannt. Die Diagnose und tumorspezifische Parameter wurden durch die ärztlichen Mitarbeiter des Institutes für Allgemeine und Spezielle Pathologie bestimmt.

Die Gewebeprobe wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.1.9 Bakterienstamm

Für diese Arbeit wurde der *E. coli* Bakterienstamm XL 1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet.

Tabelle 3.1: Eigenschaften des verwendeten Bakterienstammes.

Genotyp	<i>recA1, endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, L⁻, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' proAB, lacI^qZΔM15 Tn10 (Tetr^r)]</i>
Verwendung	<ul style="list-style-type: none"> • Subklonierung von DNA-Sequenzen • Blau-Weiß-Test

- | | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none">• Quick-Change-Mutagenese |
|--|---|

3.1.10 Nährmedien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, 20 min bei 121 °C autoklaviert und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

LB-Medium als Flüssigkultur, pH 7,5:

1% (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
1% (w/v)	NaCl

LB-Agar:

1,5% (w/v)	Agar
ad 1000 ml	LB-Medium

Das Gemisch aus flüssigem LB-Medium und festem Agar wurde für 20 min bei 2,1 bar und 121 °C dampfsterilisiert, wodurch der Agar im LB-Medium gelöst wurde. Unter Rühren wurde der flüssige LB-Agar auf 55 °C abgekühlt, um bei Bedarf Ampicillin zuzugeben. Anschließend wurde der noch flüssige LB-Agar in Petrischalen gegossen und bis zu seiner Verfestigung bei Raumtemperatur abkühlen lassen. Die Petrischalen mit LB-Agar wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.11 Antibiotikum

In dieser Arbeit wurde das β -Lactam-Antibiotikum Ampicillin verwendet, das durch seine Bindung an Penicillin-bindende-Proteine die Zellwandsynthese und damit das Bakterienwachstum in der logarithmischen Phase hemmt.

Zur Herstellung der Stocklösung wurde Ampicillin in H_2O_{steril} gelöst und die Lösung steril in 1,5 ml-Eppendorfgefäße filtriert. Bis zur Verwendung wurde die Stocklösung bei -20 °C aufbewahrt.

Konzentration in der Stocklösung	50 ng/ ml
Endkonzentration im Medium	50 ng/ l

3.1.12 Puffer- und weitere Lösungen

EDTA-Lösung (0,5 M), pH 8,0:

0,5 M Na₂-EDTA

APS-Lösung (APS-Lösung, 30%):

30% (w/v) APS

Jeweils 100 µl der APS-Lösung wurden in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß aliquotiert. Bis zu ihrer Verwendung wurde die APS-Lösung bei -20 °C aufbewahrt.

Auftragspuffer (10x):

0,25% (w/v) Bromphenolblau
 50 mM EDTA-Lösung (pH 8,0)
 40% (w/v) Glycerin, wasserfrei
 40% (w/v) Harnstoff
 10 mM Tris-HCl (pH 7,0)
 0,25% (w/v) Xylencyanol FF

Jeweils 500 µl des Auftragspuffers wurden in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Bis zu seiner Verwendung wurde der Auftragspuffer bei Raumtemperatur aufbewahrt.

LysozymbLösung:

10% (w/v) Lysozym

Die LysozymbLösung wurde vor jeder Verwendung frisch angesetzt und auf Eis gelagert.

STET-Puffer für Plasmid-Isolierung (Boiling Lysis):

50 mM EDTA (pH 8,0)
 8% (w/v) Saccharose
 50 mM Tris (pH 8,0)
 5% (v/v) Triton X-100

Vor der Verwendung wurde ein dem Bedarf entsprechendes Volumen in ein steriles Gefäß überführt. Pro ml STET-Puffer wurden 10 µl LysozymbLösung zugegeben (STETL-Puffer).

TBE-Puffer (10x), pH 8,0:

0,89 M	Borsäure
0,02 M	EDTA (pH 8,0)
0,89 M	Tris-HCl

TSS-Puffer:

5% (v/v)	DMSO
50 mM	MgCl ₂
<u>10% (w/v)</u>	<u>Polyethylenglykol 3350</u>
ad 50 ml	steriles LB-Medium

Der TSS-Puffer wurde vor der Verwendung jeweils frisch angesetzt.

PBS-Puffer, pH 7,4:

138 mM	NaCl
8,09 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
2,68 mM	KCl
1,46 mM	KH ₂ PO ₄

X-gal-Lösung, 2% (w/v):

<u>2 mg</u>	<u>X-gal</u>
ad 1 ml	Dimethylformamid

IPTG-Lösung, 20% (w/v):

<u>20 mg</u>	<u>IPTG</u>
ad 1 ml	H ₂ O _{steril}

Blau-Weiß-Test-Lösung:

40 µl	X-gal-Lösung
<u>7 µl</u>	<u>IPTG-Lösung</u>
ad 150 µl	H ₂ O _{steril}

Die Blau-Weiß-Test-Lösung und ihre Komponenten wurden vor jeder Verwendung frisch angesetzt.

PCR-Reaktions-Puffer (Taq-Puffer, 10x):

500 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
100 mM	Tris-HCl

Der PCR-Reaktions-Puffer wurde in 1,5 ml-Eppendorfgefäße aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.13 Modifizierende Enzyme

Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Phusion High-Fidelity-Polymerase	Finnzymes (New England Biolabs)
RNase A	Sigma
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Eigenherstellung, S. Buchholz

3.1.14 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen (AclI, Bsp1286I, EcoRV, FauI, MfeI) wurden von New England Biolabs bezogen.

3.1.15 Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden von MWG Biotech oder Operon bezogen.

Tabelle 3.2: Verwendete Oligonukleotidprimer (Pho-: am 5'-phosphorylierte Primer; IRD-: 5'-IRD800 markierte Primer).

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck	T _m (°C)
243	CACGATGTGCTGCATCTA	Genotypisierung (TRPV6)	59,4
244	CAATGACAGTCACCAGCTCC	Genotypisierung (TRPV6)	59,4
430	ATGGACTCTGAGCTCTATGAGG	Genotypisierung (TRPV6)	60,3

431	CCCACATCTCAGCTCAGG	Genotypisierung (TRPV6)	58,2
763	(Pho-) TCTGCGGACGGGAGTATG	Genotypisierung (TRPV6)	62,2
764	(Pho-) GAAGCCTTTCCCAATTGGC	Genotypisierung (TRPV6)	60,2
776	(Pho-) CTGGCCTCGGCCTCAGG	Expressionsanalyse (TRPV6)	66,8
777	(Pho-) CTAGAAGGAGAGGAGACTCC	Expressionsanalyse (TRPV6)	62,5
778	(Pho-) CACGGTGATGCTGGAGCG	Expressionsanalyse (TRPV6) Genotypisierung (TRPV6)	64,5
779	(Pho-) CCAGGAAGCGAAGTGAGAAC	Expressionsanalyse (TRPV6) Genotypisierung (TRPV6)	62,5
780	(Pho-) CGTCTGAAGCGCACGTCC	Expressionsanalyse (TRPM4)	64,5
781	(Pho-) CTTGAAGTCCGCCAGCAGG	Expressionsanalyse (TRPM4)	64,5
637	GCTCGAGATGTCATGAAGG	Expressionsanalyse (HGPRT1)	60,2
638	AGTTGAGAGATCATCTCCACC	Expressionsanalyse (HGPRT1)	60,6
771	GGATTCCAGATGCTA <u>T</u> GCCCCT TCACCATCATG	Mutation G503C (TRPV6)	70,9
772	CATGATGGTGAAGGGG <u>C</u> ATAG CATCTGGAATCC	Mutation G503C (TRPV6)	70,9
773	GGATTCCAGATGCTA <u>A</u> GCCCCT TCACCATCATG	Mutation G503S (TRPV6)	70,9
774	CATGATGGTGAAGGGG <u>C</u> TAG CATCTGGAATCC	Mutation G503S (TRPV6)	70,9
Fv79 UW	CACGACGTTGTAAAACGACG	Vektorprimer pBluescript KS- (forward)	60,4
Fv80 UW	CACAGGAAACAGCTATGACC	Vektorprimer pBluescript KS- (reverse)	60,4
pCAGGS forUW	AACGTGCTGGTTGTTGTGC	Vektorprimer pCAGGS- IRES-GFP (forward)	60,16

pCAGGS revUW	CATATAGACAAACGCACACC	Vektorprimer pCAGGS- IRES-GFP (reverse)	58,35
UWi213	(IRD-) CAACCGGCAGCGGATCC	Sequenzierung Konstrukte M1 und M2	
UWi221	(IRD-) AGCCTCAAGTGGGAAGCGG	Sequenzierung Konstrukte M1 und M2	58,2
UWi222	(IRD-) CAGTGTGGCGATGATGGC	Sequenzierung Konstrukte M1 und M2	58,2
UWi228	(IRD-) TGACCATGGTGATGCGGC	Sequenzierung Konstrukte M1 und M2	58,2
UWi229	(IRD-) TACATGACGTTGCACCAG	Sequenzierung Konstrukte M1 und M2	56,7
UWi230	(IRD-) CTGGGCTTTGCTTCAGCC	Sequenzierung Konstrukte M1 und M2	58,2

3.1.16 Sequenzgel

Sequenzlösung für LI-COR:

300 ml Acrylamid (40%)
200 ml TBE-Puffer (10x, pH 8,0)
840 g Harnstoff
ad 2000 ml H₂O_{steril}

Die Sequenzlösung wurde unter Rühren erhitzt und in eine lichtdichte Glasflasche filtriert.
Bis zu ihrer Verwendung wurde sie bei 4 °C gelagert.

Ansatz des Sequenzgels:

80 µl APS-Lösung
50 ml Sequenzlösung
17,5 µl TEMED

3.1.17 Plasmide und Konstrukte

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle. Sie werden in Wirtszellen unabhängig vom bakteriellen Chromosom repliziert und können unter bestimmten Bedingungen zwischen den Wirtszellen ausgetauscht werden. In der Molekularbiologie sind sie unter anderem dazu geeignet, Gensequenzen in Bakterien nach der Transformation zu vermehren oder Proteine zu exprimieren.

Für diese Arbeit wurden die Plasmide pBluescript II Phagemid KS- (Stratagene), pcDNA3 (Invitrogen), pCAGGS-IRES-GFP (Wamat *et al.*, 1999) und pUC18 (Fermentas) verwendet.

Tabelle 3.3: Eigenschaften und Verwendung der Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften (u.a.)	Verwendung
pBluescript II Phagemid KS-	<ul style="list-style-type: none"> • β-Galactosidase-Sequenz (<i>lacZ'</i>) • MCS • T7 Promotor • T3 Promotor • <i>Lac</i>-Promotor • pUC Origin of replication • Ampicillin-Resistenz • f1 (-) origin of ss-DNA replication 	Klonierung von DNA-Sequenzen zur Genotypisierung
pcDNA3	<ul style="list-style-type: none"> • CMV-Promotor • MCS • Neomycin-Resistenz • Ampicillin-Resistenz 	Quick-Change-Mutagenese von TRPV6b
pCAGGS-IRES-GFP	<ul style="list-style-type: none"> • IRES-Sequenz • GFP-Sequenz • Ampicillin-Resistenz 	Klonierung der TRPV6b-Mutanten G503C und G503S zur Expression in HEK293-Zellen
pUC18	<ul style="list-style-type: none"> • Ampicillin-Resistenz • <i>lacZ</i>-Gen 	Bestimmung der Transformationskompetenz

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit zwei Konstrukte verwendet, die bereits in unserer Arbeitsgruppe vorhanden waren:

pcDNA3_hTRPV6b_WT (Wissenbach)

pCAGGS-IRES-GFP_hTRPV6b_WT (Wissenbach)

pBluescript II KS (+/-) Phagemids

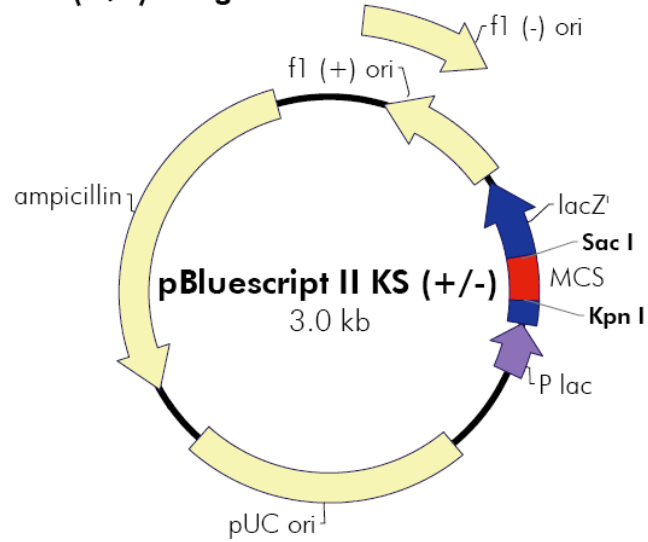


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des pBluescript II KS- Phagemid Vektors.

Die MCS liegt innerhalb der lacZ'-Sequenz.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Folgende Methoden wurden wie von Sambrook *et al.* (2001) beschrieben durchgeführt:

- Präzipitation von Nukleinsäuren und
- deren elektrophoretische Auftrennung in Polyacrylamid- und Agarosegelen.
- Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.
- Dephosphorylierung geschnittener Plasmid-Vektoren.
- Ligation von DNA- und cDNA-Fragmenten in Vektoren.
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.

3.2.2 Präparation und Transformation von kompetenten Zellen

Präparation (modifiziert nach Chung *et al.*, 1989):

Tag 1 Es wurden Zellen aus der Bakterienstammkultur *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene) mit einer sterilen Impföse auf einer Agarplatte ohne Anitbiotika-Zusatz aufgetragen. Die Platte wurde über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Tag 2 Ein Vorkulturröhrchen mit 5 ml LB-Medium wurde mit einer Kolonie dieser Platte beimpft. Der Kolben wurde für 12-16 h bei 37 °C und 200 U/ min geschüttelt. Die Platte wurde verschlossen bei 4 °C aufbewahrt, um bei Bedarf zu einem späteren Zeitpunkt weitere Kolonien ernten zu können.

Tag 3 Kolben mit 100 ml LB-Medium wurden mit der Bakterienkultur des Vortages angeimpft. Diese Kolben wurden bei 37 °C und 200 U/ min so lange geschüttelt, bis die Bakterienzellen bei einer Wellenlänge von 600 nm eine OD von 0,35-0,4 erreicht hatten.

Dann wurden die Bakterienkulturen in einem auf 4 °C vorgekühlten Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 1000 · g zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 15 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert und jeweils 300 µl der Suspension wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäße aliquotiert.

Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Transformationskompetenz verwendet. Die restlichen Aliquots wurden unverzüglich in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Transformation (modifiziert nach Cohen *et al.*, 1972):

Tag 1 Ein 300 µl-Aliquot der transformationskompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde das entsprechende Plasmid oder Konstrukt zugegeben und der Reaktionsansatz auf Eis 30 min inkubiert.

Danach wurde der Ansatz 1 min bei 42 °C inkubiert und 5 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C und 200 U/ min geschüttelt.

100 µl des Transformationsansatzes wurden auf eine ampicillinhaltige LB-Agarplatte ausplattiert, der Rest wurde 5 min bei 3000 · g zentrifugiert. Am Boden des Gefäßes bildete sich ein Bakteriensediment, das nach Dekantieren des Überstandes in 100 µl LB-Medium resuspendiert wurde. Diese 100 µl wurden auf eine weitere ampicillinhaltige LB-Agar-Platte ausplattiert. Beide Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Tag 2 Vorkulturröhrchen mit 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium wurden mit je einer Kolonie der Platten angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 U/ min geschüttelt.

Tag 3 1 ml der Vorkultur konnte zur Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA verwendet werden. Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde ein Kolben mit 200 ml ampicillinhaltigem LB-Medium mit 200 µl der Vorkultur angeimpft und der Kolben über Nacht bei 37 °C und 200 U/ min geschüttelt.

Tag 4 200 ml der Bakterienkultur konnten zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA verwendet werden.

Bestimmung der Transformationskompetenz:

Tag 1 Ein Aliquot der transformationskompetenten Zellen wurde mit 10-50 ng des Plasmids pUC 18 transformiert. Von diesem Ansatz wurden wiederum drei Verdünnungen hergestellt (1:10, 1:100 und 1:1000) und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tag 2 Die Anzahl der Kolonien auf den Platten wurde bestimmt und die Transformationskompetenz nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Transformanden}}{\mu\text{g DNA}} = n \cdot F \cdot \frac{Vg}{Vx} \cdot \frac{1}{m}$$

n = Zahl der Kolonien

F = Verdünnungsfaktor

V_g = Transformationsansatz, Gesamtvolumen

V_x = ausplattiertes Volumen

m = Menge des verwendeten Plasmids

Es wurden Werte zwischen 10^6 - 10^7 Transformanden/ μg DNA erreicht.

3.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus Prostatagewebe

Zur Isolierung der genomischen DNA wurden etwa 50 mg Gewebe mit einem Skalpell aus den Gewebeproben herausgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt um die Lyse des Gewebes zu erleichtern.

Im Anschluss wurde die genomische DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach den Vorgaben des Herstellers (Protokoll für Gewebe) isoliert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zu ihrer weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus Wangenepithelzellen in Speichel

Zur Isolierung genomischer DNA aus Wangenepithelzellen wurde der QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) verwendet und das Protokoll für DNA-Isolierung aus Blut entsprechend modifiziert:

Nach mechanischer Lösung von Wangenepithelzellen durch Aufbau von Unterdruck in der Mundhöhle wurde 1 ml Speichel in einem sterilen Falcon-Röhrchen aufgenommen. Nach der Zugabe von 4 ml PBS-Puffer wurde das Röhrchen 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert und der wässrige Überstand abgezogen.

Das Sediment am Boden des Röhrchens wurde in 180 μl PBS-Puffer resuspendiert und in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden 20 μl Proteinase K und 200 μl AL-Puffer, beides Bestandteile des oben genannten Kits, zugegeben. Der Ansatz wurde 15 s durch Schütteln gemischt und 10 min bei $56\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Danach wurden 200 μl Ethanol (100%) zugegeben und die Lösung auf die QIAamp-Spin-Säule überführt. In weiteren Schritten wurde die DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde durch die *Boiling Lysis*-Methode (Holmes & Quigley, 1981) isoliert. Diese Methode ist eine kostengünstige und einfache Möglichkeit, geringe Mengen Plasmid-DNA zu isolieren. Die hierbei isolierte DNA kann jedoch nicht zur Sequenzierung mit dem ABI Prism 310 Sequenzer verwendet werden, da neben der Plasmid-DNA auch Verunreinigungen im Endprodukt enthalten sind.

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA ist die Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen). Die hierbei isolierte Plasmid-DNA hat einen hohen Reinheitsgrad und kann daher auch zur Sequenzierung verwendet werden.

Zur Plasmid-DNA-Isolierung in großem Maßstab wurde der QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Auch bei dieser Methode hat die isolierte DNA einen hohen Reinheitsgrad und kann somit zur Sequenzierung oder Transfektion von Zellen verwendet werden.

3.2.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Prostatagewebe

500 mg Prostatagewebe wurden in ein steriles Röhrchen zu 5 ml peqGold RNA Pure (peqLab Biotechnologie) gegeben und mit dem Polytron mechanisch zerkleinert.

Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde 1 ml Chloroform zugegeben und die Mischung 15 s kräftig geschüttelt.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 3 bis 10 min wurde das Röhrchen mit dem Inhalt 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation bestand die Flüssigkeit aus drei Phasen. Die obere wässrige Phase, in der die RNA enthalten war, wurde mit einer Pipette abgezogen und in ein frisches Röhrchen überführt, während die beiden restlichen Phasen verworfen wurden.

Nach Zugabe von 2,5 ml Isopropanol wurde das Röhrchen 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der wässrige Überstand vorsichtig abgezogen.

Im Anschluss wurde das erhaltene RNA-Sediment am Boden des Röhrchens zweimal durch Zugabe von 1 ml Ethanol (70%) und anschließende Zentrifugation 10 min bei 12000 rpm gewaschen. Der Ethanolüberstand wurde nach jedem Schritt vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgezogen und verworfen.

Nach dem Trocknen des RNA-Sediments wurde es in 50 µl DEPC-H₂O gelöst. 8 µl wurden für die Erststrang-Synthese in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt.

Die verbliebenen 42 µl wurden mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 20 µl Kalium-Acetat (40%) und 500 ml Ethanol (100%) wurde die Gesamt-RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur und alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C durchgeführt. Sämtliche Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt, um die RNA-Hydrolyse durch RNasen zu verhindern.

3.2.7 Erststrangsynthese aus Gesamt-RNA

Zur weiteren Analyse der isolierten Gesamt-RNA wurden mit dem Kit Superscript II for RT-PCR (Invitrogen) zu den RNA-Molekülen komplementäre DNA-Einzelstränge synthetisiert, die als Matrize für weitere analytische und präparative Maßnahmen dienen.

Die Erststrangsynthese beruht auf der Verwendung einer speziellen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT), die beginnend an einem Oligonukleotidprimer (Startprimer) zu den RNA-Molekülen komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Neben der RT enthielt der Reaktionsansatz als Startprimer einen Oligo-dT-Primer und einen dNTP-Mix. Der Oligo-dT-Primer ist komplementär zur Polyadenylierungssequenz (Poly-A-Schwanz) am 3'-Ende von mRNA-Molekülen, so dass er an alle im Reaktionsansatz enthaltenen mRNA-Moleküle binden kann. Theoretisch entsteht so zu jedem mRNA-Molekül ein komplementärer Erststrang.

Zudem wurde ein nicht-kompetitiver RNase-Inhibitor (*RNase-out*) zugegeben, um die Hydrolyse der enthaltenen RNA-Moleküle zu verhindern. Am Ende der Reaktion wurde zur Hydrolyse der an die Erststränge gebundenen mRNA-Moleküle RNase H zugegeben.

Ansatz:

Zugabe von	Inkubation	Schritt
8 µl Gesamt-RNA		
1 µl dNTP-Mix		
1 µl Oligo-dT-Primer		

	Inkubation für 5 min bei 65 °C	Hybridisierung der Oligo-dT-Primer
	Abkühlen auf Eis	
<hr/>		
	2 µl RT-Puffer	
	4 µl MgCl ₂ (25 mM)	
	2 µl dTT	
	RNase-out	
<hr/>		
	Temperieren auf 42 °C	
<hr/>		
	1 µl RT	
<hr/>		
	Inkubation für 50 min bei 42 °C	Erststrangsynthese
	Inkubation für 20 min bei 70 °C	Inaktivierung der RT
	Abkühlen auf 4 °C	
<hr/>		
	1 µl RNase H	
<hr/>		
	Inkubation für 20 min bei 37 °C	Hydrolyse der mRNA-Moleküle

Die erhaltenen Erststränge wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und dient der *in-vitro*-Amplifikation von DNA-Sequenzen (Mullis *et al.*, 1986; Mullis & Faloona, 1987). Es werden eine DNA-Matrize (*Template*), zwei spezifische Oligonukleotide (*Primer*), die 2'-Desoxynukleotide (*dNTPs*) und eine thermostabile DNA-Polymerase benötigt.

Die Polymerasekettenreaktion besteht aus drei Schritten, die je nach Verwendungszweck in einer bestimmten Anzahl von Zyklen wiederholt werden:

Im ersten Schritt (*Denaturierung*) wird die doppelsträngige DNA, die als Matrize (*Template*) dient, denaturiert, so dass DNA-Einzelstränge vorliegen.

Im zweiten Schritt (*Annealing*) hybridisiert jeweils ein Oligonukleotidprimer an einen DNA-Einzelstrang. Die Nukleotidsequenzen der Primer werden so gewählt, dass die zu amplifizierende DNA-Sequenz von den Primern flankiert wird. Ein Primer ist jeweils zum kodierenden und ein Primer zum nicht-kodierenden DNA-Strang komplementär.

Damit die Primer an die zu ihrer Sequenz komplementären DNA-Sequenzen binden können, wird die Temperatur in diesem Schritt gesenkt. Die optimale Annealingtemperatur errechnet sich aus der Schmelztemperatur T_m der Primer.

T_m kann näherungsweise aus der Primersequenz nach folgender Formel bestimmt werden:

$$T_m = 4 \cdot (n(G) + n(C)) + 2 \cdot (n(A) + n(T))$$

n = Anzahl

Im dritten Schritt (*Elongation*) beginnt die thermostabile DNA-Polymerase jeweils am 3'-Ende der Primer mit der Synthese der zur Template-DNA komplementären DNA-Stränge. Die Elongation wird bei einer Temperatur durchgeführt, die dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase entspricht. Die Phusion High-Fidelity Polymerase wird bei einer Temperatur von 98 °C denaturiert, die Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 94 °C. Alle PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Typischer PCR-Ansatz:

	Substanz	Endkonzentration
1 µl	Template-DNA	1 pg - 250 ng/ 50 µl
2,5 µl	Primer 1	0,2 µM
2,5 µl	Primer 2	0,2 µM
1,0 µl	dNTPs	200 µM
10,0 µl/ 5,0 µl	HF-/ Taq-Puffer	-
0,5 µl/ 1 µl	Phusion-/ Taq-Polymerase	0,02 U/ µl
ad 50 µl	H ₂ O _{steril}	

Typisches PCR-Programm:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Schritt
-	94 °C / 98 °C	1-3 min	Denaturierung
	94 °C / 98 °C	30 s	Denaturierung
18-40	nach T_m der Primer	10 s	Annealing
	72 °C	je nach Produktlänge	Elongation
-	72 °C	2-5 min	Elongation
-	4 °C	∞	Aufbewahrung

Wurde der Reaktionsansatz nach Ende der PCR-Reaktion nicht sofort weiter verarbeitet, konnte er bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 3.4: Verwendete DNA-Polymerasen.

Polymerase	Eigenschaften	
<i>Taq-Polymerase</i>	Herkunft	Thermus aquaticus
	Aktivität	5'-3'-DNA-Polymerase 5'-3'-Exonuklease
	Temperaturoptimum	74 °C
	Synthesegeschwindigkeit	2800 Nukleotide/ min
	Fehlerrate	1/ 1000 Nukleotide
<i>Phusion High-Fidelity Polymerase</i>	Aktivität	5'-3'-DNA-Polymerase 3'-5'-Exonuklease
	Temperaturoptimum	72 °C
	Synthesegeschwindigkeit	2000-4000 Nukleotide/ min
	Fehlerrate	1/ 50000 Nukleotide

Für die Konstruktion der mutierten TRPV6b-Konstrukte wurde die Phusion-Polymerase verwendet, ebenso für RT-PCR. Zur Genotypisierung mittels RFLP-Analysen wurde die Taq-Polymerase verwendet.

3.2.8.1 Expressionsanalyse

Verwendete Primerpaare:

- UW637/ 638 HGPRT1
- UW776/ 777 TRPV6 (Startbereich)
- UW778/ 779 TRPV6 (Stopbereich)
- UW780/ 781 TRPM4

Template:

Erststrang-DNA

Anzahl der Zyklen:

35-40

3.2.8.2 Genotypisierung der Patienten und Kontrollpersonen

Verwendete Primerpaare:

UW243/ 244 2. Polymorphismus

UW430/ 431 1. Polymorphismus

UW778/ 779 4. und 5. Polymorphismus

UW763/ 764 4. und 5. Polymorphismus

Template:

genomische DNA

Erststrang-DNA

Anzahl der Zyklen:

35-40

3.2.8.3 Gezielte Punktmutationen

Verwendete Primerpaare:

UW771/ 772 TRPV6 Mutation G503C (M1)

UW773/ 774 TRPV6 Mutation G503S (M1)

Template:

pcDNA3_hTRPV6b_WT

Anzahl der Zyklen:

18-25

3.2.9 Herstellung eines Größenstandards (MP-Marker)

Um auch DNA-Fragmente geringer Längendifferenzen sicher identifizieren zu können, wurde ein Größenstandard benötigt, der eine hohe Auflösung im Bereich 20-500 bp hat. Zu diesem Zweck wurde der MP-Marker hergestellt, der auf der Hydrolyse des Expressionsvektors pCAGGS-IRES-GFP mit der Restriktionsendonuklease DpnI basiert.

Ansatz:

5 µg	pCAGGS-IRES-GFP
10 µl	NEB-Puffer 4
5 µl	<u>Restriktionsendonuklease DpnI</u>
ad 100 ml	H ₂ O _{steril}

Der Ansatz wurde für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss wurde DpnI durch 20-minütige Inkubation bei 80 °C inaktiviert. Nach Zugabe von 10 µl Auftragspuffer konnte der Größenstandard verwendet werden.

Bandengrößen: 1974, 748, 620, 492, 443, 341, 337, 258, 206, 138, 107, 105, 78, 75, 56, 46, 36, 23, 18, 17, 12, 11, 8, 5 bp.

3.2.10 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus- (RFLP-) Analysen

Für RFLP-Analysen wurden die Restriktionsendonukleasen Bsp1286I, AciI und FauI (New England Biolabs) eingesetzt.

Tabelle 3.5: Zur Genotypisierung verwendete Restriktionsendonukleasen.

Enzym	Verwendungszweck	Inkubationstemperatur
Bsp1286I	Genotypisierung 2. Polymorphismus	37 °C
AciI	Genotypisierung 1. Polymorphismus	37 °C
FauI	Genotypisierung 1. Polymorphismus	55 °C

Ansatz:

12,5 µl	PCR-Produkt
1,5 µl	NEB-Puffer
1,0 µl	Restriktionsendonuklease

Die Reaktionsansätze wurden jeweils 1 h bei der in Tabelle 3.4 angegebenen Temperatur inkubiert und im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.11 Gezielte Punktmutagenese

Die gezielte Punktmutagenese der *trpv6b*-cDNA wurde nach dem *Site-directed QuikChange Mutagenesis Protocol* (Stratagene) durchgeführt.

Als DNA-Polymerase wurde die Phusion High-Fidelity Polymerase (Finnzymes, NEB) verwendet. Die Zusammensetzung und Konditionen der PCR-Reaktion sind unter 3.2.8.3 angegeben. Alle weiteren Schritte sowie das Design der Mutationsprimer UW771-UW774 wurden wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

3.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Prinzip der Kettenterminationsreaktion (modifiziert nach Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

Hierbei wird eine Polymerase verwendet, die, an einem Oligonukleotidprimer beginnend, einen zum Matrizen-DNA-Strang komplementären DNA-Strang synthetisiert. Zusätzlich zu 5'-Desoxynukleotiden (dNTPs) sind im Reaktionsansatz 3',5'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthalten.

Nachdem die Polymerase ein ddNTP eingefügt hat, kommt es zum Kettenabbruch, da die Polymerase durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe keine Phosphorsäurediesterbindung mit einem weiteren dNTP knüpfen kann.

Da dNTPs und ddNTPs in einem bestimmten Verhältnis im Reaktionsansatz enthalten sind, kommt es rechnerisch an jeder entsprechenden Position der neu synthetisierten DNA-Stränge zum Kettenabbruch.

Die Sequenzreaktion, bei der die komplementären Stränge synthetisiert werden, wird in einem Thermocycler durchgeführt. Allerdings wird im Gegensatz zur konventionellen PCR-Reaktion nur ein Oligonukleotidprimer verwendet so dass die Ausbeute an synthetisierten DNA-Molekülen linear ist.

3.2.12.1 ABIPrism 310 Sequenzer

Bei der DNA-Sequenzierung mit diesem Gerät wurde der ABI Prism Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems) verwendet, bei dem in einem Reaktionsansatz alle vier ddNTPs enthalten sind. Die ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und können nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung von einem Laser detektiert werden.

Ansatz der Sequenzreaktion:

500 ng	DNA
1,5 µl	BigDye™
1,0 µl	Sequenzierprimer (10 pmol/ µl)
ad 12 µl	H ₂ O _{HPLC}

Programm der Sequenzreaktion:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Schritt
-	95 °C	1 min	Denaturierung
	95 °C	10 s	Denaturierung
35	58 °C	2 min 30 s	Annealing Elongation
-	4 °C	∞	Aufbewahrung

Vor dem Starten der kapillarelektrophoretischen Auftrennung der entstandenen DNA-Moleküle muss der Reaktionsansatz gereinigt werden, da er noch Bestandteile der Sequenzreaktion wie die Polymerase und nicht eingebaute Nukleotide enthält. Zu diesem Zweck wurde jede Probe über eine Sepharosesäule gereinigt.

Vorbereitung der Sepharosesäule:

Eine 96-Lochplatte mit Filtrationseinheit wurde mit Sepharose befüllt und jede Säule durch die Zugabe von 300 µl H₂O_{HPLC} bei Raumtemperatur äquilibriert. Nach 2 h wurde die Platte durch Zentrifugation 5 min bei 910 · g gewaschen. Vor der weiteren Verwendung wurde die Platte nach der Zugabe von 150 µl H₂O_{HPLC} ein weiteres Mal durch Zentrifugation 5 min bei 910 · g gewaschen. Das Eluat wurde jeweils verworfen.

Reinigung der Sequenzreaktion über die Sepharosesäule:

Die Sequenzreaktion wurde auf die vorbereitete Sepharosesäule aufgetragen. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 910 · g wurde die Sequenzreaktion in 0,2 ml-Reaktionsgefäße, in die jeweils 8 µl Hi-Di-Formamid (Applied Biosystems) vorgelegt wurde, eluiert.

Die Mischung aus Hi-Di-Formamid und gereinigter Sequenzreaktion wurde nun kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten ddNTPs wurden von einem Laser detektiert.

Zur weiteren Bearbeitung der Rohdaten wurde die Sequenz exportiert und mit der Software Accelrys Gene analysiert.

3.2.12.2 LI-COR 4200 Sequenzer

Zur DNA-Sequenzierung mit dem LI-COR 4200 Sequenzer wurde die Sequenzreaktion mit dem Thermosequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Hierbei werden bei jeder zu analysierenden Sequenz vier Reaktionen angesetzt, wobei eine Reaktion jeweils alle dNTPs, aber nur ein bestimmtes ddNTP enthält.

Um die DNA-Stränge mit einem Infrarotlaser detektieren zu können, werden 5'-IRD 800-markierte Oligonukleotidprimer benötigt.

Mastermix:

5 µg	Plasmid-DNA
2 µl	Sequenzierprimer (1 pmol/ µl)
ad 18 µl	H ₂ O _{steril}

Ansatz der Sequenzreaktion:

1 μ l	Termination Mix (A, C, G oder T)
4 μ l	Mastermix

Programm der Sequenzreaktion:

Zyklen	Temperatur	Dauer	Schritt
-	94 °C	5 min	Denaturierung
35	94 °C	30 s	Denaturierung
	nach T_m der Primer	30 s	Annealing
	72 °C	45 s	Elongation
-	72 °C	5 min	Elongation
-	4 °C	∞	Aufbewahrung

Nach Beendigung der Sequenzreaktion wurden zu jedem Reaktionsansatz 2 μ l Auftragspuffer (Thermosequense Primer Cycle Sequencing Kit) gegeben.

Die Reaktionsansätze wurden in nebeneinander liegende Geltaschen des Sequenzgels aufgetragen.

3.2.13 Blau-Weiß-Test

Der Phagemid-Vektor pBluescript KS- (Abb. 2.1) enthält die für den N-terminalen Proteinabschnitt (α -Fragment) der β -Galactosidase kodierende Gensequenz. Werden Wirtszellen, die den C-terminalen Proteinabschnitt (ω -Fragment) der β -Galactosidase-Gens exprimieren, mit diesem Vektor transformiert, so sind sie in der Lage, das funktionelle Enzym zu bilden (α -Complementation), während beide Fragmente alleine keine Enzymaktivität aufweisen (Horwitz *et al.*, 1964; Ullmann *et al.*, 1967; Davies & Jacob, 1968).

Die β -Galactosidase ist ein Enzym, das die β -1,4-glycosidische Bindung zwischen D-Galactose und D-Glucose im Disaccharid Lactose hydrolysiert. Die Expression des Enzyms wird durch den *Lac*-Promotor reguliert; eine Induktion erfolgt physiologisch durch Lactose, kann unter Laborbedingungen jedoch auch durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), eines nicht hydrolysierbaren Lactose-Analogons, erreicht werden.

Beim Blau-Weiß-Test wird die farblose Substanz x-Gal zusammen mit IPTG auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin aufgetragen und homogen verteilt. Bakterien, die das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase nicht exprimieren, sind nicht in der Lage, x-Gal zu hydrolysieren und bleiben farblos. Im Gegensatz dazu spalten β -Galactosidase exprimierende Zellen x-Gal in Galactose und den blauen Farbstoff 5-Brom-4-chloro-3-indigo. Diese Bakterienkolonien imponieren durch eine tiefblaue Färbung.

Durch die Insertion einer DNA-Sequenz in die MCS des pBluescript II KS- Phagemid-Vektors wird der Leserahmen des *LacZ'*-Gens zerstört und das α -Fragment der β -Galactosidase nicht mehr gebildet. Daher können Wirtszellen, die mit dem rekombinanten Plasmidvektor transformiert wurden, x-Gal nicht hydrolysieren und die Kolonien erscheinen farblos. Die Kolonien der Wirtszellen, die mit dem Wildtyp-Plasmid transformiert wurden, sind hingegen blau gefärbt.

3.2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch den Vierfelder- χ^2 -Test mit der Nullhypothese H_0 : Die Merkmale in den untersuchten Gruppen sind voneinander unabhängig.

Rechenbeispiel:

	Genotyp A/B	Genotyp B/B	Σ
Prostatakarzinompatienten	a	b	a+b = n_1
Kontrollpersonen	c	d	c+d = n_2
Σ	a+c	b+d	a+b+c+d = n

$$\chi^2 = \frac{(n-1) \cdot (a \cdot d - b \cdot c)^2}{(a+b) \cdot (c+d) \cdot (a+c) \cdot (b+d)}$$

Der kritische Wert für die Prüfgröße beträgt bei einem Freiheitsgrad und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% $\chi^2_{1;0,05} = 3,84$. Bei errechneten Prüfgrößen $\chi^2 > 3,84$ kann H_0 auf dem 5%-Signifikanzniveau abgelehnt werden, d.h. es besteht eine stochastische Abhängigkeit zwischen den betrachteten Merkmalen.

4 Ergebnisse

In der europäischen Bevölkerung existieren zwei *trpv6*-Allele, die als *trpv6a* und *trpv6b* bezeichnet werden (Wissenbach *et al.*, 2001). Der kodierende Bereich der mRNAs unterscheidet sich in 5 Basenpaaraustauschen, die zu drei Aminosäureänderungen der korrespondierenden TRP-Proteine TRPV6a und TRPV6b führen. In der europäischen Bevölkerung tritt der homozygote *trpv6b*-Genotyp (B/B) deutlich häufiger auf (ca. 87%) als der homozygote *trpv6a*-Genotyp (A/A, ca. 0,3%). Der homozygote *trpv6a*-Genotyp (A/A) tritt jedoch vermehrt in afrikanisch-stämmiger Bevölkerung auf, wobei der genaue Prozentsatz innerhalb der afrikanischen Bevölkerung aber starken regionalen Schwankungen unterworfen ist (Akey *et al.*, 2006). So schwankt die Häufigkeit für den Genotyp A/A zwischen 91,7% (Namibia) und 15% (Algerien).

Expressionsanalysen zeigen, dass die Expression von TRPV6 mit der Malignität des Prostatakarzinoms korreliert (Wissenbach *et al.*, 2001, Fixemer *et al.*, 2003): In bereits metastasierten Karzinomen beträgt der Anteil der Patienten mit TRPV6-positiven Tumoren mehr als 90%, während weder in gesundem noch in benigne hyperplastischem Prostatagewebe TRPV6-Transkripte mittels *In situ*-Hybridisierung nachweisbar sind.

Die Prävalenz des Prostatakarzinoms ist bei Amerikanern afrikanischer Herkunft 2-3-fach gegenüber Amerikanern europäischer Abstammung erhöht (Crawford, 2003). Als Gründe für unterschiedliche Prävalenzen in verschiedenen ethnischen Gruppen werden sowohl diätetische als auch genetische Faktoren diskutiert (Crawford, 2003).

In dieser Arbeit wurde untersucht ob der *trpv6*-Genotyp einen Einfluss auf die Entstehung und/ oder Progression des Prostatakarzinoms hat bzw. ob er sich als prognostischer Marker eignet. Im Detail wurde überprüft, ob *trpv6a*-Allele vermehrt bei Prostatakarzinompatienten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen auftreten. Als Voraussetzung hierfür wurde zunächst getestet, ob in der kaukasischen Bevölkerung die fünf Polymorphismen, die die *trpv6a*- und *trpv6b*-Allele definieren, gekoppelt sind. Wenn dies der Fall ist, ist es ausreichend einen Polymorphismus zu analysieren, um den Genotyp eines Probanden zu bestimmen.

Untersuchungen zur Kopplung der Polymorphismen ergaben, dass die Polymorphismen in allen Proben gekoppelt auftreten. Somit wurden frühere Daten bestätigt (Wissenbach *et al.*, 2001). Die Untersuchungen zur Kopplung der Polymorphismen sind in Abschnitt 4.3 beschrieben.

4.1 Untersuchungen zur Beziehung zwischen den trpv6-Allelvarianten und dem Auftreten des Prostatakarzinoms

4.1.1 Genotypisierung von Kontrollpersonen und Prostatakarzinompatienten

Um festzustellen, ob Träger der trpv6a-Variante ein höheres Risiko besitzen, an Prostatakrebs zu erkranken, wurden die absoluten und relativen Häufigkeiten der möglichen Genotypen in einer Patientengruppe und einer Kontrollgruppe mit Probanden ermittelt. Die Probanden waren gesunde Männer und Frauen kaukasischer Herkunft. Bei den männlichen Probanden der Kontrollgruppe lagen keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Erkrankung der Prostata vor.

Zur Untersuchung wurde von jedem Mitglied beider Gruppen genomische DNA isoliert. Das Ausgangsmaterial war bei den Patienten jeweils eine Gewebeprobe der Prostataneoplasie, bei den Probanden jeweils eine Speichelprobe mit Wangenepithelzellen.

Zur Genotypisierung wurde mit den trpv6-spezifischen Primern 243 und 244 ein 458 bp großer DNA-Abschnitt, der den 2. Polymorphismus der cDNA des trpv6-Gens enthält, amplifiziert (siehe Abb. 2.1).

Der Nukleotidaustausch Adenin (trpv6a) gegen Guanin (trpv6b) an dieser Position erzeugt eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Bsp1286I, zusätzlich zu einer Erkennungssequenz, die bei beiden Allelvarianten vorhanden ist und im Intronbereich liegt (siehe Abb. 4.1).

Die Allelvarianten und die resultierenden Genotypen konnten nach elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem Polyacrylamidgel durch einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), der in Abb. 4.2 dargestellt ist, identifiziert werden (Wissenbach *et al.*, 2001).

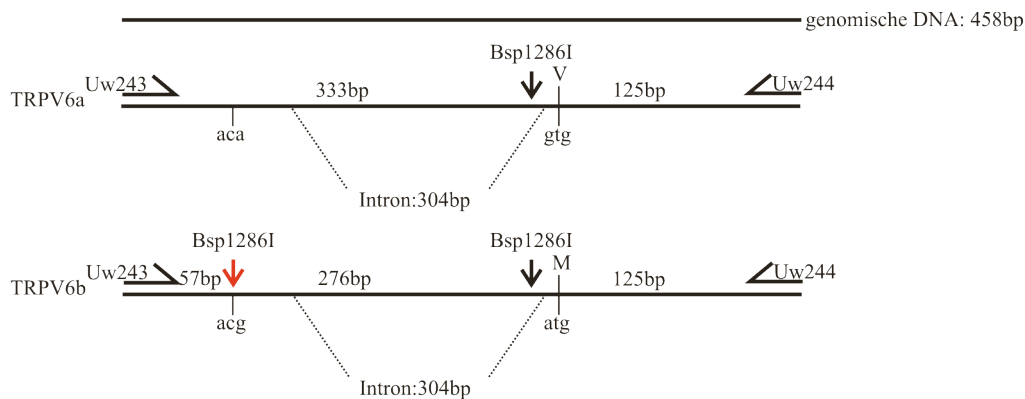


Abbildung 4.1: Genotypisierung von trpv6-Allelen.

Mit den Primern 243 und 244 kann ein genomisches Fragment des trpv6-Gens amplifiziert werden. Das Amplifikat (458bp, oben) umfasst die Polymorphismen 2 und 3 der trpv6-cDNA (siehe Abb. 2.1) sowie ein Intron (304bp). Das Intron enthält eine Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym Bsp1286I. Durch den 2. Polymorphismus entsteht eine weitere Schnittstelle im trpv6b-Allel. Wird trpv6a durch Bsp1286I geschnitten, entstehen Fragmente der Längen 333bp und 125bp (Mitte); wird trpv6b geschnitten, entstehen Fragmente der Längen 276bp, 125bp und 57bp (unten). Im Falle einer heterozygoten Probe, die sowohl trpv6a- als auch trpv6b-Allele aufweist (Genotyp A/B), entstehen Fragmente der Längen 333bp, 276bp, 125bp und 57bp.

Anhand der Darstellung in Abb. 4.1 kann der Nachweis der verschiedenen trpv6-Genotypen nachvollzogen werden:

- homozygoter trpv6a-Genotyp (A/A): 333, 125 bp.
- homozygoter trpv6b-Genotyp (B/B): 276, 125, 57 bp.
- heterozygoter trpv6-Genotyp (A/B): 333, 276, 125, 57 bp.

Die resultierenden Bandenmuster von drei Proben sind in Abb. 4.2 gezeigt.

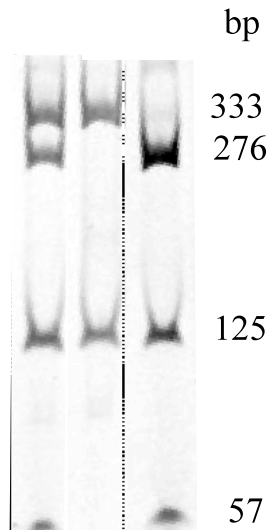


Abbildung 4.2: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP).

Aus genomischer DNA von drei Probanden wurde mit den Primern 243 und 244 ein genomisches Fragment des trpv6-Gens amplifiziert (vgl. Abb. 4.1). Die trpv6-Fragmente wurden mit Bsp1286I verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Aus dem Bandenmuster lässt sich der trpv6-Genotyp ableiten. Spur 1: Genotyp A/B, Spur 2: Genotyp A/A, Spur 3: Genotyp B/B.

Genotypisierung der Kontrollpersonen:

Als Kontrollgruppe wurden insgesamt 169 Personen im Rahmen verschiedener Praktika der Fachrichtung 2.4 genotypisiert. Nach Anleitung führten die Praktikumssteilnehmer die Genotypisierung selbst durch. Die erzielten Ergebnisse wurden durch Wiederholung der Genotypisierung bestätigt und anonymisiert dokumentiert.

Tabelle 4.1: Genotypisierung von Kontrollpersonen.

G = gesunde Probanden; Probanden mit ≥ 1 trpv6a-Allel sind hervorgehoben.

Probennummer	Geschlecht	Genotyp 2. Polymorphismus
G1	männlich	B/B
G2	weiblich	B/B
G3	weiblich	A/B
G4	weiblich	B/B
G5	weiblich	B/B

G6	männlich	B/B
G7	männlich	B/B
G8	männlich	B/B
G9	männlich	B/B
G10	weiblich	B/B
G11	weiblich	B/B
G12	männlich	B/B
G13	männlich	A/B
G14	männlich	A/B
G15	männlich	B/B
G16	männlich	A/B
G17	männlich	B/B
G18	männlich	A/B
G19	männlich	B/B
G20	männlich	A/B
G21	männlich	B/B
G22	männlich	B/B
G23	männlich	A/B
G24	männlich	B/B
G25	männlich	B/B
G26	männlich	B/B
G27	männlich	B/B
G28	männlich	B/B
G29	männlich	B/B
G30	männlich	B/B
G31	männlich	B/B
G32	männlich	B/B
G33	männlich	B/B
G34	weiblich	B/B
G35	männlich	B/B
G36	weiblich	B/B
G37	weiblich	B/B
G38	weiblich	B/B

G39	männlich	B/B
G40	weiblich	B/B
G41	weiblich	A/B
G42	weiblich	B/B
G43	männlich	B/B
G44	männlich	B/B
G45	männlich	B/B
G46	männlich	B/B
G47	männlich	B/B
G48	weiblich	B/B
G49	weiblich	B/B
G50	männlich	B/B
G51	männlich	A/B
G52	männlich	B/B
G53	weiblich	B/B
G54	männlich	B/B
G55	männlich	B/B
G56	männlich	B/B
G57	weiblich	B/B
G58	männlich	B/B
G59	männlich	B/B
G60	weiblich	B/B
G61	weiblich	B/B
G62	weiblich	B/B
G63	weiblich	A/B
G64	weiblich	B/B
G65	männlich	B/B
G66	weiblich	B/B
G67	weiblich	B/B
G68	männlich	B/B
G69	weiblich	B/B
G70	männlich	A/B
G71	weiblich	B/B

G72	männlich	B/B
G73	weiblich	B/B
G74	weiblich	B/B
G75	weiblich	A/B
G76	weiblich	A/B
G77	männlich	B/B
G78	männlich	B/B
G79	männlich	B/B
G80	männlich	B/B
G81	weiblich	B/B
G82	männlich	B/B
G83	weiblich	B/B
G84	weiblich	A/B
G85	weiblich	B/B
G86	weiblich	B/B
G87	weiblich	B/B
G88	weiblich	B/B
G89	männlich	B/B
G90	weiblich	B/B
G91	männlich	B/B
G92	weiblich	B/B
G93	weiblich	A/B
G94	weiblich	B/B
G95	männlich	B/B
G96	männlich	B/B
G97	männlich	B/B
G98	männlich	B/B
G99	weiblich	B/B
G100	weiblich	B/B
G101	weiblich	B/B
G102	weiblich	B/B
G103	weiblich	B/B
G104	weiblich	B/B

G105	weiblich	B/B
G106	weiblich	B/B
G107	weiblich	B/B
G108	weiblich	B/B
G109	weiblich	B/B
G110	weiblich	B/B
G111	weiblich	B/B
G112	männlich	B/B
G113	weiblich	B/B
G114	weiblich	B/B
G115	weiblich	B/B
G116	weiblich	B/B
G117	weiblich	B/B
G118	weiblich	B/B
G119	männlich	B/B
G120	weiblich	A/B
G121	männlich	B/B
G122	männlich	A/B
G123	männlich	B/B
G124	weiblich	B/B
G125	männlich	B/B
G126	männlich	B/B
G127	männlich	B/B
G128	männlich	B/B
G129	männlich	B/B
G130	männlich	B/B
G131	weiblich	B/B
G132	weiblich	B/B
G133	weiblich	B/B
G134	weiblich	A/B
G135	weiblich	B/B
G136	weiblich	B/B
G137	weiblich	B/B

G138	männlich	B/B
G139	weiblich	B/B
G140	weiblich	B/B
G141	weiblich	B/B
G142	weiblich	B/B
G143	weiblich	B/B
G144	weiblich	A/B
G145	männlich	B/B
G146	weiblich	B/B
G147	weiblich	B/B
G148	weiblich	A/B
G149	weiblich	B/B
G150	weiblich	B/B
G151	weiblich	B/B
G152	männlich	A/B
G153	weiblich	B/B
G154	männlich	B/B
G155	männlich	B/B
G156	männlich	B/B
G157	männlich	B/B
G158	weiblich	B/B
G159	weiblich	B/B
G160	weiblich	B/B
G161	weiblich	B/B
G162	weiblich	B/B
G163	weiblich	B/B
G164	weiblich	B/B
G165	weiblich	B/B
G166	weiblich	A/B
G167	männlich	A/B
G168	männlich	B/B
G169	weiblich	A/B

Die Kontrollpersonen wurden als Gesamtgruppe und nach Geschlechtern getrennt betrachtet.

Tabelle 4.2:

Absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen innerhalb der Kontrollgruppe.

Genotyp	Männliche Probanden	Weibliche Probanden	gesamt (Probanden)
Genotyp A/B	11	13	24
Genotyp B/B	66	79	145
gesamt	77	92	169

Zwischen den männlichen und den weiblichen Probanden konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Verteilung der Genotypen beobachtet werden ($\chi^2=0,001$, $p>0,1$), die relativen Häufigkeiten der beobachteten Genotypen sind in Abb. 4.3 dargestellt. Die Genotypisierung ergab, dass 85,8% der Kontrollpersonen den Genotyp B/B und 14,2% den heterozygoten Genotyp (A/B) aufwiesen, während der Genotyp A/A nicht gefunden wurde.

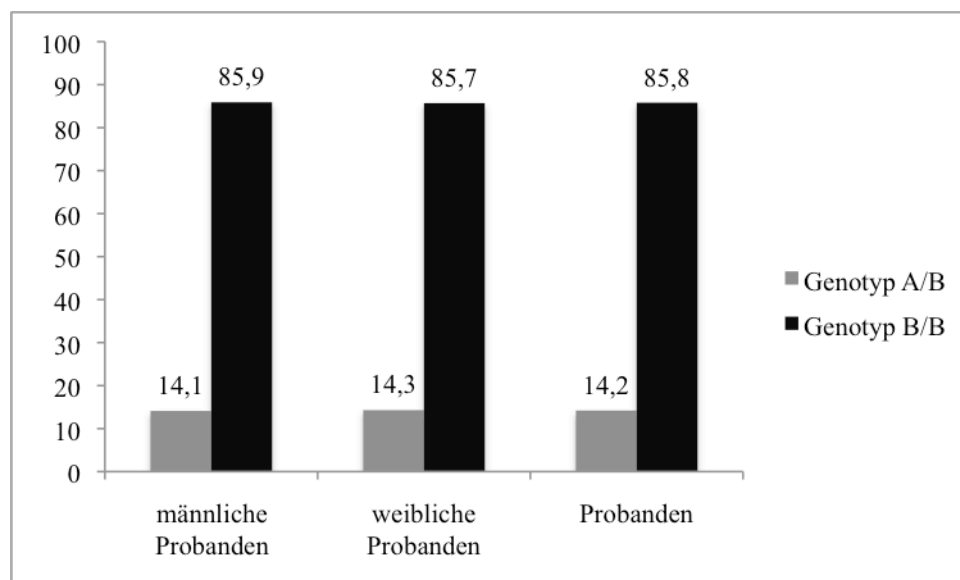


Abbildung 4.3:

Relative Häufigkeiten der beobachteten trpv6-Genotypen in der Gruppe Kontrollpersonen (n=169, Angaben in Prozent).

Genotypisierung der Prostatakarzinompatienten:

Es wurden 142 Gewebeproben von Prostatakarzinomen unterschiedlicher Patienten untersucht. Bei 100 Proben lagen Daten über das Alter des Patienten, den Gleason-Score oder den Ausbreitungsgrad des Primärtumors vor.

Tabelle 4.3: Ergebnis der Genotypisierung der Prostatakarzinomgewebeproben.

Die Proben PCA 41 und 47 konnten nicht verwendet werden; Patienten mit ≥ 1 trpv6a-Allel sind hervorgehoben (fortlaufende Nummerierung, PCA = Prostatakarzinom, n.b. = nicht bekannt).

Probennummer	Alter des Patienten bei OP	Ausbreitungsstadium	Gleason-Score	Genotyp 2. Polymorphismus
PCA 1	64	pT2c	6 (3+3)	B/B
PCA 2	64	pT3b	7 (4+3)	B/B
PCA 3	67	pT2c	7 (3+4)	B/B
PCA 4	64	pT2c	7 (3+4)	B/B
PCA 5	51	pT2c	7 (3+4)	B/B
PCA 6	62	pT2c	n.b.	B/B
PCA 7	62	pT2c	7 (4+3)	B/B
PCA 8	66	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 9	63	pT2c	7 (4+3)	B/B
PCA 10	69	pT2c	n.b.	B/B
PCA 11	66	pT4	7 (4+3)	B/B
PCA 12	56	pT2c	6 (3+3)	B/B
PCA 13	70	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 14	65	pT2c	5 (2+3)	B/B
PCA 15	63	pT2c	6 (3+3)	B/B
PCA 16	54	pT2c	7 (4+3)	B/B
PCA 17	70	pT2c	7 (3+4)	B/B
PCA 18	65	pT2c	7 (4+3)	B/B
PCA 19	47	pT3b	8 (4+4)	B/B
PCA 20	64	pT3b	8 (4+4)	B/B
PCA 21	66	pT2a	6 (3+3)	A/B

PCA 22	71	pT2b	9 (4+5)	B/B
PCA 23	67	pT3a	n.b	B/B
PCA 24	76	pT2a	7 (3+4)	B/B
PCA 25	74	pT3c	n.b	B/B
PCA 26	65	pT3a	n.b	B/B
PCA 27	64	pT3b	10	B/B
PCA 28	61	pT3a	9 (5+4)	A/B
PCA 29	54	pT4	7 (3+4)	B/B
PCA 30	74	pT3	8 (4+4)	A/B
PCA 31	72	pT3b	5 (2+3)	B/B
PCA 32	74	pT4	n.b	B/B
PCA 33	65	pT4	8 (4+4)	B/B
PCA 34	68	pT4	7 (3+4)	B/B
PCA 35	67	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 36	66	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 37	52	pT3b	7 (4+3)	B/B
PCA 38	59	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 39	69	pT2b	8 (3+5)	B/B
PCA 40	61	pT2b	7 (3+4)	B/B
PCA 42	66	pT3c	9 (4+5)	B/B
PCA 43	65	pT4	9 (4+5)	B/B
PCA 44	63	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 45	62	pT2a	6 (3+3)	B/B
PCA 46	68	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 48	70	pT2b	7 (3+4)	A/B
PCA 49	59	pT2a	7 (3+4)	B/B
PCA 50	69	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 51	59	pT2b	6 (3+3)	A/B
PCA 52	59	pT2b	7 (3+4)	B/B
PCA 53	62	pT2b	7 (3+4)	B/B
PCA 54	66	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 55	66	pT2a	6 (3+3)	B/B
PCA 56	75	pT3a	7 (3+4)	B/B

PCA 57	62	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 58	66	pT2b	6 (3+3)	B/B
PCA 59	69	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 60	67	pT1	6 (3+3)	B/B
PCA 61	70	pT3a	9 (4+5)	B/B
PCA 62	65	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 63	52	pT2c	7 (3+4)	B/B
PCA 64	60	pT2c	7 (3+4)	B/B
PCA 65	61	pT2c	7 (3+4)	A/B
PCA 66	60	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 67	71	pT1	6 (3+3)	B/B
PCA 68	57	pT3b	7 (4+3)	B/B
PCA 69	73	pT2b	7 (4+3)	B/B
PCA 70	61	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 71	62	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 72	63	pT2	7 (3+4)	B/B
PCA 73	60	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 74	62	pT2b	6 (3+3)	A/B
PCA 75	67	pT2	n.b	B/B
PCA 76	56	pT2	7 (3+4)	B/B
PCA 77	73	pT3b	9 (4+5)	B/B
PCA 78	57	pT3a	7 (4+3)	B/B
PCA 79	70	pT3a	7 (4+3)	A/B
PCA 80	74	pT3b	n.b	A/B
PCA 81	57	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 82	61	pT3b	9 (5+4)	A/B
PCA 83	71	pT2b	7 (4+3)	B/B
PCA 84	75	pT3b	9 (4+5)	B/B
PCA 85	72	pT3c	7 (4+3)	B/B
PCA 86	61	pT2b	6 (3+3)	B/B
PCA 87	62	pT3b	9 (4+5)	A/B
PCA 88	73	pT2b	7 (3+4)	A/A
PCA 89	n.b	pT3a	8 (4+4)	B/B

PCA 90	65	pT2b	6 (3+3)	B/B
PCA 91	71	pT2b	n.b	B/B
PCA 92	59	pT3b	8 (4+4)	B/B
PCA 93	63	pT2b	7 (3+4)	B/B
PCA 94	58	pT2b	6 (3+3)	B/B
PCA 95	67	pT2b	6 (3+3)	B/B
PCA 96	67	pT3a	7 (3+4)	B/B
PCA 97	66	pT2b	7 (4+3)	B/B
PCA 98	70	pT2a	6 (3+3)	B/B
PCA 99	63	pT3b	9 (5+4)	B/B
PCA 100	61	pT2b	7 (4+3)	B/B
PCA 101	73	pT2b	7 (3+4)	B/B
PCA 102	71	pT3a	8 (5+3)	B/B
PCA 103	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 104	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 105	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 106	n.b	n.b	n.b	A/B
PCA 107	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 108	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 109	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 110	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 111	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 112	n.b	n.b	n.b	A/B
PCA 113	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 114	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 115	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 116	n.b	n.b	n.b	A/B
PCA 117	n.b	n.b	n.b	A/B
PCA 118	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 119	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 120	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 121	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 122	n.b	n.b	n.b	B/B

PCA 123	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 124	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 125	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 126	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 127	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 128	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 129	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 130	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 131	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 132	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 133	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 134	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 135	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 136	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 137	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 138	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 139	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 140	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 141	n.b	n.b	n.b	A/B
PCA 142	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 143	n.b	n.b	n.b	B/B
PCA 144	n.b	n.b	n.b	B/B

Es ergaben sich die in Tab. 4.4 dargestellten absoluten Häufigkeiten der Genotypen. In Abb. 4.4 sind die relativen Häufigkeiten der beobachteten Genotypen graphisch dargestellt. Die Genotypisierung der Patienten ergab, dass auch in dieser Gruppe der Genotyp B/B am häufigsten vorkommt. Von insgesamt 142 untersuchten Proben wiesen 125 den Genotyp B/B (88%), 16 den Genotyp A/B (11,3%) und eine Probe den Genotyp A/A (0,7%, Probe 88) auf.

Tabelle 4.4:

Ergebnis der Genotypisierung aller 142 untersuchten Patientenproben: absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen.

Genotyp	absolute Häufigkeit
Genotyp A/A	1
Genotyp A/B	16
Genotyp B/B	125

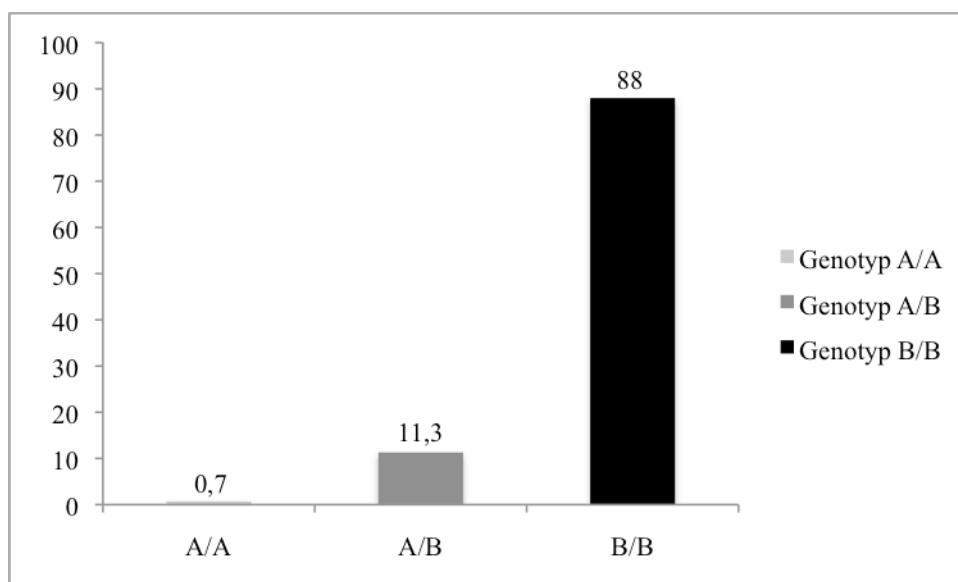


Abbildung 4.4:

Relative Häufigkeiten der trpv6-Genotypen in der Patientengruppe (n=142, Angaben in Prozent).

Insgesamt wurden 311 Personen kaukasischer Herkunft (Kontrollpersonen und Patienten) untersucht und es ergaben sich die in Tab. 4.5 dargestellten absoluten Häufigkeiten der Genotypen. In Abb. 4.5 sind die relativen Häufigkeiten der beobachteten Genotypen dargestellt. Von 311 untersuchten Proben wiesen 270 den Genotyp B/B (86.8%), 40 den Genotyp A/B (12.9%) und eine Person den Genotyp A/A (0.3%) auf.

Tabelle 4.5:

Absolute Häufigkeiten der Genotypen in allen untersuchten Proben (n=311).

Genotyp	absolute Häufigkeit
Genotyp A/A	1
Genotyp A/B	40
Genotyp B/B	270

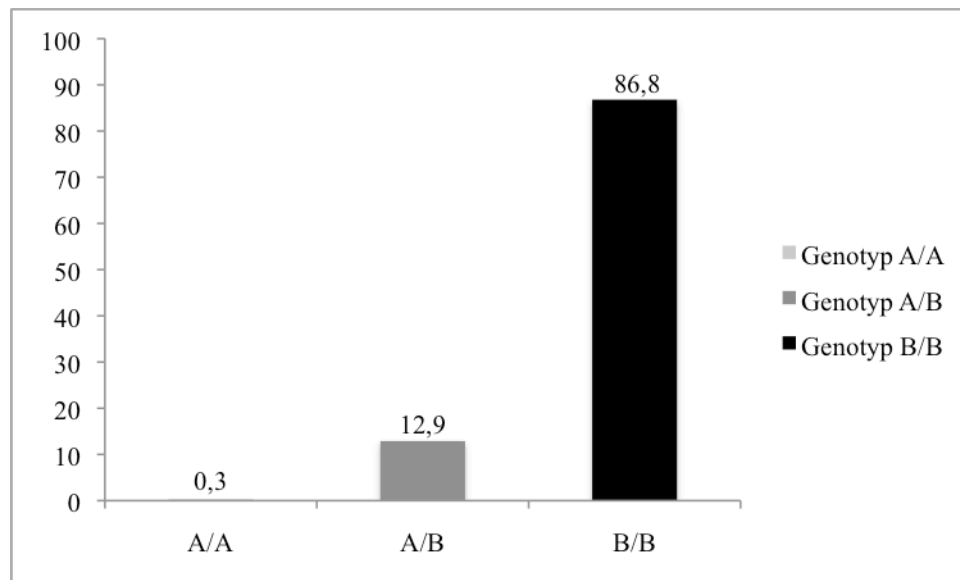


Abbildung 4.5:

Relative Häufigkeiten der Genotypen in allen untersuchten Proben (n=311, Probanden und Patienten).

Die Beobachtung eines Patienten mit homozygotem trpv6a-Genotyp (A/A) war durchaus zu erwarten, wie sich mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechnen lässt. Folgende Daten wurden als gegeben angenommen (h = Häufigkeit, Genotyp in Klammern):

$$p^2 = h(B/B) = 0,868$$

$$p = h(B) = \sqrt{0,868} = 0,932$$

Die erwartete Frequenz des trpv6a-Allels ($q_{\text{errechnet}}$) leitet sich folgendermaßen ab:

$$p + q_{\text{errechnet}} = 1$$

$$q_{\text{errechnet}} = 1 - p = 1 - 0,932 = 0,068$$

Aus der erwarteten Frequenz des trpv6a-Allels ließ sich die erwartete Häufigkeit des homozygoten trpv6a-Genotyps ($q^2_{\text{errechnet}}$) ableiten:

$$q^2_{\text{errechnet}} = (0,068)^2 = 0,0046$$

Der homozygote trpv6a-Genotyp (A/A) konnte also mit einer relativen Häufigkeit von 0,46% erwartet werden. Der tatsächlich beobachtete Wert von 0,32% liegt geringfügig unter diesem Wert. Zwischen den beobachteten und erwarteten Häufigkeiten der möglichen Genotypen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($\chi^2 = 0,14$; $p > 0,1$). In Tab. 4.6 sind die beobachteten und erwarteten absoluten Häufigkeiten der Genotypen aufgeführt.

Tabelle 4.6:

Beobachtete und erwartete absolute Häufigkeiten der möglichen Genotypen.

Genotyp	beobachtet	erwartet
Genotyp B/B	270	270,4
Genotyp A/B	40	39,2
Genotyp A/A	1	1,4

4.1.2 Vergleich der trpv6-Allelfrequenzen zwischen gesunden Probanden und Prostatakarzinompatienten

Um festzustellen, ob das Vorliegen eines bestimmten trpv6-Genotyps mit einem erhöhten Risiko, ein Prostatakarzinom zu entwickeln, verbunden ist, wurde die Häufigkeit der Genotypen zwischen den Kontrollpersonen und den Patienten verglichen (Tab. 4.2 und Tab. 4.4). Da in der Kontrollgruppe der Genotyp A/A nicht beobachtet wurde, wurde der Patient mit diesem Genotyp bei der statistischen Analyse nicht berücksichtigt, während er in Abbildungen und Tabellen der Vollständigkeit halber aufgeführt ist.

Abb. 4.6 zeigt einen Vergleich der relativen Häufigkeiten zwischen den untersuchten Gruppen. So weisen 88,0% der Patienten und 85,8% der Kontrollpersonen den Genotyp B/B auf. Bei der statistischen Analyse ergab sich zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypen ($\chi^2=0,555$, $p>0,1$).

Dieses Ergebnis zeigt, dass in der Patientengruppe keine höhere Frequenz des trpv6a-Allels vorliegt und somit die Häufigkeit eines Prostatakarzinoms bei Trägern dieser Variante nicht höher ist als bei Personen die den Genotyp B/B aufweisen.

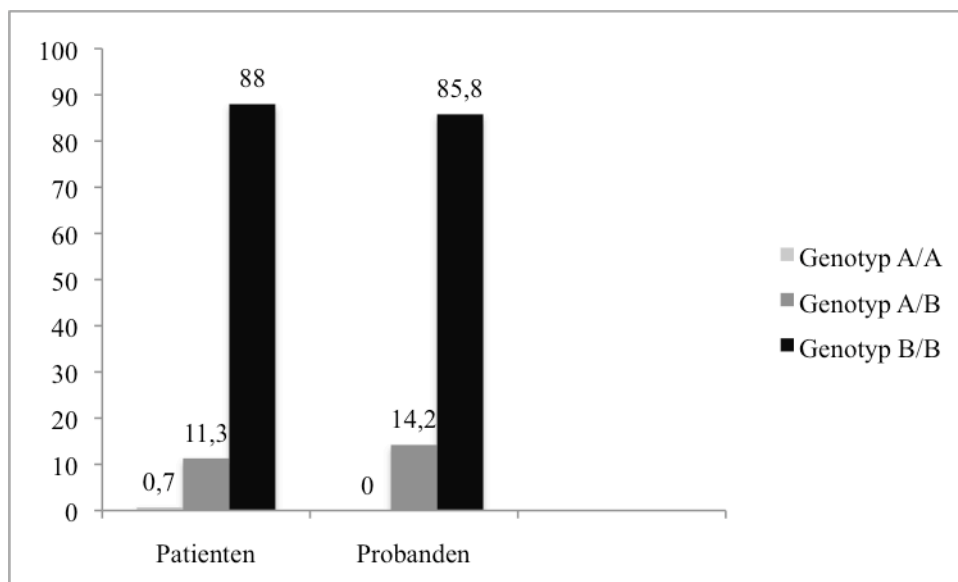


Abbildung 4.6:

Relative Häufigkeiten aller beobachteten trpv6-Genotypen in Patienten und Kontrollpersonen (Angaben in Prozent).

4.1.3 Untersuchung nach Ausbreitungsgrad des Primärtumors

Die Ausbreitung einer malignen Neoplasie eines soliden Gewebes kann mit der TNM-Klassifikation, die von der *Union internationale contre le cancer* (UICC) herausgegeben wird, beschrieben werden.

Dabei beschreibt -T- die Ausbreitung des Primärtumors hinsichtlich der Infiltration des Ursprungsorgans und der umliegenden Organe und Gewebe. -N- macht eine Angabe über das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und -M- über das Vorliegen von Fernmetastasen in anderen Organen oder Geweben (UICC 1970, 1976).

Bei der Untersuchung der Prostatakarzinompatienten hinsichtlich des Ausbreitungsgrades konnten 100 Proben verwendet werden, wobei ausschließlich der Ausbreitungsgrad des

Primärtumors (-pT-) berücksichtigt wurde. Die T-Klassifikation für das Prostatakarzinom definiert die im Folgenden dargestellten Ausbreitungsstadien des Primärtumors (Wittekind *et al.*, 2002):

- TX** Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0** kein Anhalt für einen Primärtumor
- T1** klinisch nicht erkennbarer, nicht palpabler, nicht durch Bildgebung darstellbarer Primärtumor
 - T1a zufällig histologisch entdeckte Neoplasie in $\leq 5\%$ des untersuchten Gewebes (inzidentelles Karzinom)
 - T1b zufällig histologisch entdeckte Neoplasie in $> 5\%$ des untersuchten Gewebes (inzidentelles Karzinom)
 - T1c Diagnose durch Biopsie (z.B. bei erhöhtem PSA-Wert)
- T2** Primärtumor auf die Prostata beschränkt
 - T2a beschränkt auf einen Prostatalappen oder weniger
 - T2b mehr als die Hälfte eines Prostatalappens betroffen
 - T2c beide Lappen betroffen
- T3** Primärtumor durchbricht die Organkapsel
 - T3a Primärtumor durchbricht die Organkapsel auf einer oder auf beiden Seiten
 - T3b Primärtumor infiltriert die Samenbläschen
- T4** Primärtumor infiltriert benachbarte Strukturen, z.B. Blasenhal, Rektum oder Beckenwand

Fixemer *et al.* (2003) konnten zeigen, dass TRPV6-Transkripte in Prostatakarzinomen, die die Organkapsel infiltriert oder überschritten hatten, signifikant häufiger nachweisbar waren als in Prostatakarzinomen, die auf das Organ begrenzt waren.

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob der heterozygote *trpv6*-Genotyp (A/B) mit einem erhöhten Risiko, ein die Organkapsel überschreitendes Prostatakarzinom zu entwickeln, in Beziehung gesetzt werden kann.

In Abb. 4.7 sind die absoluten Häufigkeiten der Prostatakarzinome (n=100) in den Stadien pT1 bis pT4 graphisch dargestellt. Es wird deutlich, dass die meisten untersuchten Prostatakarzinome in den Stadien pT2 und pT3 entfernt wurden.

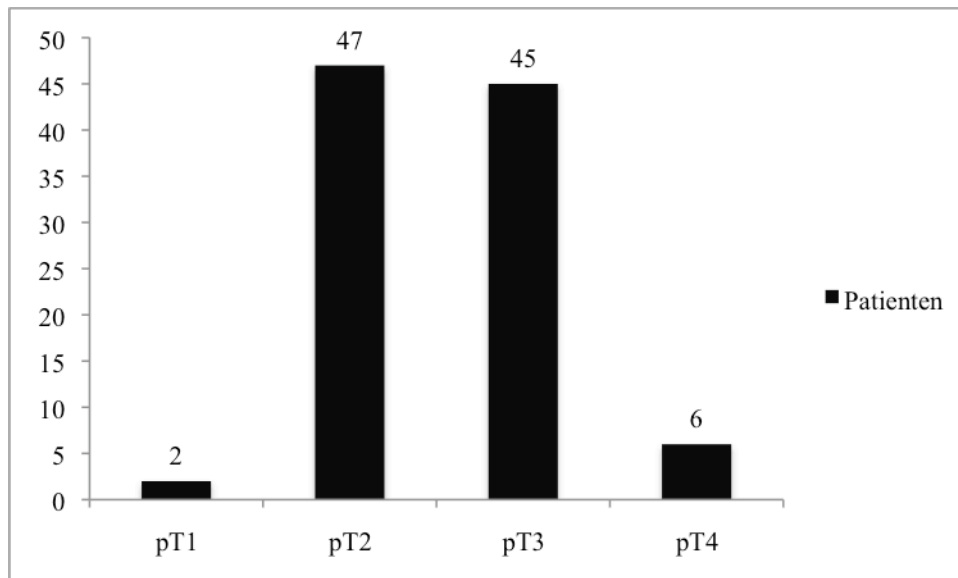


Abbildung 4.7:

Unterteilung der untersuchten Prostatakarzinomgewebeprobe nach Tumorstadien (TNM-System, absolute Häufigkeiten, n=100).

Da Prostatakarzinome mit infiltrierter Organkapsel mindestens den Ausbreitungsgrad pT3 aufweisen, wurden die Patientenproben in zwei Gruppen aufgeteilt, die sich an dieser Grenze orientieren. Da nur ein Patient mit dem Genotyp A/A gefunden wurde, wurde dieser für die statistische Analyse nicht berücksichtigt.

In Tab. 4.7 sind die absoluten Häufigkeiten der Genotypen angegeben und in Abb. 4.8 sind die relativen Häufigkeiten graphisch dargestellt. Die Genotypen beider Patientenkollektive sind nahezu identisch. Der Genotyp B/B ist sowohl bei Patienten, bei denen ein pT1- oder pT2-Tumor festgestellt wurde, am häufigsten (89,6%) wie auch bei Patienten mit pT3- oder pT4-Tumoren (88,2%).

Tabelle 4.7:

Absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen in den untersuchten Patientenproben nach Ausbreitungsstadium (n=99).

Genotyp	≤ pT2	≥ pT3
heterozygot	5	6
homozygot B	43	45
gesamt	48	51

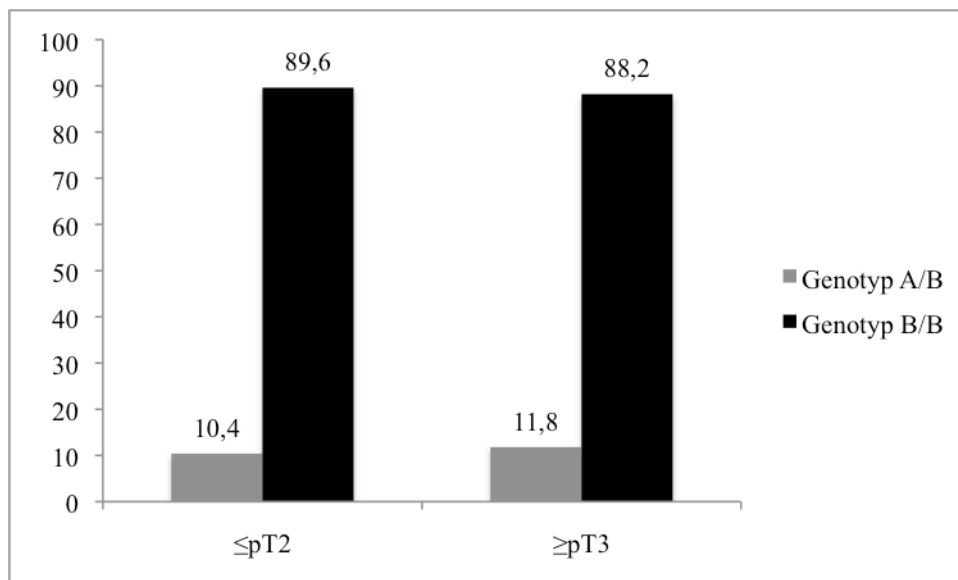


Abbildung 4.8:

Relative Häufigkeiten der beobachteten trpv6-Genotypen in Patientenproben nach Tumorstadium (n=99, Angaben in Prozent).

Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Verteilung der Genotypen in den beiden untersuchten Gruppen ($\chi^2=0,045$, $p>0.1$). Ein die Organkapsel infiltrierendes oder überschreitendes Prostatakarzinom ist also nicht häufiger bei Patienten mit Genotyp A/B anzutreffen als bei Patienten, die den Genotyp B/B aufweisen.

4.1.4 Untersuchung nach *Gleason-Score* des Primärtumors

Der *Gleason-Score* ist ein Wert, der im Rahmen der histopathologischen Untersuchung bestimmt wird und eine Aussage über den Differenzierungsgrad einer Prostataneoplasie macht. Er setzt sich aus zwei Gleason-Graden zusammen. Diese Gleason-Grade nehmen Werte von 1 bis 5 an und werden durch die Beurteilung von Drüsengröße, -form, -abstand, Stromainvasion und Herdgrenze bestimmt.

In einer Gewebeprobe werden die beiden anteilig am stärksten im untersuchten Gewebe vertretenen Gleason-Grade bestimmt und aus ihrer Summe der *Gleason-Score* gebildet. In Klammern werden die beiden Gleason-Grade als Summe angegeben, wobei der prozentual überwiegende (prädominante) Gleason-Grad an erster Stelle steht. Weist ein Gewebe zu über 95% nur einen Gleason-Grad auf, so wird dieser Grad verdoppelt. Der *Gleason-Score* kann theoretisch Werte von 2 (1+1) bis 10 (5+5) annehmen.

Ein *Gleason-Score* > 7 wird als Indiz für ein aggressives Wachstum angesehen und als unterstützender Parameter bei der Therapieentscheidung genutzt (Harnden *et al.*, 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass die TRPV6-Expression mit dem *Gleason-Score* korreliert. Bei Patienten mit hohen *Gleason-Scores* in der histologischen Diagnostik wurden signifikant häufiger trpv6-Transkripte nachgewiesen (Wissenbach *et al.*, 2004).

Im Folgenden wurde untersucht, ob der heterozygote trpv6-Genotyp (A/B) mit einem erhöhten Risiko, ein aggressiveres Prostatakarzinom zu entwickeln, in Verbindung gebracht werden kann. Zu diesem Zweck wurden die Patientenproben in zwei Gruppen unterteilt, als Grenze wurde ein *Gleason-Score* von 7 verwendet.

In Tab. 4.8 sind die absoluten Häufigkeiten der Genotypen in den untersuchten Gruppen angegeben und in Abb. 4.9 sind die relativen Häufigkeiten graphisch dargestellt.

Tabelle 4.8:

Absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen in den untersuchten Patientenproben nach *Gleason-Score* (n=90).

Genotyp	<i>Gleason-Score</i> <7	<i>Gleason-Score</i> ≥ 7
Genotyp A/B	3	7
Genotyp B/B	15	65
gesamt	18	72

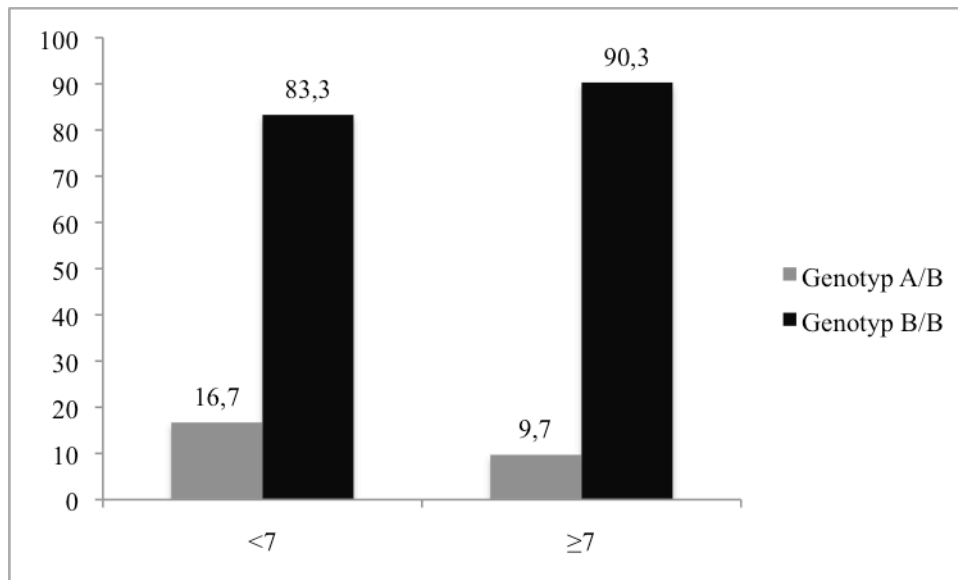


Abbildung 4.9:

Relative Häufigkeiten der beobachteten trpv6-Genotypen in Patientenproben nach *Gleason-Score* (n=90, Angaben in Prozent).

In die Gruppe *Gleason-Score* < 7 konnten nur 18 Patientenproben eingruppiert werden, daher ist die Fallzahl im Vergleich zur Gruppe *Gleason-Score* ≥ 7 mit 72 Proben gering. Trotzdem wird deutlich, dass der Anteil an Patienten mit dem heterozygoten Genotyp (A/B) in der Gruppe mit einem *Gleason-Score* < 7 mit 16,7% sogar geringer ist als in der Gruppe mit einem *Gleason-Score* ≥ 7 mit 9,7%.

Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Genotypen ($\chi^2=0,695$, $p>0,1$).

4.1.5 Untersuchung nach Alter zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors

Im Folgenden wurde untersucht, ob ein bestimmter trpv6-Genotyp mit einem höheren Risiko verbunden ist, in jüngerem Alter an Prostatakrebs zu erkranken.

Die Patienten, bei denen das Alter bei der Prostatektomie bekannt war, wurden in Gruppen eingeteilt, die sich an den unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten (Crawford, 2003), ein Prostatakarzinom zu entwickeln, orientieren:

- ≤ 39 Jahre (*Very-early-onset PCA*).
- 40 – 59 Jahre (*Early-onset PCA*).
- ≥ 60 Jahre (*Late-onset PCA*).

Im untersuchten Patientenkollektiv befand sich kein Patient, der in die Gruppe *Very-early-onset PCA* einzuteilen war. Des Weiteren wurde der Patient mit dem homozygoten *trpv6a*-Genotyp (A/A) bei der statistischen Analyse nicht berücksichtigt.

In Tab. 4.9 sind die absoluten Häufigkeiten der Genotypen angegeben und in Abb. 4.10 sind die relativen Häufigkeiten graphisch dargestellt.

Tabelle 4.9:

Absolute Häufigkeiten der beobachteten Genotypen in den untersuchten Patientenproben nach Alter bei Prostatektomie (n=98; *Early-onset* <60 Jahre, *Late-onset* \geq 60 Jahre).

Genotyp	<i>Early-onset PCA</i>	<i>Late-Onset PCA</i>
Genotyp A/B	1	10
Genotyp B/B	16	71
gesamt	17	81

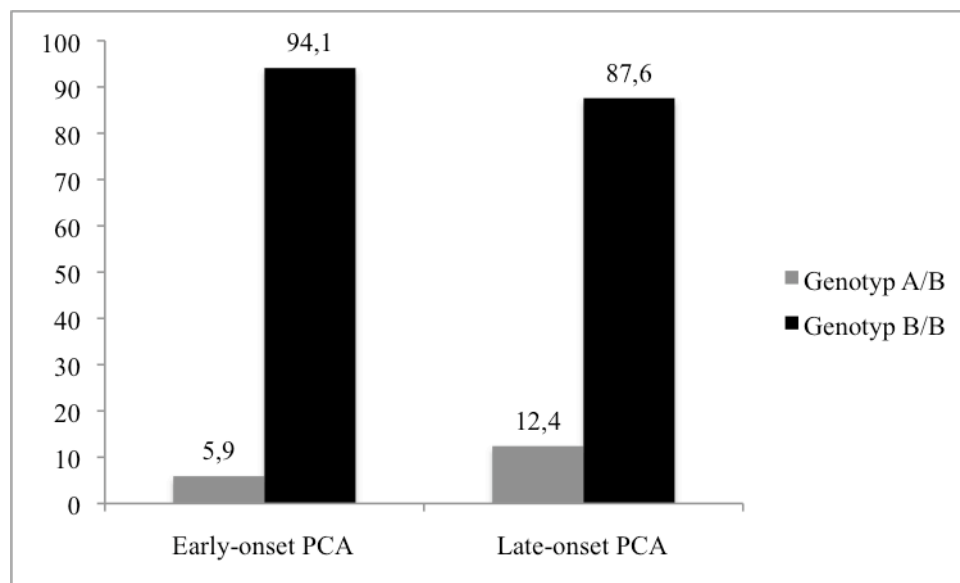


Abbildung 4.10:

Relative Häufigkeiten der beobachteten *trpv6*-Genotypen in Patientenproben nach Alter bei Prostatektomie (n=98, Angaben in Prozent).

Aus Abb. 4.10 wird ersichtlich, dass der Anteil an Patienten mit heterozygotem Genotyp (A/B) in der Gruppe der jüngeren Patienten um 6,5% geringer ist als in der Gruppe der älteren

Patienten. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Genotypen zwischen den beiden untersuchten Gruppen ($\chi^2=0,59$, $p>0,1$).

Die geringe Fallzahl in der Gruppe *Early-onset PCA* spiegelt die Tatsache wider, dass Prostatakarzinome bei Männern der entsprechenden Alterstufen seltener auftreten.

4.2 Untersuchung der TRPV6-Expression in Prostatakarzinomgewebe mit RT-PCR

Mit In-situ-Hybridisierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Kationenkanal TRPV6 nur in karzinomatös verändertem Prostatagewebe exprimiert wird, nicht hingegen in gesundem Prostatagewebe oder Gewebeproben aus BPH-Gewebe (Fixemer *et al.*, 2003). Dies war bereits durch Northern-Blot-Untersuchungen gezeigt worden (Wissenbach *et al.*, 2001).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, an Stichproben der untersuchten Prostatagewebe zu überprüfen, ob *trpv6*-Transkripte auch in diesen Proben mit RT-PCR nachgewiesen werden können. Zu diesem Zweck wurden fünf Prostatagewebeproben mit einem Tumorausbreitungsstadium \geq pT2c untersucht, da frühere Experimente gezeigt hatten, dass in diesen Ausbreitungsstadien typischerweise TRPV6-Transkripte nachweisbar waren (Fixemer *et al.*, 2003).

Aus den fünf Gewebeproben wurde Gesamt-RNA isoliert, die als Matrize für eine Erststrangsynthese mit einem Oligo-dT-Primer verwendet wurde. Dieser Erststrang diente wiederum als Matrize für eine PCR mit *trpv6*-spezifischen Primern.

Als Kontrolle wurde die mRNA der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HGPRT1) mit den spezifischen Primern 637 und 638 nachgewiesen, da dieses Enzym in allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert wird. Als Ergebnis wurde ein PCR-Produkt der Länge 220 bp erwartet. Als zweite Kontrolle wurde die cDNA für den Kationenkanal TRPM4 mit den spezifischen Primern 780 und 781 (erwartete Bandenlänge: 227 bp) nachgewiesen, da TRPM4 in Prostatagewebe exprimiert wird (Nilius *et al.*, 2003). Die Kontrollen dienen dem Nachweis, dass die RNA-Isolation und die Erststrangsynthese erfolgreich waren.

Zum Nachweis von TRPV6 wurden die Primerpaare 776/ 777 (erwartete Bandenlänge: 198 bp) und 778/ 779 (erwartete Bandenlänge: 406 bp) verwendet.

Um eine Fehlinterpretation bei einer Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde die Lage der Primer so gewählt, dass bei allen verwendeten Primerpaarungen Abschnitte flankiert wurden, die auf genomischer Ebene Intronsequenzen enthalten. Die Sequenz eines Primers jeder Paarung wurde außerdem so gewählt, dass sie zu Sequenzen des

nicht-translatierten Bereiches komplementär ist, um eine Fehlinterpretation bei Kontamination mit trpv6-cDNA aus in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Plasmiden zu vermeiden. Die PCR-Produkte wurden auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

In Tab. 4.10 ist das Ergebnis der Expressionsanalyse aufgeführt.

Abb. 4.11 zeigt die Lage der trpm4- und trpv6-spezifischen Primer.

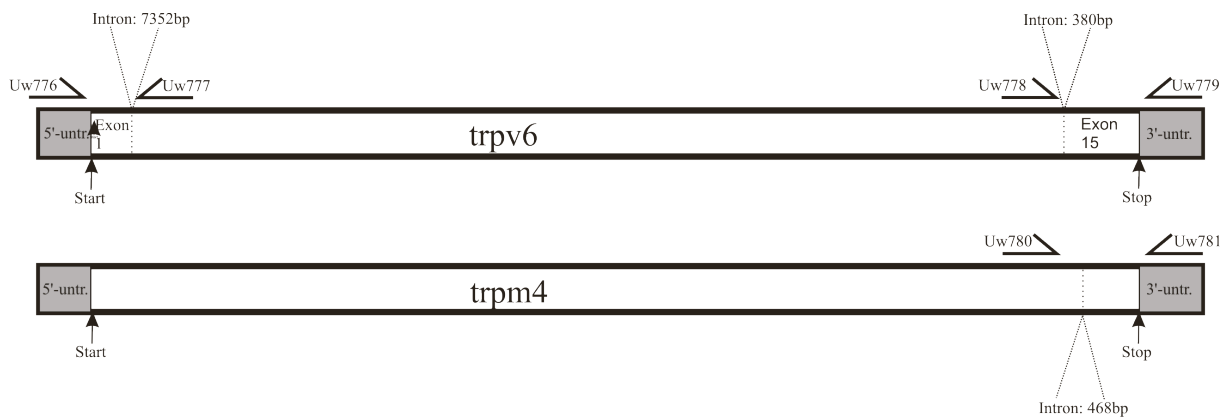


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Lage der Primer 776 bis 781.

Als Exon 1 wird das Exon bezeichnet, welches das Start-Codon enthält; Exon 15 enthält das Stop-Codon (untr. = nicht-translatierter Bereich; zusätzlich sind die bei Kontamination mit genomischer DNA zusätzlich amplifizierte Intronabschnitte dargestellt).

Tabelle 4.10:

Ergebnis der Expressionsanalyse mit RT-PCR (+: Expression nachweisbar).

Gewebeprobe	Stadium	HGPRT1	TRPM4	TRPV6
PCA 3	pT2c	+	+	+
PCA 19	pT3b	+	+	+
PCA 20	pT3b	+	+	+
PCA 27	pT3b	+	+	+
PCA 87	pT3b	+	+	+

In allen untersuchten Proben konnten HGPRT1-, TRPM4- und TRPV6-Transkripte nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass Fragmente von *trpv6*-mRNA amplifiziert werden konnten, zeigte, dass das *trpv6*-Gen im karzinomatös veränderten Prostatagewebe transkribiert wird und bestätigt die von Wissenbach *et al.* (2001) und Fixemer *et al.* (2003) gemachten Beobachtungen.

4.3 Untersuchungen zur Kopplung der Polymorphismen

Wissenbach *et al.* (2001) beschrieben, dass fünf Nukleotidpolymorphismen (SNPs), die die Allelvarianten a und b des *trpv6*-Gens definieren, gekoppelt aufzutreten scheinen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, an weiteren Proben zu untersuchen, ob eine Kopplung der SNPs vorliegt. Zu diesem Zweck wurden einige der untersuchten Proben von Kontrollpersonen und Patienten zusätzlich anhand des ersten, vierten und fünften Polymorphismus genotypisiert.

Der erste Polymorphismus kann wie der zweite Polymorphismus durch eine RFLP-Analyse untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde mit den *trpv6*-spezifischen Primern 430 und 431 ein 748 bp großes Fragment amplifiziert, das den ersten Polymorphismus enthält. Die RFLP-Analyse wurde mit der Restriktionsendonuklease *FauI* durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit stellte die RFLP-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *AciI* dar, die in der Regel zusätzlich durchgeführt wurde.

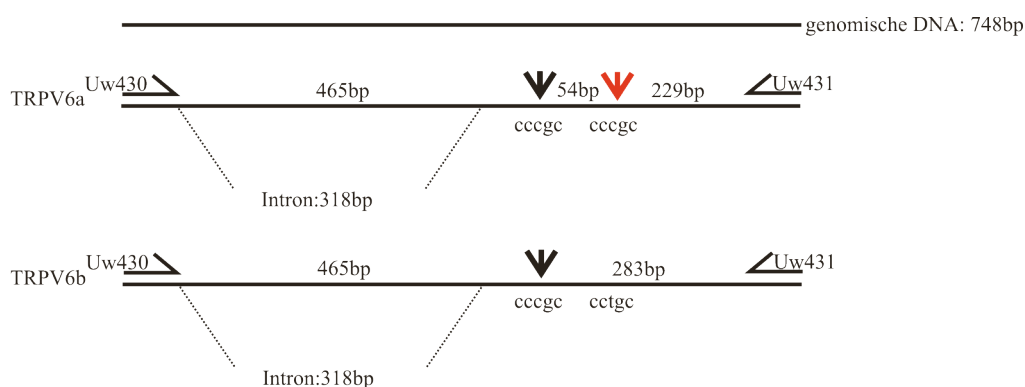


Abbildung 4.12: Prinzip der RFLP-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *FauI*.

Durch Verwendung der Primer 430 und 431 kann ein genomisches Fragment der Länge 748bp des *trpv6*-Gens amplifiziert werden (oben). Dieses Fragment enthält den ersten Polymorphismus (siehe auch Abb. 2.1) der cDNA des *trpv6*-Gens sowie ein Intron der Länge 318bp. Durch den 1. Polymorphismus entsteht eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *FauI* innerhalb des *trpv6a*-Allels (roter Pfeil, Mitte). Eine Restriktion des *trpv6a*-Allels mit *FauI* ergibt Fragmente der Längen 465bp, 54bp und 229, da sowohl *trpv6a*-

als auch trpv6b-Allele eine weitere FauI-Schnittstelle enthalten (schwarze Pfeile). Wird das trpv6b-Allel mit FauI geschnitten, so ergeben sich Fragmente der Längen 465bp und 283bp (unten).

Durch den Nukleotidaustausch Cytosin (trpv6a) gegen Thymin (trpv6b) an der Stelle des ersten Polymorphismus fehlt in der Variante b eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease FauI. Die beiden Varianten und die resultierenden Genotypen konnten durch die Bandenlängen der entstandenen Fragmente identifiziert werden.

Anhand der Darstellung in Abb. 4.12 kann der Nachweis der verschiedenen Genotypen nachvollzogen werden:

- homozygoter A-Genotyp: 465, 229, 54bp.
- homozygoter B-Genotyp: 465, 283 bp.
- heterozygoter Genotyp: 465, 283, 229, 54 bp.

Die Restriktionsfragmente wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und ihrer Länge nach, wie in Abb. 4.13 dargestellt, elektrophoretisch aufgetrennt.

Der 1. Polymorphismus von 22 Proben wurde genotypisiert; das Ergebnis ist in Tab. 4.11 dargestellt.

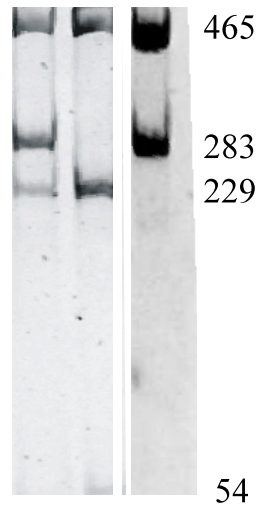


Abbildung 4.13: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP).

Aus genomischer DNA von drei Probanden wurde mit den Primern 430 und 431 ein genomisches Fragment des *trpv6b*-Gens amplifiziert (vgl. Abb. 4.12). Die *trpv6*-Fragmente wurden mit *FauI* verdaut und elektrophoretisch getrennt. Aus dem Bandenmuster lässt sich der *trpv6*-Genotyp ableiten. Spur 1: Genotyp A/B, Spur 2: Genotyp A/A, Spur 3: Genotyp B/B.

Tabelle 4.11: Ergebnis der Genotypisierung der untersuchten Proben anhand des 1. Polymorphismus durch RFLP-Analyse (*FauI*).

Das Ergebnis der Genotypisierung anhand des 2. Polymorphismus (RFLP-Analyse, s.o.) ist zum Vergleich zusätzlich angegeben.

Probennummer	Genotyp 2. Polymorphism.	Genotyp 1. Polymorphism.
PCA 3	B/B	B/B
PCA 19	B/B	B/B
PCA 20	B/B	B/B
PCA 27	B/B	B/B
PCA 88	A/A	A/A
PCA 21	A/B	A/B
PCA 28	A/B	A/B
PCA 30	A/B	A/B
PCA 48	A/B	A/B
PCA 51	A/B	A/B

PCA 65	A/B	A/B
PCA 74	A/B	A/B
PCA 79	A/B	A/B
PCA 80	A/B	A/B
PCA 82	A/B	A/B
PCA 87	A/B	A/B
G3	A/B	A/B
G13	A/B	A/B
G14	A/B	A/B
G16	A/B	A/B
G18	A/B	A/B
G20	A/B	A/B

Wie aus Tab. 4.11. ersichtlich wurde in allen untersuchten Proben anhand des 1. Polymorphismus der gleiche Genotyp bestimmt, der durch die RFLP-Analyse des 2. Polymorphismus angenommen wurde.

Die Polymorphismen 4 und 5 konnten nicht durch RFLP-Analysen untersucht werden. Daher wurden bei fünf Proben die Genabschnitte, die die betreffenden Polymorphismen enthalten, mit den spezifischen Primerpaaren 763/ 764 oder 778/ 779 amplifiziert und die Fragmente in mindestens zehn unabhängigen Klonen sequenziert. Das Ergebnis dieser Proben ist in Tab. 4.12 angegeben.

Tabelle 4.12: Ergebnis der Genotypisierung der untersuchten Proben anhand des 4. und des 5. Polymorphismus durch Sequenzierung.

Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Genotypisierung anhand des 1. und 2. Polymorphismus (RFLP-Analyse, s.o.) zusätzlich angegeben (n=5).

Probennummer	Genotyp 1. Polymorphism.	Genotyp 2. Polymorphism.	Genotyp 4. Polymorphism.	Genotyp 5. Polymorphism.
PCA 3	B/B	B/B	B/B	B/B
PCA 19	B/B	B/B	B/B	B/B
PCA 20	B/B	B/B	B/B	B/B
PCA 27	B/B	B/B	B/B	B/B

PCA 88	A/A	A/A	A/A	A/A
--------	-----	-----	-----	-----

Tab. 4.12 zeigt, dass in diesen untersuchten Proben der anhand des ersten und zweiten Polymorphismus bestimmte Genotyp bestätigt wurde, d.h. in allen Fällen liegen die Polymorphismen gekoppelt vor.

Einen Sonderfall stellt eine weitere untersuchte Probe eines Patienten (PCA 87) dar. Hier konnte mittels RFLP-Analysen gezeigt werden, dass die Polymorphismen 1 und 2 den heterozygoten trpv6-Genotyp (A/B) widerspiegeln (Tab. 4.11). Zur Überprüfung des 4. und 5. Polymorphismus wurde mit den spezifischen Primern 778 und 779 das entsprechende Fragment aus genomischer DNA amplifiziert und kloniert. Insgesamt wurden 37 unabhängige Klone sequenziert. Es zeigte sich, daß diese Klone vier verschiedene genomische trpv6-Sequenzen aufweisen. Wie erwartet wurden sowohl trpv6a-Allele (8.1% der Klone) wie auch trpv6b-Allele (43,2% der Klone) gefunden. Zusätzlich wurden aber zwei Mischvarianten gefunden: Eine Variante, bei der der 4. Polymorphismus dem trpv6a-Allel und der 5. Polymorphismus dem trpv6b-Allel entspricht (15.8% der Klone) und eine Variante, bei der der umgekehrte Fall vorliegt, d.h. der 4. Polymorphismus entspricht dem trpv6b-Allel und der 5. Polymorphismus entspricht dem trpv6a-Allel (10.5% der Klone, Tab. 4.13).

Abb. 4.14 zeigt eine schematische Darstellung der trpv6-Allelvarianten der Probe PCA 87.

Tabelle 4.13: Sequenzierung von trpv6-Allelvarianten der Probe PCA 87.

Ausgehend von genomischer DNA als Template wurden Fragmente des trpv6-Gens amplifiziert, die den 4. und 5. Polymorphismus enthalten. Insgesamt wurden 37 unabhängige genomische Fragmente kloniert und sequenziert. Es wurden sowohl trpv6a- (aa) als auch trpv6b-Allele (bb) nachgewiesen sowie zwei Mischvarianten (ab, ba).

Variante	4. Polymorphism.	5. Polymorphism.	Häufigkeit
aa (trpv6a)	a	a	3 (8,1%)
bb (trpv6b)	b	b	16 (43,2%)
ab	a	b	10 (27,0%)
ba	b	a	8 (21,6%)

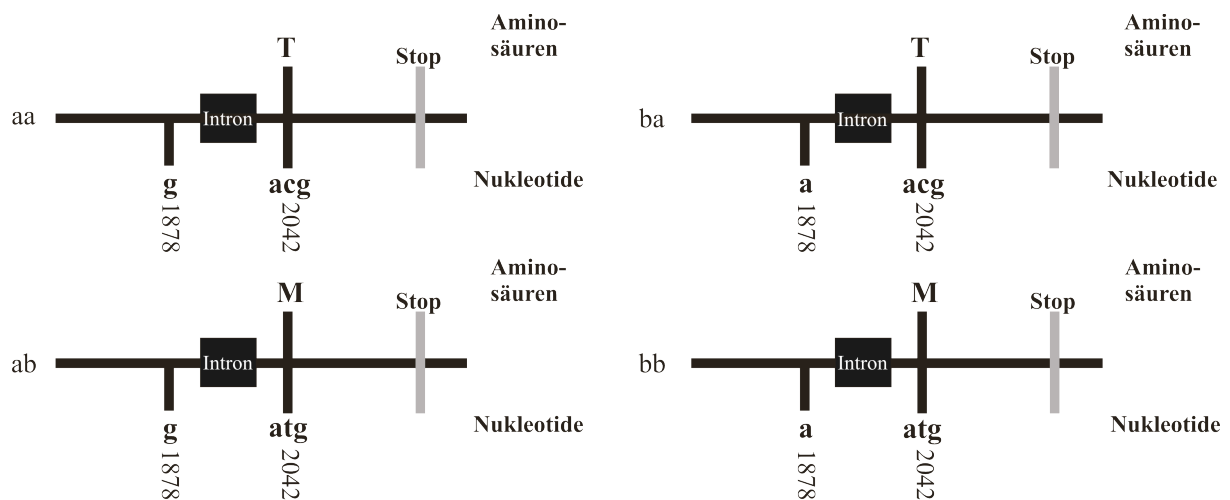


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung von trpv6-Allelvarianten der Probe PCA 87.

Ein genomisches Fragment des trpv6-Gens, das die Polymorphismen 4 und 5 sowie ein Intron (380bp) enthält, wurde mit den Primern 778 und 779 amplifiziert. Das Fragment wurde kloniert und 37 unabhängige Klone wurden sequenziert. Es wurden insgesamt vier verschiedene trpv6-Allelvarianten identifiziert: das trpv6a-Allel (aa, oben links), das trpv6b-Allel (bb, unten rechts) sowie zwei Mischvarianten (ab, ba). Bei einer Variante entspricht der 4. Polymorphismus dem trpv6b-Allel und der 5. Polymorphismus dem trpv6a-Allel (oben rechts, ba-Mischvariante) und die umgekehrte Zuordnung (unten links, ab-Mischvariante).

Das Ergebnis warf die Frage auf, ob die vier genomischen trpv6-Allelvarianten exprimiert werden. Aus der Probe PCA 87 wurde daher mRNA isoliert und mittels RT-PCR unter Verwendung der Primer 778 und 779 ein cDNA-Fragment erzeugt. Dieses Fragment wurde kloniert und 19 individuelle Klone wurden sequenziert. Es wurden ebenfalls vier verschiedene trpv6-Allelvarianten gefunden (Abb. 4.15). Die Häufigkeit der einzelnen trpv6-Allelvarianten ist in Tab. 4.14 aufgelistet. Das Ergebnis zeigt, dass die vier auf genomischer Ebene identifizierten trpv6-Allelvarianten auch auf cDNA-Ebene nachweisbar sind und demzufolge auch exprimiert werden.

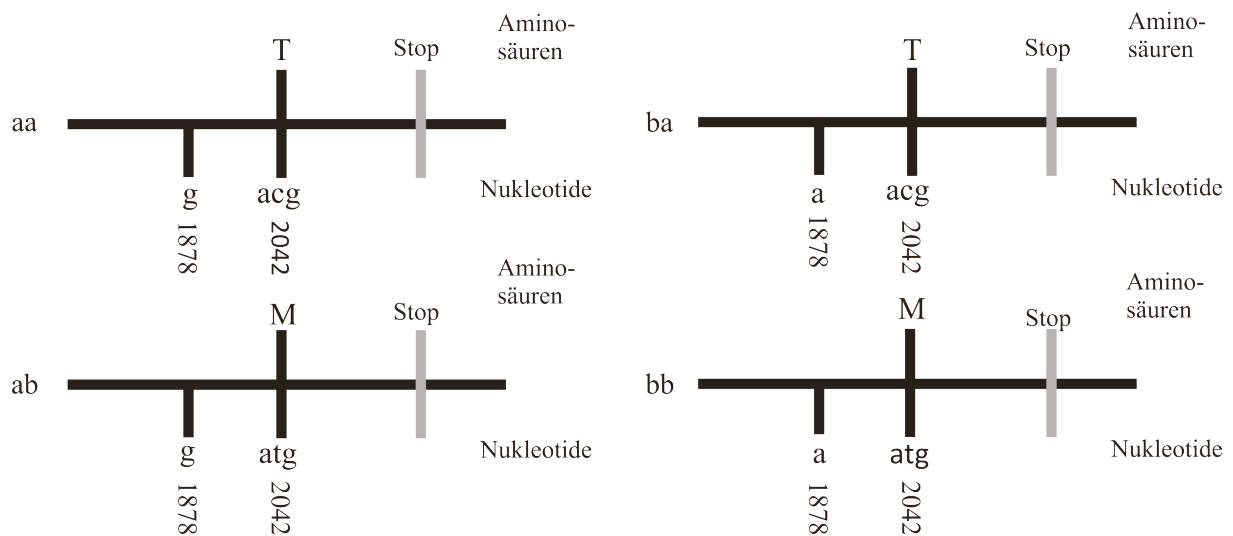


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung der auf cDNA-Ebene isolierten trpv6-Allelvarianten der Probe PCA 87.

Unter Verwendung der Primer 778 und 779 wurde aus der Probe PCA 87 durch mRNA-Extraktion und RT-PCR ein Fragment der trpv6-cDNA, das den 4. und 5. Polymorphismus enthält, amplifiziert. Das Fragment wurde kloniert und 19 unabhängige Klone wurden sequenziert. Insgesamt wurden vier verschiedene trpv6-Allelvarianten gefunden, die den in Abb. 4.14 gezeigten genomischen Klonen entsprechen.

Tabelle 4.14: Isolierung von genomischen trpv6-Allelvarianten der Probe PCA 87.

Amplifikation von cDNA Fragmenten, die den 4. und 5. Polymorphismus der trpv6-cDNA enthalten. Insgesamt wurden 19 unabhängige cDNA-Fragmente kloniert und sequenziert.

Variante	4. Polymorphism.	5. Polymorphism.	Häufigkeit
aa (trpv6a)	a	a	2 (10,5%)
bb (trpv6b)	b	b	12 (63,2%)
ab	a	b	3 (15,8%)
ba	b	a	2 (10,5%)

Aus dem Vergleich der Häufigkeiten der trpv6-Allelvarianten, die aus genomischer und aus cDNA amplifiziert wurden, lässt sich ableiten, dass in beiden Fällen trpv6b-Allele am häufigsten nachgewiesen wurden. 63.2% der cDNA-Klone und 43.2% der genomischen Klone wiesen trpv6b-Allele auf, während die anderen allelischen Varianten deutlich

unterrepräsentiert waren. Frühere Daten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass in Geweben wie Plazentagewebe mit dem heterozygoten Genotyp (A/B) auf cDNA-Ebene die Anzahl der gefundenen trpv6a und trpv6b-Allele ungefähr gleich groß ist, d.h. trpv6a- und trpv6b-Allele werden in ungefähr gleichen Mengen exprimiert (U. Wissenbach, persönliche Kommunikation). Möglicherweise spiegelt die erhöhte trpv6b-Allelhäufigkeit, die sowohl auf genomischer wie auch auf cDNA-Ebene nachgewiesen wurde, eine Genamplifikation des trpv6b-Allels im Prostatgewebe der Probe PCA 87 wider. Ein Verlust des trpv6a-Allels im Karzinomareal könnte beispielsweise ebenfalls die ungleichen Frequenzen von trpv6a- und trpv6b-Allelen erklären.

Ein *Crossing-over* zwischen trpv6a- und trpv6b-Allelen könnte zu den Mischvarianten (ab, ba) geführt haben. Ein solches *Crossing-over* ist extrem selten, da der Abstand zwischen dem 4. und dem 5. Polymorphismus des trpv6-Gens auf genomischer Ebene nur 544 Basen beträgt.

4.4 Einführung von Mutationen in die trpv6b-Sequenz

Wie in 2.2 dargestellt führt die Überexpression von TRPV6a- und TRPV6b-Proteinen zu funktionellen kalziumpermeablen Kanälen, die sich elektrophysiologisch nicht unterscheiden. Die Einführung von Mutationen, die die elektrophysiologischen Eigenschaften von TRPV6 verändern, könnte dazu führen, dass Unterschiede in der Funktion demaskiert werden, die bei der Überexpression des Wildtyp-TRPV6-Proteins nicht messbar sind.

Führt man eine Mutation in das Kanalprotein TRPV3 ein, bei der ein Glycin im S4-S5-Loop gegen ein Cystein bzw. Serin ausgetauscht wird, so hat dies die konstitutive Aktivierung des Kanals zur Folge (Xiao *et al.*, 2008). Bei Mäusen bzw. Ratten, die diese *Gain of function*-Mutation tragen, fällt dies durch fehlendes Haarwachstum auf (Asakawa *et al.*, 2006, Imura *et al.*, 2007).

Die folgenden TRPV6b-Konstrukte wurden durch Quik-Change-*In-vitro*-Mutagenese (Stratagene) der entsprechenden Wildtyp-Konstrukte und Umklonierung in den Expressionsvektor pCAGGS-IRES-GFP-M2 (Abb. 4.17 und 4.18) hergestellt:

- pCAGGS-IRES-GFP-M2_hTRPV6b_G503C (M1 = Mutation 1)
- pCAGGS-IRES-GFP-M2_hTRPV6b_G503S (M2 = Mutation 2)

Dadurch wurden TRPV6b-Mutanten erzeugt, die einen Aminosäureaustausch in der intrazellulären Peptidkette zwischen den Transmembrandomänen S4 und S5 aufweisen (siehe auch Abb. 5.1).

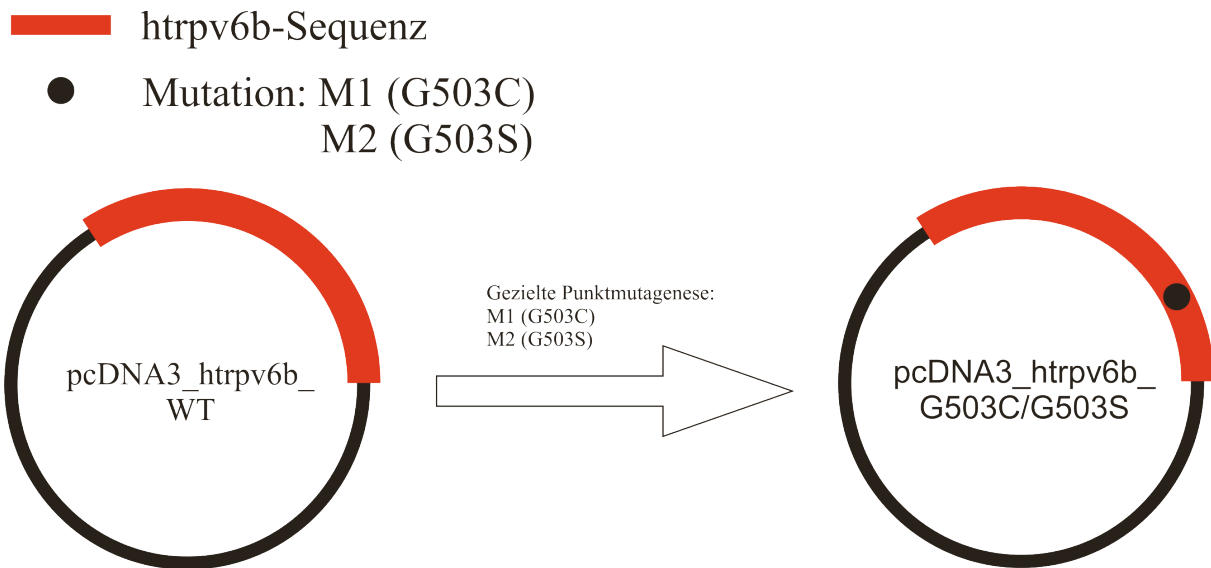


Abbildung 4.16: Strategie für die Einführung der Mutationen M1 und M2 in die humane cDNA des trpv6b-Allels.

Mittels *In vitro*-Mutagenese (Primer: Mutation G503C: 771/ 772; Mutation G503S: 773/774) wurde in das trpv6b-Allel jeweils eine Punktmutation eingeführt. Der Austausch des Glycins 503 (G) zu Cystein (C) oder zu Serin (S) führt zu den Plasmiden M1 und M2.

Die durchgeführte Sequenzanalyse der beiden Konstrukte zeigte, dass die erwarteten Mutationen an der entsprechenden Position in der humanen trpv6b-Sequenz eingeführt wurden. In Translationsanalysen der mutierten Nukleotidsequenzen wurden die veränderten Aminosäuresequenzen wiedergegeben. Die betreffenden Ausschnitte der Sequenz sind hier dargestellt:

L <u>G</u> P F T I M I Q K M	TRPV6b-Wildtyp
L <u>C</u> P F T I M I Q K M	Mutation 1 (M1)
L <u>S</u> P F T I M I Q K M	Mutation 2 (M2)

Im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz ist die Aminosäure Glycin (G) an Position 503 bei der Mutante M1 gegen die Aminosäure Cystein (C) und bei M2 gegen die Aminosäure Serin (S) ausgetauscht worden.

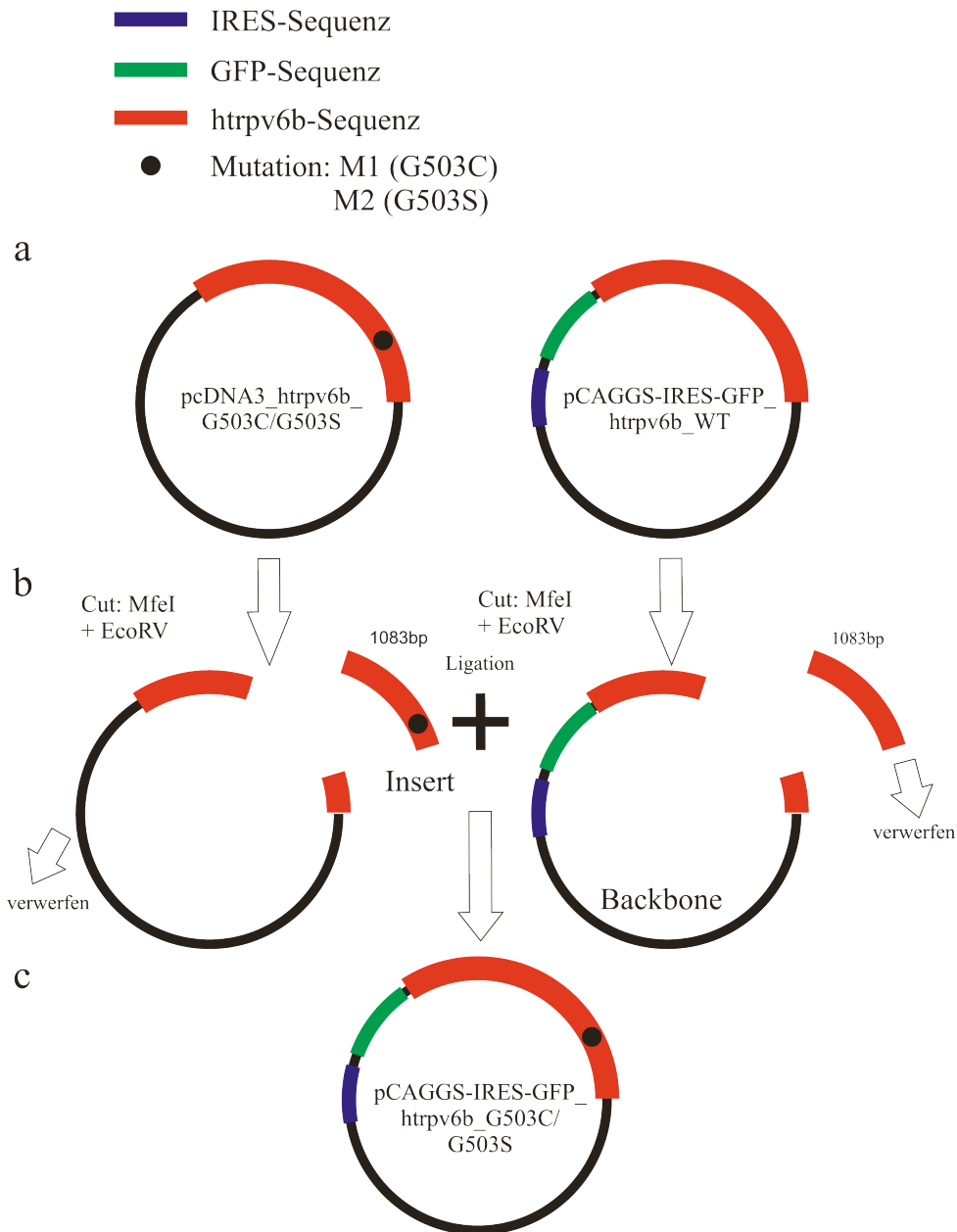


Abbildung 4.17: Schematische Darstellung der Strategie zur Umklonierung der Mutationen M1 und M2 in den Expressionsvektor pCAGGS-IRES-GFP_hTRPV6b_WT (a, rechts). Der Expressionsvektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV und MfeI verdaut und das Fragment, das die Plasmid-DNA und N- sowie C-terminale Sequenzen der trpv6-cDNA beinhaltet, isoliert (Backbone, siehe b). Die durch Mutagenese erzeugten Konstrukte (a, siehe auch Abb. 4.16) wurden ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen MfeI und EcoRV verdaut und das die Mutation tragende Fragment der trpv6b-cDNA (Insert, b) wurde jeweils (M1, M2) isoliert. Insert und Backbone wurden durch Ligation verknüpft und nach der Transformation in kompetente Zellen konnten die Plasmide der Zielkonstrukte (c) in großem Maßstab isoliert werden.

In nachfolgenden Experimenten soll untersucht werden, inwieweit sich die mutierten TRPV6-Kanäle M1 und M2 vom Wildtyp Protein in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften unterscheiden. Die Untersuchungen waren nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit.

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen den Allelvarianten trpv6a und trpv6b und dem Auftreten des Prostatakarzinoms

Das trpv6-Gen kodiert einen kalziumselektiven Ionenkanal, der vermutlich am transzellulären Kalziumtransport durch die Trophoblastenschicht der Plazenta beteiligt ist. Transkripte des trpv6-Gens wurden in menschlicher Plazenta, pankreatischen Azinuszellen und Speicheldrüsen nachgewiesen (Wissenbach *et al.*, 2001). Zusätzlich wurden Transkripte in verschiedenen maligne entarteten Geweben wie Prostata- und Mammakarzinomen nachgewiesen (Wissenbach *et al.*, 2001, Zhuang *et al.*, 2002, Fixemer *et al.*, 2003, Bolanz *et al.*, 2008).

In der kaukasischen Bevölkerung sind zwei trpv6-Allele, trpv6a und trpv6b, nachweisbar, die sich in fünf Polymorphismen unterscheiden, welche typischerweise gekoppelt vorliegen. In der kaukasischen Bevölkerung kommt das trpv6b-Allel häufiger vor als das trpv6a-Allel. Ungefähr 86% der kaukasischen Bevölkerung weisen den homozygoten trpv6b-Genotyp (B/B) auf, während der homozygote trpv6a-Genotyp (A/A) außerordentlich selten ist (0,3%). Trpv6a-Allele wurden hingegen wesentlich häufiger in afrikanisch-stämmiger Bevölkerung nachgewiesen (Akey *et al.*, 2006).

Wie bereits beschrieben sind TRPV6-Transkripte in organkapselüberschreitenden und metastasierten Prostatakarzinomen nachweisbar. In einer Studie mit 140 Patienten konnte gezeigt werden, dass bei ~90% der Patienten mit bereits metastasiertem Prostatakarzinom TRPV6-positive Tumore nachweisbar waren (Fixemer *et al.*, 2003). Bei afrikanisch-stämmigen Amerikanern wurde gezeigt, dass die Prostatakarzinom-Prävalenz 2-3-fach höher ist als bei Amerikanern europäischer Abstammung (Crawford, 2003).

Diese Daten werfen die Frage auf, ob das Vorliegen von trpv6a-Allelen positiv mit der Entstehung oder Progression des Prostatakarzinoms korreliert. Da in der kaukasischen Bevölkerung hauptsächlich der homozygote trpv6b-Genotyp (B/B) und der heterozygote Genotyp (A/B) vorliegen, wurde untersucht, ob Patienten mit einem diagnostizierten Prostatakarzinom im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen eine erhöhte trpv6a-Allelfrequenz aufweisen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, erstmals zu überprüfen, ob das heterozygote Vorliegen der Allelvariante trpv6a in kaukasisch-stämmiger Bevölkerung mit einem erhöhten Risiko, ein

Prostatakarzinom zu entwickeln, assoziiert ist. Zu diesem Zweck wurden 142 Prostatakarzinompatienten und 169 gesunde Kontrollpersonen bezüglich ihrer trpv6-Allele genotypisiert.

Bei den 311 untersuchten Personen wurden die drei möglichen Genotypen beobachtet: eine Person wies den homozygoten trpv6a-Genotyp auf (A/A), 270 Personen wiesen den homozygoten trpv6b-Genotyp (B/B) auf und 40 Personen waren heterozygot (A/B), wiesen also je ein trpv6a- und ein trpv6b-Allel auf. Die Häufigkeit der einzelnen Genotypen bestätigte die Ergebnisse von Genotypisierungsuntersuchungen des Hapmap-Projekts, in denen nahezu gleiche Genotyp-Frequenzen in der europäisch-stämmigen Bevölkerung Nordamerikas gefunden wurden (www.hapmap.org).

Es konnte in dieser Arbeit anhand der Hardy-Weinberg-Gleichung gezeigt werden, dass bei einem entsprechenden Probenvolumen die Beobachtung des homozygoten trpv6a-Genotyps (A/A) in der kaukasischen Bevölkerung erwartet werden kann. Tatsächlich wurde berechnet, dass innerhalb der kaukasischen Bevölkerung der homozygote trpv6a-Genotyp (A/A) in ~0,46% zu erwarten wäre. In dieser Studie war der Anteil des homozygoten trpv6a-Genotyps (A/A) 0,32%, d.h. er wurde in einem Patienten nachgewiesen. Innerhalb der Kontrollgruppe wurde dieser Genotyp nicht nachgewiesen, daher wurde das Ergebnis der Probe dieses Patienten für statistische Analysen nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund konnte nur überprüft werden, ob das Vorliegen der trpv6a-Variante beim heterozygoten Genotyp (A/B) einen Risikofaktor für die Karzinomentstehung in der Prostata darstellt.

Im Vergleich zwischen gesunden männlichen Probanden und Patienten konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypen A/B und B/B festgestellt werden: 14,1% der männlichen Kontrollpersonen und 11,3% der Prostatakarzinompatienten wiesen den heterozygoten Genotyp auf. Es kann also davon ausgegangen werden, dass heterozygote Träger der trpv6a-Variante kein erhöhtes Prostatakarzinomrisiko im Vergleich zu homozygoten Trägern der trpv6b-Variante haben.

Ein zu berücksichtigendes Problem der Kontrollgruppe ist, dass auch Männer berücksichtigt wurden, die im Laufe ihres Lebens ein Prostatakarzinom entwickeln können und somit aus der Kontrollgruppe in die Patientengruppe wechseln würden. Dieses Problem ließe sich nur vermeiden, wenn man ausschließlich Männer in höherem Alter berücksichtigen würde, die nachweislich nicht unter einem auch nur mikroskopisch diagnostizierbaren Prostatakarzinom

leiden. Allerdings ist diese Möglichkeit organisatorisch und diagnostisch nur schwer zu bewältigen, wenn man berücksichtigt, dass 50% aller 70-80-jährigen Männer histologische Anzeichen eines malignen Prozesses der Prostata aufweisen (Carter *et al.*, 1994).

Im Vergleich zwischen Patienten im Alter zwischen 40 und 59 Jahren (*Early-onset*) und Patienten über 60 Jahren (*Late-onset*) konnte kein Unterschied in der Verteilung des heterozygoten (A/B) und des homozygoten trpv6b-Genotyps (B/B) festgestellt werden (Häufigkeit Genotyp A/B: *Early-onset*: 5,9%, *Late-onset*: 12,4%). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Vorliegen eines trpv6a-Allels keinen Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms in jüngerem Lebensalter darstellt. Bei dieser Betrachtung muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Einteilung in die Altersklassen nach dem Alter der Patienten bei der operativen Entfernung der Neoplasie vorgenommen wurde und daher der genaue Entstehungszeitpunkt des Prostatakarzinoms nicht exakt erfasst werden konnte.

Im Vergleich zwischen Patienten mit histologisch moderat dedifferenzierten (*Gleason-Score* < 7) und stärker dedifferenzierten Prostatakarzinomen (*Gleason-Score* ≥ 7) konnte ebenfalls kein Unterschied in der Verteilung des heterozygoten (A/B) und des homozygoten trpv6b-Genotyps (B/B) beobachtet werden (Häufigkeit Genotyp A/B: *Gleason-Score* < 7: 16,7%, *Gleason-Score* ≥ 7: 9,7%). Das Vorliegen eines trpv6a-Allels scheint also nicht die Entstehung eines dedifferenzierten Karzinoms mit einem *Gleason-Score* > 7 und somit einer prognostisch ungünstigeren Neoplasie zu begünstigen. Folglich besteht keine Korrelation zwischen trpv6-Genotyp und *Gleason-Score*.

Als weiteren Punkt wurde die Verteilung des heterozygoten (A/B) und des homozygoten trpv6b-Genotyps (B/B) zwischen Patienten verglichen, deren Prostatakarzinome die Organkapsel infiltrierte hatten und Patienten, bei denen dies nicht der Fall war. Als Grenze hierfür wurde der Ausbreitungsgrad -pT3- im TNM-System verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen eines trpv6a-Allels nicht ursächlich mit der Entstehung einer die Organkapsel überschreitenden Neoplasie angesehen werden kann, da die Verteilung der Genotypen in den beiden betrachteten Gruppen nicht signifikant verschieden war. So wiesen Patienten mit pT1- oder pT2-Tumoren ähnliche Allelfrequenzen auf wie Patienten mit pT3-, oder pT4-Tumoren (Häufigkeit Genotyp A/B: ≤ pT2: 10,4%, ≥ pT3: 11,8%). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die trpv6-Genotypisierung von Prostatakarzinompatienten keine prognostisch verwertbare Aussage liefert.

5.2 Expression von TRPV6 in Prostatakarzinomen

In dieser Arbeit konnte in fünf Prostatakarzinomgewebeprobe mit RT-PCR die Expression von TRPV6 nachgewiesen werden, indem jeweils zwei Abschnitte der *trpv6*-cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert wurden. Es wurden nur Prostatakarzinome mit einem Ausbreitungsgrad \geq pT2c untersucht, da in diesen Stadien in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe mit *In situ*-Hybridisierungsexperimenten signifikant häufiger TRPV6-Transkripte nachweisbar waren (Fixemer *et al.*, 2003). Die Nachweisbarkeit von TRPV6-Transkripten mittels RT-PCR in den untersuchten Geweben bestätigt, dass der Kationenkanal TRPV6 in Prostatakarzinomen exprimiert wird.

Wissenbach *et al.* (2001) konnten TRPV6-Transkripte auch mittels Northern-Blot-Untersuchungen in Prostatakarzinomen nachweisen, nicht aber in gesundem Prostatagewebe. Die Expression von TRPV6 in gesundem Prostatagewebe wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da ausschließlich karzinomatös verändertes Gewebe zur Verfügung stand.

5.3 Kopplung der Polymorphismen in den Allelvarianten *trpv6a* und *trpv6b*

Es konnte gezeigt werden, dass beim Menschen zwei *trpv6*-Allelvarianten existieren, die durch fünf vermutlich gekoppelte Nukleotidpolymorphismen definiert werden (Wissenbach *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde stichprobenartig an weiteren Proben überprüft, ob die Kopplung nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurden in verschiedenen Proben neben dem zur Genotypisierung verwendeten 2. Polymorphismus auch die Polymorphismen 1, 4 und 5 untersucht. In allen untersuchten Proben wurden die erwarteten Ergebnisse und somit die Kopplung der untersuchten Nukleotidpolymorphismen bestätigt. In Kaukasiern sind demnach die Polymorphismen, die *trpv6a*- und *trpv6b*-Allele definieren, typischerweise gekoppelt.

Eine Probe (PCA 87) wies die Besonderheit auf, dass auf cDNA-Ebene neben den erwarteten Allelvarianten zusätzlich zwei weitere Allelvarianten nachweisbar waren, die als Mischvarianten bezeichnet wurden. Diese Mischvarianten sind dadurch charakterisiert, dass der vierte oder der fünfte Polymorphismus jeweils nicht der Allelvariante der restlichen Polymorphismen entsprach, d.h. in zwei Allelen wurde keine Kopplung der Polymorphismen gefunden. Die vier Allelvarianten waren ebenfalls auf genomischer Ebene nachweisbar, so dass sich die Frage stellt, ob im Genom des Patienten generell vier *trpv6*-Allele vorliegen

oder ob es sich um ein auf den Tumor begrenztes Phänomen handelt. Leider war es nicht möglich, andere Gewebe des Patienten zu untersuchen und daraus genomische DNA zu isolieren, so dass diese Frage nicht beantwortet werden konnte.

Es ist für verschiedene maligne Tumoren bekannt, dass Genduplikationen bei der Entstehung von Neoplasien ursächlich eine Rolle spielen können. Es könnte daher sein, dass die Genduplikation von *trpv6*, unter Umständen zusätzlich zu einem *Crossing-over* der Allelvarianten, ursächlich eine Rolle bei der Entwicklung von Prostatakarzinomen spielt. Ein ähnliches Phänomen wurde in jüngster Zeit beim Prostatakarzinom für die Fusion der Gene *TMPRSS2* und *ERG* auf Chromosom 21 beobachtet: hier war das Vorliegen einer Fusion der beiden Gene als Prädiktor für eine schlechtere Prognose identifiziert worden (Attard *et al.*, 2008).

5.4 Konstruktion der TRPV6b-Mutanten G503C und G503S

Zwischen den Kalziumkanalproteinen TRPV6a und TRPV6b konnten mittels elektrophysiologischer Messungen nach Überexpression bisher keine signifikanten funktionellen Unterschiede festgestellt werden. TRPV6b-Kanäle inaktivieren durch Erhöhung des zytosolischen Kalziums geringfügig schneller als TRPV6a-Kanäle (Hughes *et al.*, 2008).

Um weitere funktionelle Unterschiede zwischen TRPV6a und TRPV6b zu demaskieren, wurde in TRPV6b eine Mutation eingeführt, die die biophysikalischen Eigenschaften des Kanalproteins verändern und somit im Vergleich zur entsprechenden Mutation bei TRPV6a Unterschiede verdeutlichen könnte, die in den bisherigen elektrophysiologischen Untersuchungen nicht entdeckt wurden.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit die Aminosäuresequenz von TRPV6b verändert: Bei der Mutante TRPV6b_G503C (M1) wurde ein Glycin (G) im intrazellulären S4-S5-Loop gegen ein Cystein (C) und bei der Mutante TRPV6b_G503S (M2) gegen einen Serin (S) ausgetauscht (Abb. 5.1).

Die Annahme, dass diese Mutationen die Kanaleigenschaften beeinflussen könnten, beruht auf der Beobachtung, dass die entsprechenden Aminosäureveränderungen bei einem anderen Ionenkanal, TRPV3, zu konstitutiver Aktivierung des Kanals führt (Imura *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2008).

Die Mutationen wurden *in-vitro* in die Wildtypsequenz der humanen trpv6b-cDNA eingebracht und in einen Expressionsvektor kloniert, der geeignet ist, um humane Zelllinien wie HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney-Cells*) zu transfizieren.

Die Transfektion der HEK293-Zellen und die anschließende Messung der $[Ca^{2+}]_i$ waren nicht Bestandteil dieser Arbeit. Bisherige Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass die Mutationen M1 und M2 auch bei TRPV6b, einem als Wildtyp-Protein bereits konstitutiv aktiven Kalziumkanal (Wissenbach *et al.*, 2001, Bödding *et al.*, 2005), zu erhöhter Offenwahrscheinlichkeit und somit zu einer erhöhten basalen zytosolischen Kalziumkonzentration führen.

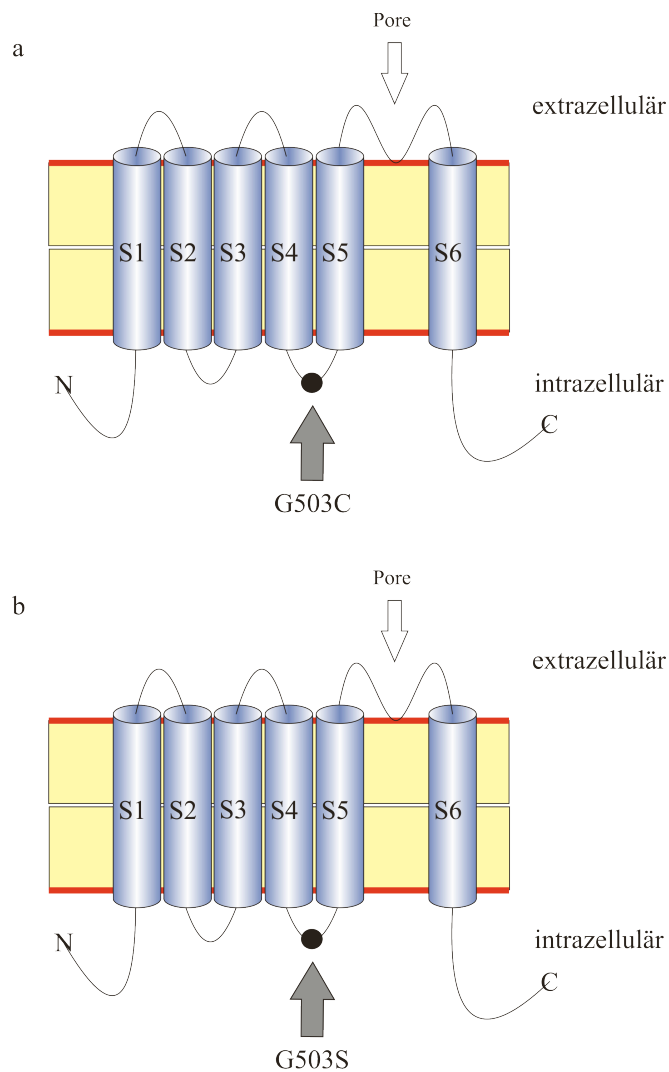


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der TRPV6b-Mutanten G503C (a, M1) und G503S (b, M2).

Mittels *In vitro*-Mutagenese wurden in die cDNA des *trpv6b*-Allels Mutationen eingeführt, die die Aminosäure Glycin 503 (G) des TRPV6-Proteins gegen Cystein (C, oben) bzw. Serin (S, unten) austauschen.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich der trpv6-Genotyp von Patienten mit einem diagnostizierten Prostatakarzinom und von gesunden Personen nicht unterscheidet, d.h. dass das Prostatakarzinomrisiko nicht erhöht ist, wenn der heterozygote trpv6-Genotyp (A/B) vorliegt. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen heterozygotem Genotyp und Erkrankungsalter, Malignität oder Ausbreitungsgrad nachgewiesen werden. Die Genotypisierung von Prostatakarzinompatienten bezüglich ihrer trpv6-Allele bringt also keine Information, die die Therapieentscheidung beeinflussen könnte.

Es wurde weiterhin gezeigt, dass die fünf Polymorphismen, die die Allelvarianten definieren, typischerweise gekoppelt auftreten. Zudem wurden bei einem Patienten zwei weitere Mischvarianten beobachtet, deren Entstehung und Relevanz im Rahmen der Tumorentstehung bisher unklar sind.

Mit RT-PCR konnte gezeigt werden, dass trpv6-mRNA in Prostatakarzinomgewebe mit einem Ausbreitungsgrad \geq pT2c nachweisbar ist.

In dieser Arbeit konnte nicht überprüft werden, inwiefern der homozygote trpv6a-Genotyp mit den untersuchten Tumorparametern korreliert. Es wäre interessant zu wissen, ob sich dabei die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen lassen oder ob das Vorliegen zweier trpv6a-Allele ein erhöhtes Prostatakarzinomrisiko mit sich bringt.

Unklar bleibt weiterhin, warum TRPV6 in Prostatakarzinomen, nicht aber in gesunden Prostatageweben exprimiert wird.

6 Literaturverzeichnis

- 01 Akey JM, Swanson WJ, Madeoy J, Eberle M, Shriver MD (2006) TRPV6 exhibits unusual patterns of polymorphism and divergence in worldwide populations. *Hum Mol Genet* **15**:2106-2113
- 02 Attard G, Clark J, Ambroisine L, Fisher G, Kovacs G, Flohr P, Berney D, Foster CS, Fletcher A, Gerald WL, Moller H, Reuter V, De Bono JS, Scardino P, Cuzick J, Cooper CS; Transatlantic Prostate Group (2008) Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* **27**:253-263
- 03 Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M, Häggman M, Andersson SO, Bratell S, Spångberg A, Busch C, Nordling S, Garmo H, Palmgren J, Adami HO, Norlén BJ, Johansson JE; Scandinavian Prostate Cancer Group Study No. 4 (2005) Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* **352**:1977-1984
- 04 Bödding M (2007) TRP proteins and cancer. *Cell Signal.* **19**:617-24
- 05 Bolanz KA, Hediger MA, Landowski CP (2008) The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther* **7**:271-279
- 06 Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P (2001) Calcium signalling - an overview. *Semin Cell Dev Biol* **12**:3-10
- 07 Carafoli E (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:1115-1122
- 08 Carter HB, Piantadosi S, Isaacs JT (1990) Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J Urol.* **143**:742-746
- 09 Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**:816-824
- 10 Caterina MJ (2003) Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. *Pain* **105**:5-9
- 11 Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2172-2175
- 12 Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* **80**:259-268
- 13 Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**:517-524
- 14 Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**:1047-1058
- 15 Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**:2110-2114
- 16 Crawford ED (2003) Epidemiology of prostate cancer. *Urology* **62**(6 Suppl. 1):3-12
- 17 Damber JE, Aus G (2008) Prostate cancer. *Lancet.* **371**:1710-1721
- 18 Davies J, Jacob F (1968) Genetic mapping of the regulator and operator genes of the lac operon. *J Mol Biol.* **36**:413-417

- 19 DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI (2003) Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* **361**:955-964
- 20 Erler I, Hirnet D, Wissenbach U, Flockerzi V, Niemeyer BA (2004) Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J Biol Chem* **279**:34456-34463
- 21 Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H (2003) Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel marker for tumor progression. *Oncogene* **22**:7858-7861
- 22 Flockerzi V (2007) An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol* 1-19
- 23 Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V, Nilius B (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* **3**:121-7
- 24 Haenszel W, Kurihara M (1968) Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. *J Natl Cancer Inst.* **40**:43-68
- 25 Hardie RC, Minke B (1992) The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* **8**:643-651
- 26 Harnden P, Shelley MD, Coles B, Staffurth J, Mason MD (2007) Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* **8**:411-419
- 27 Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F, European Association of Urology (2008) EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol.* **53**:68-80
- 28 Hirnet D, Olausson J, Fecher-Trost C, Bödding M, Nastainczyk W, Wissenbach U, Flockerzi V, Freichel M (2003) The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* **33**:509-518
- 29 Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ (1999) Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1,25-dihydroxy-vitamin D3-responsive epithelia. *J Biol Chem* **274**:8375-8378
- 30 Hoenderop JG, Vennekens R, Müller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ, Nilius B (2001) Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol.* **537**:747-761
- 31 Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ (2003) Homo- and tetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* **22**:776-785
- 32 Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**:193-197
- 33 Horwitz JP, Chua J, Curby RJ, Tomson AJ, Darooge MA, Fisher BE, Mauricio J, Klundt I (1964) Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl-beta-D-glycopyranosides. *J Med Chem.* **7**:574-575.
- 34 Hsing AW, Tsao L, Devesa SS (2000) International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* **85**:60-7

- 35 Hughes DA, Tang K, Strotmann R, Schöneberg T, Prenen J, Nilius B, Stoneking M (2008) Parallel selection on TRPV6 in human populations. *PLoS ONE* 2008 **3**:e1686
- 36 Imura K, Yoshioka T, Hikita I, Tsukahara K, Hirasawa T, Higashino K, Gahara Y, Arimura A, Sakata T (2007) Influence of TRPV3 mutation on hair growth cycle in mice. *Biochem. Biophys Res Commun* **363**:479-483
- 37 Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276**:28613-28619
- 38 Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N (2007) TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**:7380-7385
- 39 Lopez-Beltran A, Mikuz G, Luque RJ, Mazzucchelli R, Montironi R (2006) Current practice of Gleason grading of prostate carcinoma. *Virchows Arch.* **448**111-118
- 40 Minke B (1977) *Drosophila* mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* **3**:59-64
- 41 Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* **230**:1040-1043
- 42 Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**:1313-1323
- 43 Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* **9**:229-231
- 44 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol* **51**:263-273
- 45 Mullis KB und Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-350
- 46 Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB (2003) Prostate cancer. *N Engl J Med* **349**:366-381
- 47 Niemeyer BA, Bergs C, Wissenbach U, Flockerzi V, Trost C (2001) Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3600-3605
- 48 Nilius B, Prenen J, Droogmans, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V (2003) Voltage dependence of the Ca²⁺-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* **33**:30813-30820
- 49 Nilius B (2007) TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**:805-12
- 50 Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA (1999) Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* **274**:22739-22746
- 51 Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Weremowicz S, Morton CC, Vassilev PM, Brown EM, Hediger MA (2000) Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun* **278**:326-332

- 52 Peng JB, Brown EM, Hediger MA (2001) Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels. *Genomics* **76**:99-109
- 53 Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G (2007) TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1772**:937-946
- 54 Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**:619-647
- 55 Sambrook J, Russell DW (eds) (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. (3rd ed.) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 56 Sanda MG, Dunn RL, Michalski J, Sandler HM, Northouse L, Hembroff L, Lin X, Greenfield TK, Litwin MS, Saigal CS, Mahadevan A, Klein E, Kibel A, Pisters LL, Kuban D, Kaplan I, Wood D, Ciezki J, Shah N, Wei JT (2008) Quality of life and satisfaction with outcome among prostate-cancer survivors. *N Engl J Med* **358**:1250-1261
- 57 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467
- 58 Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP (1994) High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* **8**:439-443
- 59 Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeyer BA, Strauss B, Philipp SE, Flockerzi V, Hoth M (2006) TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium* **39**:163-173
- 60 Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM (1991) Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer*. **63**:963-966
- 61 Soejima M, Tachida H, Koda Y (2009) Sequence analysis of human TRPV6 suggests positive selection outside Africa. *Biochem Genet*. **47**:147-53
- 62 Stajich JE, Hahn MW (2005) Disentangling the effects of demography and selection in human history. *Mol Biol Evol* **22**:63-73
- 63 Talcott JA, Rieker P, Clark JA, Probert KJ, Weeks JC, Beard CJ, Wishnow KI, Kaplan I, Loughlin KR, Richie JP, Kantoff PW (1998) Patient-reported symptoms after primary therapy for early prostate cancer: results of a prospective cohort study. *J Clin Oncol*. **16**:275-283
- 64 Ullmann A, Jacob F, Monod J (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. **24**:339-43
- 65 UICC (1970, 1976) *TNM-Klassifizierung der malignen Tumoren und allgemeine Regeln zur Anwendung des TNM-Systems*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- 66 Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem*. **76**:387-417
- 67 Vennekens R, Olausson J, Meissner M, Bloch W, Mathar I, Philipp SE, Schmitz F, Weissgerber P, Nilius B, Flockerzi V, Freichel M (2007) Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat Immunol* **8**:312-320

- 68 Warnat J, Philipp S, Zimmer S, Flockerzi V, Cavalié A (1999) Phenotype of a recombinant store-operated channel: highly selective permeation of Ca²⁺. *J Physiol.* **518**:631-638
- 69 West RJ, Sun AY, Church DL, Lambie EJ (2001) The *C. elegans* gon-2 gene encodes a putative TRP cation channel protein required for mitotic cell cycle progression. *Gene* **266**:103-110
- 70 Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalié A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* **276**:19461-19468
- 71 Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V (2004) TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression. *Biochem Biophys Res Commun* **322**:1359-1363
- 72 Wittekind Ch, Meyer H-J, Bootz F (eds) (2002) TNM Klassifikation maligner Tumoren. Springer, Berlin Heidelberg New York
- 73 Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW, et al. (1995) Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst.* **87**:652-661
- 74 Woudenberg-Vrenken TE, Bindels RJ, Hoenderop JG (2009) The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* **5**:441-449
- 75 Xiao R, Tian J, Tang J, Zhu MX (2008) The TRPV3 mutation associated with the hairless phenotype in rodents is constitutively active. *Cell Calcium* **43**:334-343
- 76 Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR (2002) Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* **82**:1755-1764

7 Publikation/ Dank

Ein Großteil der in dieser Arbeit dargestellten Experimente und Ergebnisse wurde im Oktober 2009 in der Zeitschrift *BMC Cancer* veröffentlicht:

Thorsten Kessler, Ulrich Wissenbach, Rainer Grobholz, Veit Flockerzi

TRPV6 alleles do not influence prostate cancer progression.

BMC Cancer **9**:380

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi für die Möglichkeit der Promotion mit diesem interessanten und vielseitigen Thema im Institut für Pharmakologie und Toxikologie und für die ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Des Weiteren möchte ich herzlich Herrn PD Dr. Ulrich Wissenbach dafür danken, dass er mich mit Geduld und Ausdauer in die Welt der Molekularbiologie eingeführt und maßgeblich meinen wissenschaftlichen Horizont erweitert hat. Seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft und sein Interesse an TRP-Kanälen, ganz speziell an TRPV6, haben mir die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht.

Ganz besonders möchte ich auch den technischen Angestellten des Instituts, allen voran Frau Karin Wolske, dafür danken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen. Allen Mitarbeitern danke ich außerdem für die Unterstützung und die schöne Zeit im Institut.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Rainer Grobholz und seiner ehemaligen Mitarbeiterin Frau Alexandra Römer vom Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie der Universität des Saarlandes für die Bereitstellung der Prostatagewebeproben und der zugehörigen Daten.

Meiner Freundin Annika danke ich für ihr Verständnis, wenn die Zeit wieder einmal knapp war, und für ihr offenes Ohr, wenn mir etwas auf dem Herzen lag oder wenn ein Entwurf dieser Arbeit auf ihre konstruktive Kritik wartete.

Meinen Freunden Simon und Matthias danke ich für die Zerstreuung auf Reisen während stressigen Tagen. Meinen Kommilitonen Florian und Stephan danke ich für ihre Freundschaft, Unterstützung und für viele schöne Tage in Homburg.

Den größten Dank möchte ich meiner Familie aussprechen. Sie hat mir das Medizinstudium ermöglicht und mir, seit ich denken kann, ein Zuhause geschenkt, in das ich jederzeit gerne zurückkehre. Meinem Vater danke ich für die leider zu kurze gemeinsame Zeit.

8 Lebenslauf

Thorsten Keßler

geboren am 13.02.1984 in Quierschied

Anglerstr. 4
D-80339 München

Schule und Zivildienst

1990 - 1994 Grundschule Göttelborn
1994 - 2003 Illtal-Gymnasium Illingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Juni 2003
Juli 2003 - April 2004 Zivildienstleistender beim Landesamt für Umweltschutz des
Saarlandes, Abteilung Umweltanalytik

Studium

seit 2004 Studium der Humanmedizin
2004 - 2009 Universität des Saarlandes
seit 2009 Technische Universität München
Prüfungen August 2006, Homburg/ Saar:
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Erfahrungen

Mai, September 2004 zweimonatiges Krankenpflegepraktikum im Krankenhaus St. Josef,
Klinik für Innere Medizin, Saarbrücken-Dudweiler
August 2005 einmonatiges Krankenpflegepraktikum im Krankenhaus St. Josef,
Klinik für Chirurgie, Saarbrücken-Dudweiler
Februar 2007 einmonatige Famulatur im Knappschaftskrankenhaus Sulzbach/ Saar,
Abteilung für Innere Medizin
März 2008 einmonatige Famulatur im Universitätsklinikum Heidelberg,
Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
August 2008 einmonatige Famulatur in einer Praxis für Nervenheilkunde bei Herrn
Dr. med. Arne Holle, Saarbrücken
März 2009 einmonatige Famulatur in der Klinik für Psychiatrie und
Psychotherapie der Ludwig-Maximilians-Universität München
seit August 2009 Praktisches Jahr
 Aug. - Dez. 2009 Innere Medizin: Abteilung Pneumologie der Zürcher Höhenklinik
 Wald, Wald ZH
 seit Dez. 2009 Pharmakologie (Wahlfach): Institut für Pharmakologie und
 Toxikologie der Technischen Universität München

- seit April 2007 Promotion am Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes,
Homburg/ Saar
- WS 06/07, WS 08/09 Studentische Hilfskraft im Kurs der Makroskopischen Anatomie für
Medizinstudenten, Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar
- WS 07/08, SS 08 Studentische Hilfskraft im Kurs der Pharmakologie und Toxikologie
für Medizinstudenten, Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar