

**Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/ Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Stöckle**

**Kombination von *ArrayCGH* und
Real-Time-Genosis-PCR
zur Bestimmung neuer Zielgene der Amplifikation
beim Prostatakarzinom**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2018

vorgelegt von
Kerstin Wahrheit-Ganter
geboren am 9.11.1982 in St. Ingbert

Kirkel, 31.01.2018

1 Kurzzusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist in Deutschland der am häufigsten diagnostizierte Tumor des Mannes. Durch verstärkten Einsatz des diagnostischen Markers PSA (prostataspezifisches Antigen) und frühzeitige Entnahme von Stanzbiopsaten ist seine Inzidenz in den letzten Jahren stark gestiegen. Daraus ergibt sich eine große Anzahl an Überdiagnosen, gefolgt von nebenwirkungsträchtigen Übertherapien, die dem Patienten bei langsamem (indolentem) Tumorstadium ohne Metastasierungstendenz hätten erspart bleiben können.

Zurzeit existiert für das Prostatakarzinom kein verlässlicher prognostischer Marker, der bereits im Frühstadium der Erkrankung das spätere Wachstums- und Metastasierungsverhalten des Tumors erfasst. Auch fehlt es an einem potenten tumorspezifischen Diagnostikmarker mit größerer Aussagekraft als der des PSA.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines Oligonukleotid-basierten *MicroArrays* von der Norm abweichende Genkopienzahlen in Prostatakarzinomzelllinien zu erkennen und somit neue, für die Prostatakarzinogenese relevante Gene zu identifizieren.

Die Genome von sieben Prostatakarzinomzelllinien (*PC3*, *PC3-N*, *DU145*, *DU145-MN1*, *CWR22*, *CWR22-RV1*, *LNCaP*) wurden in einer hochauflösenden Oligonukleotid-CGH (comparative genomische Hybridisierung) nach Genregionen mit Kopienzahlgewinn oder -verlust durchsucht.

Verglichen mit früheren Ergebnissen aus konventioneller chromosomaler CGH wurden in der *ArrayCGH* vor allem nahe der Zentromere und der Telomere mehr Deletionen und kleine Genverluste entdeckt.

Eine 1,7 Mb umfassende amplifizierte Region auf Chromosom 9p13.3 in den Zelllinien *CWR22* und *CWR22-RV1* wurde nur mit der höherauflösenden *ArrayCGH* gefunden.

Der Kopienzahlgewinn in dieser Genregion wurde mithilfe des für diese Region kodierenden *BACs* RP11-165H19 in einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung bestätigt. Das *BAC*-Genom enthält die beiden benachbarten Gene *IL11RA* und *DCTN3*.

In einer quantitativen *Real-Time-PCR* (qRT-PCR) konnten wir zeigen, dass *IL11RA* deutlich höhere Genkopienzahlen in den Tumorzelllinien erreicht als das Nachbargen *DCTN3* und somit höchstwahrscheinlich das relevante Gen dieser amplifizierten Region darstellt. Die qRT-PCR-Untersuchung von zwanzig primären Prostatakarzinomen aus radikalen Prostatektomien ergab einen Kopienzahlgewinn von *IL11RA* in 75% der untersuchten Proben. Ein Kopienzahlgewinn von *DCTN3* wurde nur in zwei Fällen gemeinsam mit einem *IL11RA*-Gewinn detektiert.

IL11RA konnte als Zielgen der in maligne entarteten Prostatazellen hochamplifizierten perizentromerischen Chromosomenregion 9p13.3 identifiziert werden.

Das Gen kodiert für den α -Rezeptor von Interleukin 11. Über eine durch Glykoprotein 130 (gp 130) vermittelte Aktivierung des *JAK/STAT*-Signalwegs und nachfolgende konstitutive Aktivierung von *STAT*-Proteinen (hauptsächlich *STAT 3*) leistet es einen wesentlichen Beitrag zur Prostatakarzinogenese und zum Wandel vom hormonsensiblen zum hormonrefraktären Wachstum (Kamradt J et al., 2007). Zudem wurde das Produkt des hochregulierten *IL11RA*-Gens mittlerweile als Angriffspunkt einer gezielten Pharmakotherapie des ossär metastasierten Prostatakarzinoms identifiziert (Pasqualini R et al., 2015).

2 Short summary

Detection of Novel Amplicons in Prostate Cancer by Combination of Oligonucleotide-Based ArrayCGH with Quantitative Real-Time-PCR

In Germany, prostate carcinoma is the most frequently diagnosed tumor of men. Due to the increased use of the diagnostic biomarker PSA (prostate specific antigen) and early taking of punch biopsies the incidence has been rising in recent years. This leads to a vast number of overdiagnoses resulting in overtreatments with undesirable side effects. These could have been avoided in the case of indolent tumor growth with low metastatic potential.

At present, there is no reliable prognostic marker at early tumor stage to predict the tumor growth and metastasis at later stages. In addition, we need a better and more conclusive tumor specific diagnostic marker than PSA.

The objective of this study was to profile gene copy number alterations in prostate cancer cell lines in order to identify novel candidate genes, which might play a role in prostate carcinogenesis.

Genome-wide screening for regions of gene gains and losses on seven prostate cancer cell lines (*PC3*, *PC3-N*, *DU145*, *DU145-MN1*, *CWR22*, *CWR22-RV1*, and *LNCaP*) was carried out using high-resolution comparative genomic hybridization on a 35,000-feature oligonucleotide microArray (ArrayCGH).

Compared to conventional chromosomal CGH, more deletions and small regions of gains, particularly in pericentromeric regions and regions next to the telomeres, were detected.

Most importantly, a small amplicon of 1.7 MB at 9p13.3 in the cell lines *CWR22* and *CWR22-RV1* could only be identified using the high-resolution ArrayCGH.

The copy number gain in this region was confirmed by fluorescence in situ hybridization using the BAC clone RP11-165H19 from the amplified region comprising the two genes interleukin 11 receptor alpha (*IL11RA*) and dynactin 3 (*DCTN3*).

Using quantitative *Real-Time*-PCR (*qRT*-PCR) we demonstrated that *IL11RA* reached significantly higher gene copy numbers in the cell lines compared to *DCTN3*. This strongly indicates that *IL11RA* is the amplification target.

In addition, screening of 20 primary prostate carcinomas by *qRT*-PCR revealed an *IL11RA* copy number gain in 75% of the tumors analyzed. In contrast, gain of *DCTN3* was only found in two cases and only together with a gain of *IL11RA*.

IL11RA could be identified as the target gene of the highly amplified chromosomal region 9p13.3 in prostate cancer cell lines and primary prostate cancer samples.

IL11RA encodes a specific α -receptor for Interleukin 11. An important signaling pathway activated by *IL11RA* is the *JAK/STAT*-pathway (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription). Gp130 (glycoprotein 130)-dependent activation of the *JAK/STAT*-pathway followed by constitutive *STAT3* activation was demonstrated to play a key role in prostate carcinogenesis and progression of hormone sensitive to hormone refractory growth of prostate cancer (Kamradt J et al., 2007).

In addition, the product of the upregulated *IL11RA* gene has now been identified as the target of selective pharmacotherapy for osseous metastatic prostate cancer (Pasqualini R et al., 2015).

3 Inhaltsverzeichnis

1	Kurzzusammenfassung	2
2	Short summary	3
3	Inhaltsverzeichnis	5
4	Einleitung	8
4.1	Karzinogenese solider Tumoren.....	8
4.2	Prostatakrebs	9
4.2.1	Diagnostik und Einteilung.....	11
4.2.2	Therapiemöglichkeiten.....	13
4.2.3	Risikofaktoren und Genetik	15
4.3	Fragestellung dieser Arbeit	18
5	Material	20
5.1	Geräte	20
5.2	Einmal-Material und Verbrauchsmittel.....	21
5.3	Chemikalien	21
5.4	Marker, Farbstoffe, Antikörper, Desoxyribonukleotide.....	22
5.5	Enzyme.....	23
5.6	Medien, Puffer und Lösungen	23
5.6.1	Zellkulturmedien	23
5.6.2	Puffer und Lösungen	23
5.7	Kits	24
5.8	Oligonukleotid <i>primer</i>	25
5.8.1	Untersuchung der Gen-Amplifikation.....	25
5.8.2	Intra-ALU-PCR (ArrayCGH-Analyse)	25
5.8.3	Inter-ALU-PCR (FISH-Analyse)	25
5.9	Software	25
5.10	Datenbanken.....	25
5.11	PCa-Zelllinien	26
5.12	Gewebeproben.....	27
6	Methoden	29
6.1	Zellkultur.....	29
6.1.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	29
6.1.2	Passagierung, Subkultivierung und Zellzählung	29
6.2	Nukleinsäureanalytik.....	30

6.2.1	DNA-Isolierung mit dem Blood and Cell Culture Midi Kit (Qiagen)	30
6.2.1.1	Vorbereitung der Zellen aus Kultur	30
6.2.1.2	Vorbereitung der Blutlymphozyten	30
6.2.1.3	DNA-Isolierung	30
6.2.2	DNA-Isolierung aus einem BAC mit dem <i>Maxi-Plasmid-Isolierungs-Kit</i> (Qiagen)	31
6.2.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	32
6.2.4	Markierung der DNA mit dem Bio Prime Genomic Labeling Kit (Invitrogen) ..	32
6.2.4.1	Anhängen eines Cy 3- bzw. Cy 5-Fluoreszenzfarbstoffes	32
6.2.4.2	Markierung mit Biotin bzw. Digoxigenin (<i>Nick-Translation</i>).....	33
6.2.5	Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).....	33
6.3	DNA-Vervielfältigung durch <i>Whole Genome Amplification (WGA)</i>	34
6.3.1	<i>MDA</i> mit dem <i>REPLI-g Midi Kit (Qiagen)</i>	35
6.4	DNA-Vervielfältigung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
6.4.1	<i>ALU-PCR</i>	37
6.4.1.1	<i>ALU-Sequenzen</i>	37
6.4.1.2	<i>Intra-ALU-PCR</i>	37
6.4.1.3	<i>Inter-ALU-PCR</i>	38
6.4.2	<i>Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)</i>	39
6.4.2.1	Detektion der <i>Real-Time-PCR-Produkte</i>	39
6.4.2.2	<i>Primer</i>	44
6.4.2.3	Bestimmung der Toleranzintervalle (<i>CUTOFF</i>)	44
6.4.2.4	<i>C_T-Wert</i>	45
6.4.2.5	Relative Quantifizierung der Genkopienzahl mit einer Modifizierung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode.....	45
6.4.2.6	<i>PCR-Bedingungen und Versuchsaufbau</i>	47
6.5	Agarose-Gelelektrophorese	48
6.6	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	48
6.6.1	<i>BAC-FISH</i>	49
6.6.2	Experimenteller Aufbau einer FISH	49
6.7	Comparative genomische Hybridisierung (CGH).....	51
6.7.1	Chromosomale vergleichende genomische Hybridisierung (cCGH).....	51
6.7.2	<i>ArrayCGH (aCGH)</i>	52
6.7.2.1	Experimenteller Aufbau einer <i>ArrayCGH</i>	53

7	Ergebnisse	56
7.1	ArrayCGH: Genkopienzahlveränderungen beim Prostatakarzinom	56
7.1.1	Minimal recurrent regions of alterations und Vergleich der ArrayCGH-Ergebnisse mit früheren Daten aus chromosomaler CGH.....	56
7.1.2	Vergleich parentaler Tumorzelllinien und ihrer Sublinien	57
7.1.3	Region 9p13.3	58
7.2	BAC-FISH: Validierung der ArrayCGH-Daten.....	58
7.3	Quantitative Real-Time-PCR	60
7.3.1	PCR-Effizienz bzw. Primer-Effizienz und Standardkurven	60
7.3.2	Veränderungen der Genkopienzahl des Zielgens IL11RA	63
7.3.3	Veränderungen der Genkopienzahl des Zielgens DCTN3.....	63
7.3.4	Vergleich der Genkopienzahlen der beiden Zielgene IL11RA und DCTN3	64
7.3.5	Relevanz bei Prostatakarzinom-Patienten.....	65
7.3.6	Beurteilung des Kontrollgens ALDH1B1	66
8	Diskussion	68
8.1	Diskussion der verwendeten Methoden	68
8.1.1	Comparative genomische Hybridisierung (CGH).....	68
8.1.2	<i>copy number variations</i> in der Beurteilung der CGH-Daten	70
8.1.3	Sequenzierung – <i>state of the art</i> in der genetischen Forschung.....	71
8.1.4	Quantifizierung der Genkopienzahl durch <i>Real-Time-Genosis-PCR</i> (qRT-PCR)	74
8.1.5	Effizienzen der verwendeten PCR-Primer.....	75
8.2	Diskussion der beiden Kontrollgene <i>TOP2B</i> und <i>ALDH1B1</i>	75
8.3	Aktuelle Prostatakrebsforschung.....	77
8.4	Diskussion meiner Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext	83
8.5	IL11-Rezeptor α und JAK-STAT-pathway	87
9	Abkürzungsverzeichnis.....	93
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	95
11	Literatur	97
12	Danksagung.....	110
13	Publikation.....	110
14	Lebenslauf.....	111

4 Einleitung

4.1 Karzinogenese solider Tumoren

Krebs ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2012 waren Krebserkrankungen für 8,2 Millionen Todesfälle (14,6% aller Todesfälle) weltweit verantwortlich (World Cancer Report 2014, www.who.int). 2013 erkrankten in Deutschland 229 920 Frauen und 252 550 Männer neu an Krebs. Gut 220 000 Menschen verstarben in diesem Jahr in Deutschland an ihrer Tumorerkrankung (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016). Etwa 1,6 Millionen Menschen in Deutschland hatten Ende 2013 eine aktive oder maximal 5 Jahre zurückliegende Krebserkrankung (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016).

Die Entstehung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess von präkanzeröser Veränderung bis zum malignen Tumor. Er basiert auf einer Störung im Gleichgewicht zwischen Proliferation und programmiertem Zelltod und führt letztlich zu einer unkontrollierten Zellteilung. Einige externe Faktoren wurden in den letzten Jahrzehnten unstrittig als allgemeine Karzinogene (krebsauslösende Stoffe) identifiziert, darunter zum Beispiel ionisierende Strahlung und inhalative Noxen wie Tabakrauch und Asbest, aber auch manche viralen oder bakteriellen Infektionen. Genetische Disposition eines Individuums und zunehmendes Alter sind davon unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung einer bösartigen Krebserkrankung (Kamradt J, 2011).

Viele seltene Krankheiten werden rein monogenisch (entsprechend der Mendel'schen Regeln) vererbt. In den letzten Jahrzehnten wurden Tausende Gene für seltene Krankheiten identifiziert, für deren Entstehung die Variation in einem einzelnen Gen sowohl notwendig als auch ausreichend ist (viele Stoffwechselerkrankungen wie z.B. Mukoviszidose mit einer Mutation im *CFTR*-Gen).

Die meisten komplexen, aber sehr häufigen Erkrankungen wie z.B. Asthma, Diabetes, Herz- und Geisteskrankheiten und auch Krebs sind jedoch viel schwieriger zu erforschen, da sie wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel verschiedener DNA-Varianten mit unterschiedlichen Umweltfaktoren entstehen (Altshuler D et al., 2005).

Während der malignen Transformation wird die genetische Information der Zelle auf molekularer Ebene verändert (Albertson D et al., 2003). Primär können diese Veränderungen auf Genebene (in Form von Mutationen, Deletionen oder Amplifikationen) oder auf der Ebene der Epigenetik (durch Methylierung oder Histonmodifikation) stattfinden.

Nach Erstbeschreibung der DNA-Struktur 1953 durch Watson und Crick (Watson J, Crick F, 1953) dauerte es noch 50 Jahre, bis die gesamte menschliche DNA-Sequenz im Jahr 2003

durch das Human Genome Project entschlüsselt war (Human Genome Project: Nationales Genomforschungsnetz). Erst seit die enormen Vorteile einer schnellen Sequenzierung offensichtlich wurden, werden die Methoden rasend schnell weiterentwickelt und verbessert. Heute kann ein gesamtes menschliches Genom, je nach Methode, für etwa 10.000 US-Dollar entschlüsselt werden.

Mithilfe großer Datenbanken mit der gesamten menschlichen Genomsequenz sowie einer Übersicht über häufige (wahrscheinlich krankheitsirrelevante) menschliche Genvariationen konnte nun gezielt nach genetischen Veränderungen im menschlichen Genom gesucht werden, die eventuell zur Entstehung bestimmter Krankheiten beitragen.

Speziell in der Krebsforschung ermöglichen Einblicke in das Transkriptom (Gesamtheit der Exons als transkribierte Genbereiche) und die posttranslationalen Modifikationsprozesse im Proteom einer Zelle ein besseres Verständnis der Tumorentstehung und des Tumorprogresses. Durch Informationen aus Transkriptom und Proteom erhofft man sich die Identifizierung neuer diagnostischer und therapeutischer Biomarker und eventuelle Hinweise auf geeignete molekulare Ansatzpunkte für die Entwicklung einer gezielten Behandlung (Kamradt J, 2011).

4.2 Prostatakrebs

Das Prostatakarzinom (PCa) ist mit einem Anteil von knapp einem Viertel der Krebsneuerkrankungen (2013: 59620 Fälle = 23,6%) die häufigste Tumorerkrankung des Mannes (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016).

Zwischen 1970 und etwa 2003 stieg die Inzidenz des Prostatakarzinoms aus demographischen Gründen sowie durch verbesserte und in der Bevölkerung zunehmend akzeptierte Früherkennungsmethoden stetig an, seitdem zeichnet sich eine Stabilisierung ab. Trotz seit etwa 2007 gleichbleibender Mortalität verstarben im Jahr 2013 mehr als 13000 Männer in Deutschland an ihrem Prostataatumor (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016).

Eine kurative Behandlung des Prostatakarzinoms ist nur im organbegrenzten Stadium möglich (Leitlinienprogramm Onkologie, AWMF-S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2016), später ist der Tumor häufig lokal inoperabel oder systemisch fortgeschritten. PCas bilden im Gegensatz zu den meisten anderen epithelialen Tumoren vor allem osteoblastische Knochenmetastasen mit dadurch verursachten Komplikationen wie Schmerzen, pathologischen Frakturen oder Kompression des Rückenmarks (Logothetis C and Lin S, 2005; Attard G et al., 2016).

Das Prostatakarzinom ist ein inhomogener Tumor und im klinischen Alltag sieht man sowohl langsam progrediente Verlaufsformen mit sehr später oder ausbleibender Metastasierung (indolente Karzinome ohne Einfluss auf die Lebenserwartung des Patienten), als auch solche mit

aggressivem Wachstum und früher Filialisierung in regionale Lymphknoten und entfernte Organe. Der spätere Verlauf eines im Frühstadium diagnostizierten Tumors lässt sich bisher jedoch noch nicht individuell sicher voraussagen.

Die Entdeckung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Jahr 1979 (Wang M et al., 1979) hat die Prostatakrebsdiagnose damals revolutioniert. Das Glykoprotein PSA, kodiert durch das *KLK3*-Gen, wird ausschließlich in den Drüsenzellen der Prostata produziert und trägt zur Verflüssigung des Samens bei. Es wird in großen Mengen ins Sperma, in einer kleineren Menge jedoch auch ins Blut sezerniert und ist dort einer Konzentrationsbestimmung leicht zugänglich. Dieses organ-, aber nicht tumorspezifische Protein kann sowohl bei einer malignen als auch bei einer benignen Veränderung der Prostata erhöht sein. Obwohl ein linearer Zusammenhang zwischen der Höhe des PSA-Wertes und dem Tumornachweis besteht (Leitlinienprogramm Onkologie, AWMF-S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2016), wurden mittlerweile Genvariationen (z.B. SNPs im *KLK3*-Gen oder verwandten Genen) entdeckt, die die Höhe der PSA-Serumwerte unabhängig beeinflussen (Gudmundsson J, 2010). Zudem wurde keine Korrelation zwischen dem initialen PSA-Wert und dem klinischen sowie pathologischen Tumorstadium gefunden (Hendriks J et al., 2016).

Leider führt die Verwendung des PSA-Wertes in der Primärdiagnostik wegen seiner geringen Spezifität zu Überdiagnose und Übertherapie (Smits M et al., 2017). Die Diagnose einer Tumorerkrankung, die für den Patienten nie Auswirkung auf seine Lebenserwartung und Lebensqualität haben würde, sollte zum Wohle des Betroffenen vermieden werden. Ein diagnostiziertes, aber indolent wachsendes, also wohl klinisch insignifikantes Karzinom sollte zur Vermeidung von Therapie Nebenwirkungen und damit verbundener teils erheblicher Auswirkungen auf die Lebensqualität nicht aggressiv therapiert werden (Stenman U et al., 2005; Recker F, 2006; Pilia I, 2007; Draisma G et al., 2003).

Zur Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten wurde in den letzten Jahren die Verwendung des *Prostate Health Index* (PHI, Berechnungsformel siehe Abkürzungsverzeichnis, Seite 97) vorgeschlagen und von der *US-Food and Drug Administration (US-FDA)* für den PSA-Bereich von 4 – 10 ng/ml zugelassen. Hier hatte sich eine Korrelation mit aggressiv voranschreitenden PCas gezeigt (Catalona W et al., 2011; Loeb S and Catalona W, 2014).

Bussemakers entdeckte im Jahr 1999 (Bussemakers M et al., 1999) das Prostatakrebs-Antigen *PCA3* (Prostate Cancer Antigen 3), ein Gen auf Chromosom 9q21.2, dessen Transkript eine lange nichtkodierende *messengerRNA* darstellt (Filella X and Foj L, 2016) und sich in 95% der untersuchten Prostatakarzinome sowie Metastasen stark überexprimiert fand (im Median etwa 66-fach höhere Expression im Vergleich zu normalem Prostatagewebe, Bussemakers M

et al., 1999). Im direkten Vergleich zu PSA wird es von äußeren Faktoren wie Alter, Prostata-
volumen, Entzündung und vorausgegangenen Biopsien deutlich geringer beeinflusst (Hen-
driks J et al., 2016). *PCA3* mRNA-Transkripte werden im Urin gemessen und mit der indivi-
duellen PSA-Expression normalisiert. Dieser diagnostische Biomarker wurde von der *US-
FDA* zur Anwendung bei Männern mit erhöhtem PSA-Wert, aber vorausgegangener negativer
Biopsie zugelassen.

Der PSA-Wert hat indiskutable Mängel in der Spezifität (organspezifisch, aber nicht PCa-
spezifisch) und wegen des fehlenden unteren Grenzwertes (Thompson I et al., 2004) auch in
der Sensitivität. Dennoch findet der PSA-Wert mangels sinnvoller Alternativen in der pri-
mären Tumordiagnostik breite Anwendung als diagnostischer Marker.

Seit Veröffentlichung der vorläufigen und noch ambivalenten Studienergebnisse zweier gro-
ßer randomisierter Multicenter-Studien in Europa (*European Randomized Study of Screening
for Prostate Cancer*, ERSPC) und den USA (*Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer
Screening Trial*, PLCO) zum Einfluss der PSA-Wert-Bestimmung auf die Prostatakrebssterb-
lichkeit (Schröder F et al., 2012; Andriole G et al., 2012) besteht aber weltweite Einigkeit,
dass ein verdachtsunabhängiges Prostatakrebs-Screening mithilfe des PSA-Wertes nicht emp-
fohlen werden kann (Attard G et al., 2016). Zwar konnte die europäische ERSPC-Studie eine
signifikante Reduktion der prostatakrebspezifischen Mortalität durch das PSA-Screening
zeigen, allerdings mussten zur Vermeidung eines einzigen Prostatakrebs-bedingten Todesfal-
les 936 Männer gescreent und 33 Männer an ihrem Tumor behandelt werden (Schröder F et
al., 2012). In den USA konnte im Screening-Arm der PLCO-Studie, wahrscheinlich teilweise
aufgrund methodischer Mängel, keine Senkung der PCa-spezifischen Mortalität gefunden
werden. In beiden Studien war die frühe Diagnose kurabler Tumorstadien untrennbar verbun-
den mit einem hohen Prozentsatz an überdiagnostizierten und übertherapierten Tumoren
(Schröder F et al., 2009; 2012; Andriole G et al., 2012; Barry M, 2009).

4.2.1 Diagnostik und Einteilung

Nach Diagnose eines Prostatakarzinoms in den TRUS-gesteuerten Biopsien (TRUS = trans-
rektaler Ultraschall) werden der Gleason-Score (vgl. Abb. 1) in den Biopsaten und das klini-
sche Tumorstadium (TNM-Stadium, Sobin L et al., 2009) mithilfe klinischer Untersuchung,
Ultraschall und oft auch MRT (zur Entdeckung von Knochenmetastasen) bestimmt.

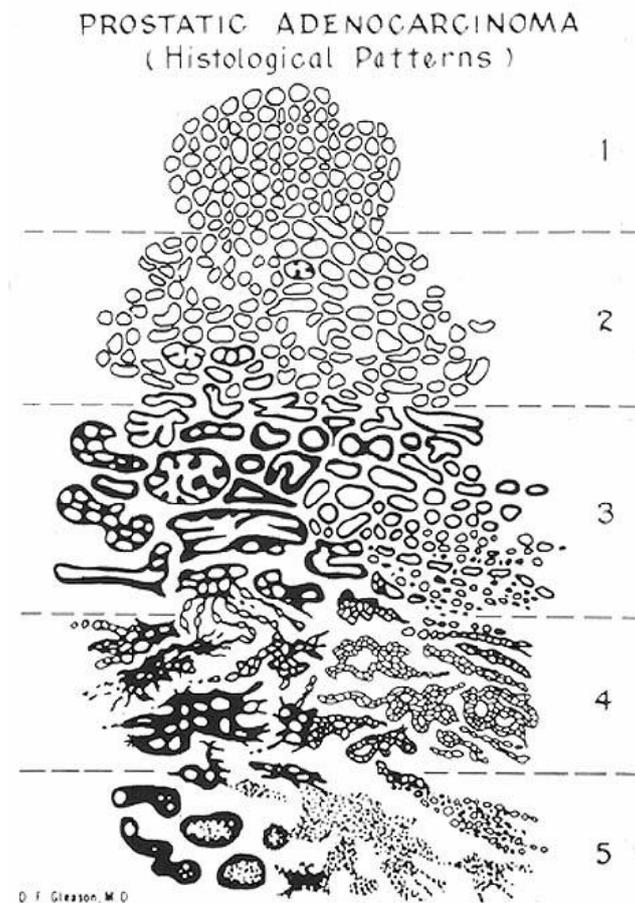


Abb. 1: Histologische Malignitätskriterien des Prostatakarzinoms nach Gleason (Gleason-Grade 1 bis 5), Berechnung des Gleason-Scores von 2 bis 10 durch Addition der Gleason-Grades des größten und des zweitgrößten Tumorareals

Grade 1: scharf begrenzter Knoten, Drüsen gleichförmig, dicht gepackt und mittelgroß

Grade 2: nicht ganz scharf begrenzter Knoten, Drüsen lockerere und ungleichmäßiger

Grade 3: unscharfer Knoten, Drüsen klein und ungleichmäßig, evtl. kleine solide Bezirke

Grade 4: Tumorbereich unscharf, Drüsen meist ohne Innenraum, verschmolzene Drüsen, solide Bezirke

Grade 5: Tumorbereich unscharf, keine klaren Drüsen, solide Bezirke, weitere Veränderungen

(Gleason D, 1966; Gleason D and Mellinger G, 1974)

In der international gültigen TNM-Klassifikation beschreibt T (Tumor, T1 bis T4) die Größe und Ausdehnung des Primärtumors in der Prostata, N (Nodules = Lymphknoten, N1 bis N3) die Beteiligung der Lymphknoten und M (Metastasis, M0 und M1) das Vorliegen von Fernmetastasen. Die Beurteilung des N-Status ist jedoch meist nur nach radikaler Operation mit Entfernung der Lymphknoten und kompletter histologischer Aufarbeitung möglich.

Die Stadien T1-2 N0 M0 werden unter der Bezeichnung „lokal begrenztes Prostatakarzinom“ zusammengefasst. Das lokal fortgeschrittene Prostatakarzinom umfasst die Stadien T3-4 N0 M0. Die Stadien N1 bis N3 und/oder M1 werden als fortgeschrittenes bzw. metastasiertes Prostatakarzinom bezeichnet (Leitlinienprogramm Onkologie, AWMF-S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2016).

In den aktuellen Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie, AWMF-S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2016) hat man die organbegrenzten Tumoren (T1-2 N0 M0) bezüglich der Entwicklung eines Rezidivs nach Operation in drei Risikogruppen eingeteilt.

Zur Einschätzung werden die drei Kriterien PSA-Wert bei Diagnosestellung, Gleason-Score und T-Stadium berücksichtigt (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Kriterien zur Einteilung von Risikogruppen für die Entwicklung eines Rezidivs beim organbegrenzten Prostatakarzinom

niedriges Rezidivrisiko <i>low risk-Tumoren</i>	mittleres Rezidivrisiko <i>intermediate risk-Tumoren</i>	hohes Rezidivrisiko <i>high risk-Tumoren</i>
PSA \leq 10 ng/ml	PSA zw. 10 ng/ml und 20 ng/ml	PSA $>$ 20 ng/ml
<i>und</i> Gleason-Score 6	<i>oder</i> Gleason-Score 7	<i>oder</i> Gleason-Score \geq 8
<i>und</i> cT1c oder cT2a	<i>oder</i> cT2b	<i>oder</i> cT2c

Selbstverständlich werden auch das Alter des Patienten sowie seine Komorbiditäten in die Entscheidung zur Therapie miteinbezogen, um so für jeden Patienten das richtige individuelle Vorgehen zu finden.

4.2.2 Therapiemöglichkeiten

Bei lokal begrenzten Tumoren in der niedrigen Risikogruppe wird heute zunehmend eine „active surveillance“ anstatt einer direkten kurativen Behandlung empfohlen. Hierbei werden regelmäßige PSA-Kontrollen, wiederholte Biopsien sowie MRT-Untersuchungen vorgenommen. Zeichnet sich eine rasche Veränderung hin zu einer aggressiveren Verlaufsform ab, wird zu einer radikalen Therapie geraten (Leitlinienprogramm Onkologie, AWMF-S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2016). In der mittleren und Hoch-Risiko-Gruppe oder wenn mehr als 2 Biopsate in der Diagnostik von Tumor befallen waren, stehen verschiedene kurative Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Standards der lokalen Therapie sind radikale Prostatektomie, Bestrahlung von extern oder als Brachytherapie. Häufige unerwünschte Nebenwirkungen von Operation und Bestrahlung sind Impotenz und Inkontinenz, bei einer Radiatio zusätzlich Verschlechterung einer vorbestehenden obstruktiven Miktionsstörung. Viele Patienten fühlen sich durch die Nebenwirkungen in ihrem täglichen Leben beeinträchtigt und klagen über eine

verminderte Lebensqualität (Recker F, 2006; Pilia I, 2007), deswegen sollten die unerwünschten Wirkungen und Therapiefolgen einer sofortigen lokalen Therapie gegen das Risiko einer nicht rechtzeitigen Behandlung im Falle einer Strategie der „active surveillance“ abgewogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, AWMF-S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2016).

Die lokal fortgeschrittenen *high-risk*-Tumoren profitieren von einem adjuvanten Androgenentzug über mindestens 6 Monate zusätzlich zu einer radikalen Bestrahlung des PCas (Attard G et al., 2016), während diese Therapiekombination aus Androgenentzug und Radiatio für Niedrig-Risiko-Tumoren keinen Überlebensvorteil bringt (Jones C et al., 2011).

Inoperable Tumorstadien können durch Androgenentzug (Orchiektomie oder medikamentöse Kastration mit vorwiegend nicht-steroidalen Antiandrogenen sowie LHRH-Agonisten) oft über längere Zeit am Wachstum gehindert werden. Im Laufe der Zeit entwickelt der Tumor jedoch meist ein davon unabhängiges progredientes Wachstum, eine sogenannte Kastrationsresistenz. Heute weiß man, dass das Tumorstadium dennoch hormongesteuert bleibt und Begriffe wie „hormonrefraktär“ oder „androgenunabhängig“ falsch waren und nicht mehr verwendet werden sollten (Attard G et al., 2016).

Seit 2011 haben sich die Therapiemöglichkeiten des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (mCRPC) deutlich verbessert. Abiraterone ist durch selektive irreversible Blockade des Cytochroms P450 c17 ein starker Inhibitor der Androgen-Biosynthese in den Nebennieren, den Hoden und in der Prostata (de Bono J et al., 2011). Enzalutamid ist als Inhibitor des Androgenrezeptor-Signalweges auf mehreren Ebenen (Hemmung der Ligandenbindung sowie der Translokation des Androgenrezeptorkomplexes in den Zellkern, Reduktion der DNA-Bindung und der Rekrutierung von Kofaktoren für die Transkription) ein potentes Antiandrogen der nächsten Generation (Scher H et al., 2012; Attard G et al., 2016). Beide Substanzen sind sowohl für chemo-naive als auch für Patienten nach der bereits seit langem eingesetzten Docetaxel-Chemotherapie zugelassen und bringen signifikante Überlebensvorteile (Attard G et al., 2016). Vorläufige Studiendaten zur Wirkung von Abiraterone nach vorheriger Gabe von Enzalutamid und umgekehrt lassen vermuten, dass sich trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen kein weiteres Ansprechen ergibt (Noonan K et al., 2013; Lortie Y et al., 2013; Bianchini D et al., 2014). Als letzte Option steht für Patienten mit Krankheitsprogression unter Docetaxel oder nach Therapie mit Abiraterone oder Enzalutamid das Zweitgenerations-Taxan Cabazitaxel, ein Mikrotubuli-Inhibitor, zur Verfügung. Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen nicht ganz verstanden sind, zeigte es eine antitumoröse Aktivität auch bei Abiraterone-resistenten und Enzalutamid-resistenten Patienten (Pezaro C et al., 2014).

Bei bestehenden Knochenmetastasen wird die Therapie entweder durch ein Bisphosphonat (meist Zoledronsäure) ergänzt, welches die Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption inhibiert, oder durch Denosumab, einen humanen monoklonalen Antikörper gegen den RANK-Liganden, zur Blockade der Osteoklasten-Aktivierung (Attard G et al., 2016). Im Vergleich der beiden Substanzen ist Denosumab der Zoledronsäure etwas überlegen bei Verhinderung von skelettbedingten Komplikationen, weist aber das ungünstigere Nebenwirkungsprofil auf. Mit einer Immuntherapie versucht man die Produktion von Tumorzell-lysierenden CD8-Killer-Zellen anzuregen. Die aktive zelluläre Immuntherapie Sipuleucel-T besteht aus autologen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten inklusive Antigen-präsentierender Zellen, die außerhalb des Körpers mit rekombinantem *fusionPSA* aktiviert und anschließend wieder infundiert werden. Die Ergebnisse einer Phase 3-Studie zeigten einen deutlichen Überlebensvorteil für die behandelten Patienten (Kantoff P et al., 2010). Weitere Immuntherapien sind noch in klinischer Erprobung und nur im Rahmen von Studien verfügbar (Attard G et al., 2016).

4.2.3 Risikofaktoren und Genetik

Den bedeutsamsten Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatatumors stellt nach heutigem Erkenntnisstand das zunehmende Alter dar. Mehr als 90% der Patienten sind über 60 Jahre alt, eine Erkrankung vor dem 50. Lebensjahr ist selten (s. Abb. 2). Das mittlere Lebensalter bei Diagnosestellung beträgt zurzeit 71,9 Jahre. Die Männer, die an einem PCa versterben, sind durchschnittlich 78,9 Jahre alt (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, <http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE>, Kapitel 2.6 Prostatakarzinom, S. 40 - 43).

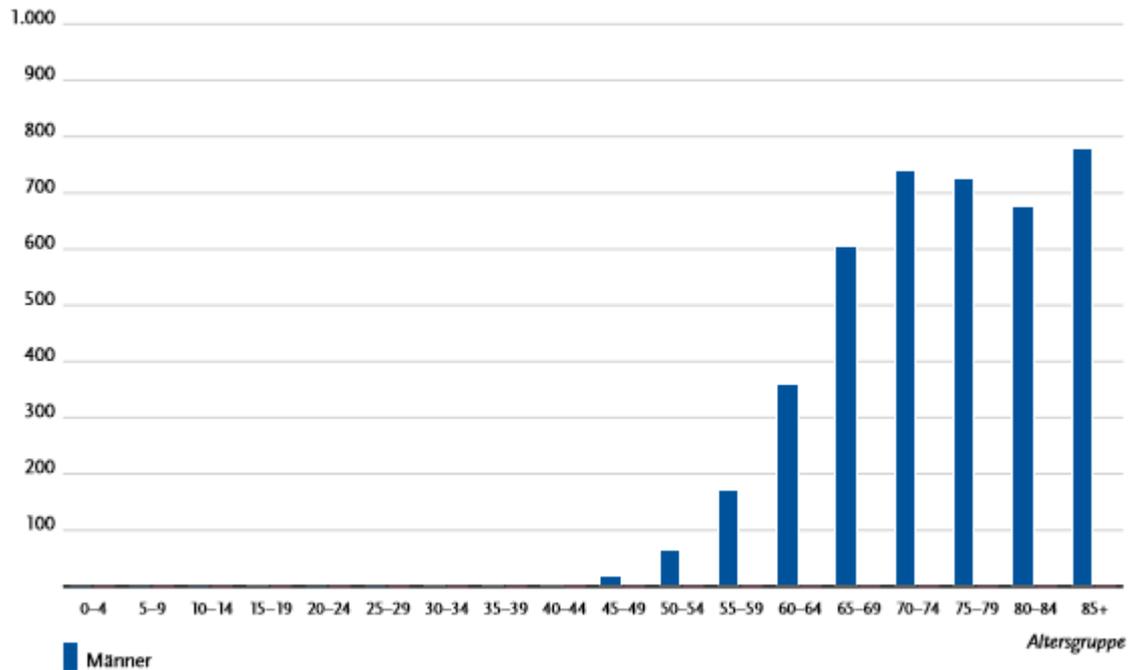


Abb. 2: Altersspezifische Erkrankungsdaten, ICD-10 C61 (Prostatakarzinom), Deutschland 2011 – 2012, je 100.000 (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016)

Generell haben Männer schwarzafrikanischen Ursprungs ein höheres Risiko, ein PCa zu entwickeln als Europäer oder Nordamerikaner. In Asien ist die Erkrankung dagegen relativ selten (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Kapitel 2.6 Prostatakarzinom, S. 40 - 43). Die Bedeutung von Lebensstil und Umweltfaktoren in der PCa-Entstehung wird noch kontrovers diskutiert. Tabakrauch und Adipositas (insbesondere ein größerer Bauchumfang) scheinen beispielsweise das Risiko für einen höhermalignen Tumor sowie für ein geringeres Gesamtüberleben zu erhöhen (Perez-Cornago A et al., 2017; Ferrís-i-Tortajada J et al., 2011; Kenfield S et al., 2011).

Außer dem Alter und der ethnischen Herkunft ist eine familiäre genetische Disposition der einzige bisher gesicherte Risikofaktor für die Entwicklung eines PCas (Attard G et al., 2016). Sind Verwandte ersten Grades erkrankt, steigt das Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung um das Doppelte bis Vierfache an, je nachdem ob die Erkrankung nach oder bereits vor dem 60. Lebensjahr aufgetreten ist (Johns L and Houlston R, 2003). Bisher wurden einige seltene, aber Hochrisiko-Mutationen identifiziert, wie z.B. im *homeobox gene HOXB13* oder im *BRCA2*-Gen (Ewing C et al., 2012; Thompson D et al., 2001). Eine Korrelation dieser Genvarianten mit einem höheren Gleason-Score (Mitra A et al., 2008) sowie einer schlechteren Prognose (Castro E et al., 2013) konnten eindeutig nachgewiesen werden. Diese beiden genetischen Veränderungen und einige andere (z.B. in den Genen *BRCA1*, *CHEK2* oder

NBS1) zeichnen für etwa 5% der familiären PCa-Fälle verantwortlich (Attard G et al., 2016). Weitere 30% werden verursacht durch häufig auftretende Niedrig-Risiko-Konstellationen wie Veränderungen in einem oder mehreren der mittlerweile 100 verschiedenen, in *genome-wide association studies* (GWAS) identifizierten und mit Prostatakrebs assoziierten, *SNP*-Loci (Eeles R et al., 2014; Al Olama A et al., 2014). Die erste in den GWAS nachgewiesene, eindeutig mit Prostatakrebs in Verbindung stehende Region, war die nichtkodierende Region 8q24 in unmittelbarer Nachbarschaft zum Onkogen *c-MYC* (Freedman M et al., 2011). Frühe Erkrankung vor dem 60. Lebensjahr oder familiär gehäuftes Vorkommen werden generell als Risiko für eine aggressive Krankheitsentwicklung eingestuft. Etwa zwei Drittel der familiären Prostata-Krebsfälle sind nach heutigem Kenntnisstand noch nicht zu erklären (Attard G et al., 2016).

Eine noch weitaus größere Herausforderung sind aber die vielen nichtfamiliären Fälle von Prostatakarzinomen sowie ihre frühe prognostische Einteilung in indolente oder aggressive Karzinome. Zudem sollte diese Einteilung bereits an Prostata-Stanzbiopsaten und nicht erst an Operationspräparaten möglich sein, also noch vor Entscheidung zu einer invasiven Therapie. Ziel wäre eine personalisierte Medizin mit molekularer Analyse jeder pathologischen Prostatastanzbiopsie zur Erstellung eines individuellen Behandlungsplanes, der sich sowohl an den molekularen Besonderheiten des Tumors orientiert, als auch die Risikofaktoren des Betroffenen berücksichtigt.

Die aktuelle Prostatakrebsforschung konnte bereits einige Gene identifizieren, die sicher mit der Entstehung von Prostatakrebs oder der Progredienz zur Kastrationsresistenz assoziiert werden. Trotz aller Forschungstätigkeiten der letzten Jahrzehnte gibt es bisher aber keinen verlässlichen prognostischen Marker, der bei der Entscheidung für oder gegen eine (nebenwirkungsreiche aggressive) Therapie wegweisend wäre (Kamradt J, 2011; Kamradt J et al., 2007). Seit Einführung einiger neuer Therapieoptionen beim kastrationsresistenten Tumor in den letzten Jahren, bleibt die frühe individuelle Prognoseabschätzung bereits an Prostata-Stanzbiopsaten die vorherrschende klinisch-pathologische Herausforderung in der Behandlung des Prostatakarzinoms.

Auf der Suche nach wiederkehrenden Eigenschaften aggressiv verlaufender Tumore, welche eventuell als prognostische Biomarker dienen könnten, sind nicht nur die generellen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bei der Entstehung der Erkrankung sowie beim Progress zur Kastrationsresistenz wichtig, sondern insbesondere eine bessere Charakterisierung der genomischen und molekularen Vielfalt der Prostatakarzinome (Berg K, 2016).

4.3 Fragestellung dieser Arbeit

Die Arbeitsgruppe, in der ich eine gewisse Zeit mitarbeiten durfte, untersuchte bereits seit längerem genetische Veränderungen im Prostatakarzinom in der Hoffnung, signifikante und reproduzierbare Unterschiede zwischen gesunder und maligne entarteter Prostatazelle zu finden. Damit bestimmte Gene in Tumoren häufiger oder seltener exprimiert werden als in einer normalen Zelle, kommt es oft zu Gewinnen oder Verlusten in der Genkopienzahl.

Zur Zeit der experimentellen Arbeiten für diese Dissertation, in den Jahren 2005-2007, war die Methode der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) weit verbreitet, um ein gesamtes Genom in nur einem Experiment nach Kopienzahlveränderungen zu untersuchen. Sie war 1992 entwickelt und seit dieser Zeit mehrfach verbessert worden.

Auch in dieser Arbeitsgruppe war die konventionelle CGH seit Jahren etabliert und wurde als Standardverfahren eingesetzt (Sattler H et al., 1999; Lensch R et al., 2002). So war zum Beispiel anhand komplizierter bioinformatischer Modellberechnungen zu den CGH-Daten gezeigt worden, dass die Muster der chromosomalen Veränderungen wertvolle prognostische Informationen über einen Tumor enthalten (Rahnenführer J et al., 2005; Kamradt J, 2011). Für die auf dem Markt bereits verfügbare Sequenzierung fehlten die technischen und personellen Voraussetzungen.

Da aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe Daten aus konventioneller chromosomaler CGH zu verschiedenen Prostatakrebs-Zelllinien vorlagen, wollten wir diese mit der neueren, etwa 1000-fach höher auflösenden, *Microarray*-basierten CGH überprüfen. Die *ArrayCGH* an Oligonukleotiden lieferte insbesondere rund um die Zentromere und im Bereich der Telomere verlässliche Daten (Kamradt J, 2011) und bot deswegen enorme Vorteile gegenüber der chromosomenbasierten herkömmlichen CGH, die dort aus technischen Gründen gewisse Schwächen aufwies. Mit der Oligonukleotid-basierten *ArrayCGH* konnte auch die Auflösung der *BAC*- oder *cDNA*-basierten *Arrays*, die bis dahin meist für die Analyse von Prostatakrebs-Zelllinien und klinischen Proben verwendet worden waren, deutlich übertroffen werden (Wolf M et al., 2004; Saramäki O et al., 2006; Clark J et al., 2003; Zhao H et al., 2005; Nupponen N et al., 1998; Paris P et al., 2003; van Dekken H et al., 2004; Hermans K et al., 2004; Yano S et al., 2004).

Für diese Arbeit wurden sieben etablierte Modellzelllinien für das Prostatakarzinom mit einem speziell für die Expressionsanalyse entwickelten, 35 000 Oligonukleotide umfassenden *Array* untersucht, um eine detaillierte genomische Charakterisierung zu erhalten. Beim Vergleich dieser Daten mit den vorliegenden *cCGH*-Daten fanden wir in den *ArrayCGH*-Ergebnissen mehrerer Zelllinien eine amplifizierte Genregion auf Chromosom 9 nahe des

Zentromers (9p13.3), welche aufgrund ihrer perizentromerischen Lage mit der konventionellen CGH bisher nicht entdeckt worden war.

Aus dieser Entdeckung ergab sich die Fragestellung meiner Arbeit. Mithilfe der *ArrayCGH* konnte mit hoher Auflösung ein gesamtes Genom auf Kopienzahlveränderungen untersucht werden. Mit der *Real-Time-Genosis-PCR* konnte anschließend jede beliebige auffällige Stelle im Genom gezielt genauer aufgearbeitet und zwischen einzelnen Genen differenziert werden. Durch die Kombination der beiden Methoden *ArrayCGH* und *Real-Time-Genosis-PCR* wollte ich neue Zielgene der Amplifikation beim Prostatakarzinom bestimmen.

Den neuen, erstmals mit der *ArrayCGH* detektierten Gengewinn konnte ich in einer *BAC-FISH* mit einer Sonde für die Region 9p13.3 eindeutig bestätigen.

Beim Studium der wenigen bereits existierenden Publikationen zu dieser Region hatte sich gezeigt, dass in dem amplifizierten Bereich zwei verschiedene Gene lagen, *IL1RA* und *DCTN3*. Bisher war nicht untersucht, ob nur eines oder beide Gene erhöhte Kopienzahlen hatten und so stellte sich die Frage, welches das potenzielle Zielgen der amplifizierten Genregion 9p13.3 beim PCa sein könnte.

Mit quantitativer *Real-Time-PCR* ermittelte ich die relativen Genkopienzahlen dieser beiden Gene in verschiedenen *in vitro*-Tumorzelllinien und auch an 20 primären Tumorproben im Vergleich zu gesunden Zellen. Dadurch konnte ich eines der beiden Gene zweifelsfrei als Zielgen der Amplifikation in malignen Prostatazellen identifizieren (Kamradt J, 2007).

Zu Beginn der Arbeiten hatten wir die Idee, dass wir eventuell einen neuen prostataspezifischen diagnostischen Biomarker oder einen prognostischen Biomarker zur Einteilung der im Frühstadium diagnostizierten Prostatatumore in zwei Prognosegruppen (indolentes versus aggressives Wachstum) finden könnten. Wir wollten zur Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten beizutragen, um Überdiagnose und sinnlose Übertherapie zum Wohle der Patienten in Zukunft auf ein Minimum reduzieren zu können.

Rückblickend betrachtet, taugt das von uns identifizierte Zielgen jedoch weder als diagnostischer noch als prognostischer Biomarker.

Die Forschung anderer Arbeitsgruppen in den vergangenen Jahren brachte jedoch sehr spannende Ergebnisse zu unserem Zielgen auf einem ganz anderen Feld der PCa-Forschung.

5 Material

5.1 Geräte

- Agarose-Gelkammer, Easy-Cast™ Owl Scientific Inc., Wobum, USA
- Array-Scanner Scan Lite Express PerkinElmer, Massachusetts, USA
- Auflichtfluoreszenzmikroskop Olympus BX 50 Olympus, Hamburg
- Autoklav 5075HSG Tuttnauer, Wesel
- Brutschrank 37°C, HERAcell Kendro, Hanau
- CCD-Kamera Olympus BX 50 Olympus, Hamburg
- Filterwürfel für Olympus BX 50 Olympus, Hamburg
- NU (DAPI):**
Anregung 360-370 nm, Emission >420 nm, Strahlenteiler Transmission 400 nm
- MWIBA (FITC):**
Anregung 460-490 nm, Emission 515-550 nm, Strahlenteiler Transmission 505 nm
- MWIG (Cy3):**
Anregung 520-550 nm, Emission >580 nm, Strahlenteiler Transmission 565 nm
- Gefrierschrank -80°C
- Geldokumentationsanlage Imago B&L Systems, Maarsen, NL
- Heizblock Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
- Heizplatte RS Laborgeräte, Martinsried
- Kühl- und Gefrierschrank 4°C/ -20°C
- MAUI® hybridization system BioMicro Systems, SaltLake City, USA
- Mikrowelle
- Netzgerät, Electrophoresis Power Supply Amersham Biosciences, Freiburg
- Operon Maui-Kammer Operon, Köln
- PCR-Gerät LightCycler Roche Diagnostics, Mannheim
- PCR-Gerät TaqMan® 7900HT Applied Biosystems, California, USA
- Thermocycler PTC-200 MJ Research, California, USA
- Phasenkontrastmikroskop Axiovert S100 Zeiss, Jena
- pH-Meter, InoLab WTW, Weilheim
- Pipette Microman Gilson, Den Haag, Niederlande
- Spectrophotometer NanoDrop® ND 1000 peqlab, Erlangen
- Überkopffrotator, GFL 3025 Labortechnik GmbH, Burgwedel
- Vakuumpumpe Vacusafe Kendro, Hanau
- Vakuumzentrifuge SpeedVac, UniEquip RS Laborgeräte, Martinsried
- Vortex Janke&Kunkel GmbH, Staufen
- Feinwaage Kern, Balingen

- Wasserbad
- Wasserbad
- Werkbank HERAsafe
- Zentrifuge 5415C
- Zentrifuge B4i
- Zentrifuge C422
- Zentrifuge, LightCycler Karussell

Medingen GmbH, Medingen
 Julabo, Seelbach
 Kendro, Hanau
 Eppendorf, Hamburg
 Jouan, Unterhaching
 Jouan, Unterhaching
 Roche Diagnostics, Mannheim

5.2 Einmal-Material und Verbrauchsmittel

- Objektträger, Human Genome OpArray™
- Deckgläser, Maui Mixer A0 Hybridization
- Destilliertes Wasser
- Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml
- Falcons 10/ 25 ml
- Glaskapillaren, LightCycler
- Kühlblock, LightCycler
- Küvetten
- MicroAmp, Optical 96-well reaction plate
- *Mixer chambers*
- Optical Adhesive Covers
- PCR-Tubes
- Pipettenspitzen 10/ 20/ 200/ 1000 µl
- Pipettenspitzen ,Gilson CP 100
- Sterilfilter 0,45 µm
- Zellkulturflaschen 75 cm²
- Zentrifugenröhrchen 15/ 50 ml

Operon, Köln
 Operon, Köln
 Delta Select GmbH, Pfullingen
 Eppendorf, Hamburg
 BD Biosciences, Heidelberg
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Agilent Technologies, Böblingen
 Applied Biosystems, California, USA
 BioMicro Systems
 Applied Biosystems, California, USA
 Eppendorf, Hamburg
 Nerbe Plus GmbH, Winsen/Luhe
 Gilson, Den Haag, Niederlande
 Millipore, Bedford, UK
 Becton Dickinson, Heidelberg
 Greiner, Frickenhausen

5.3 Chemikalien

- Agarose, SeaKem LE
- Blockierungslösung Blocking-Reagenz
- BSA (bovines Serumalbumin, Fraktion V)
- Chloroform
- Dextransulfat 20%
- DMSO (Dimethylsulfoxid)
- EDTA (Ethylendiamintetraacetat), Plus One
- Ethanol 70%, 80%, 96%
- Ethidiumbromid (1: 10000)

Cambrex, Oldendorf
 Roche Diagnostics, Mannheim
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt
 Sigma Aldrich, Taufkirchen
 Sigma Aldrich, Taufkirchen
 Amersham Biosciences, Freiburg
 Merck, Darmstadt
 Merck, Darmstadt

- FCS (fetales Kälberserum) Sigma Aldrich, Taufkirchen
- Formamid Merck, Darmstadt
- Formamid, deionisiert Sigma Aldrich, Taufkirchen
- Isopropanol Merck, Darmstadt
- Natrium-Acetat 3 M Sigma Aldrich, Taufkirchen
- PBS (phosphate buffered saline, phophatgepufferte Salzlösung) Sigma Aldrich, Taufkirchen
- PFA (Paraformaldehyd) Sigma Aldrich, Taufkirchen
- SDS (Natriumdodecylsulfat) 20% Fluka, Hannover
- SSC (saline sodium citrate), 20-fach Fluka, Hannover
- SSC, 2-fach Fluka, Hannover
- Stop-Lade-Mix PeqLab, Erlangen
- TaqMan® Universal PCR MasterMix Applied Biosystems, California, USA
- Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) Sigma Aldrich, Taufkirchen
- Triton X100 Sigma Aldrich, Taufkirchen
- Trypsin-EDTA Sigma Aldrich, Taufkirchen

5.4 Marker, Farbstoffe, Antikörper, Desoxyribonukleotide

- Peq Gold 50 bp DNA-Leiter PeqLab, Erlangen
- Fluoreszenzfarbstoff *CyDyeTM 3-dUTP* Amersham Biosciences, Freiburg
- Fluoreszenzfarbstoff *CyDyeTM 5-dUTP* Amersham Biosciences, Freiburg
- dATP 100 mM Amersham Biosciences, Freiburg
- dCTP 100 mM Amersham Biosciences, Freiburg
- dGTP 100 mM Amersham Biosciences, Freiburg
- dTTP 100 mM Amersham Biosciences, Freiburg
- Biotin-anti-Streptavidin Vector Laboratories, California, USA
- Streptavidin-*FITC* Vector Laboratories, California, USA
- anti-digoxigenin-Cy 3 Dianova, Hamburg
- Goat-anti-Mouse-Cy 3 Dianova, Hamburg
- *Vectashield* mit *DAPI-Antifade* Vector Laboratories, California, USA
- *Cot-1*-DNA Invitrogen Life Technologies, Darmstadt
- BAC RP11-165H19 (Gen Bank accession number AQ382511) BACPAC Resource Center, Children's Hospital im Oakland Research Institute in California, USA
- Zentromersonde für Chromosom 9 (D9Z1) Oncor, Gaithersburg, MD, USA

5.5 Enzyme

- Proteinase K Roche Diagnostics, Mannheim

5.6 Medien, Puffer und Lösungen

5.6.1 Zellkulturmedien

- DMEM (Dulbecco's mod. Eagle – Medium) Sigma Aldrich, Taufkirchen
- RPMI Sigma Aldrich, Taufkirchen

5.6.2 Puffer und Lösungen

- TE-Puffer, 1-fach, pH 7,6
10 mM TrisHCl
1 mM EDTA
- PBS-Puffer, 1-fach, pH 7,4
3 mM KCl
140 mM NaCl
8 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
1,5 mM KH₂PO₄

Gelelektrophorese

- TAE-Laufpuffer, 1-fach, pH 8,0
40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA
- Ethidiumbromid-Lösung
5 µl Ethidiumbromid (1 µg/ml)
50 ml TAE-Puffer, 1-fach
GelStar®-Lösung (Biozym, 10000-fach konzentriert, in DMSO gelöst)

FISH

- Pepsin-Stammlösung, pH 2,0
50 µl Pepsin
100 ml Salzsäure 0,01 M
- Fixierungslösung für Objektträger
4% PFA (Paraformaldehyd)
PBS

5.8 Oligonukleotidprimer

5.8.1 Untersuchung der Gen-Amplifikation

- 20x *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assay Mix* Applied Biosystems, California, USA
DCTN3 (C_25472566_10)
IL11RA (C_11340987_10)
TOP2B (C_8063527_10)
ALDH1B1 (C_8777946_1_)

5.8.2 Intra-ALU-PCR (ArrayCGH-Analyse)

- Alu-forw* (Sequenz 5'→3': GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT)
Alu-rev (Sequenz 5'→3': ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG)
 Operon, Köln

5.8.3 Inter-ALU-PCR (FISH-Analyse)

- AluBari-1** (Sequenz 5'→3': GGATTACAGGYRTGAGCCA)
AluBari-2 (Sequenz 5'→3': RCCAYTGCACTCCAGCCTG)
 Operon, Köln

5.9 Software

- NanoDrop 1000 Version 3.2.1 PeqLab, Erlangen
- LightCycler Relative Quantification 1.01 Roche Diagnostics, Mannheim
- *LightCycler Software 3.5* Roche Diagnostics, Mannheim
- ABI PRISM[™] Sequence Detection Software 2.1 Applied Biosystems, California, USA
- DeArray
- MetaSystems ISIS 3 software MetaSystems, Altlußheim
- open source Software Bioconductor Gentleman R et al., 2004

5.10 Datenbanken

- Prostatakarzinom-Zelllinien: capcellines.ca
- Krebsprofildatenbank Oncomine[™]: www.oncomine.org

5.11 PCa-Zelllinien

PC3_{HOM}, (ATCC: CRL-1435)

Die hormonunabhängige Tumorzelllinie *PC3_{HOM}* wurde aus einer Knochenmetastase eines undifferenzierten Adenokarzinoms der Prostata bei einem 62-jährigen europäischen Mann isoliert (Kaighn M et al., 1979).

American Type Cell Culture Collection
ATCC, Rockville, MD, USA

PC-3N

Nach orthotoper Einpflanzung von *PC3*-Zellen in eine Nacktmaus bekam diese eine paraaortale Lymphknotenmetastase. Die aus der Lymphknotenmetastase isolierten Zellen nannten Rembrink et al. *PC-3N* (Rembrink K et al., 1997).

DUI45_{HOM}, (ATCC: HTB-81)

Die androgenunabhängige Zelllinie *DUI45_{HOM}* stammt aus der Hirnmetastase eines 69-jährigen weißen Mannes mit einem stark metastasierten Prostatakarzinom (Stone K et al., 1977).

American Type Cell Culture Collection
ATCC, Rockville, USA

DUI45-MNI

Die Zelllinie *DUI45-MNI* ging nach orthotoper Implantation von *DUI45*-Zellen in die Prostata von Nacktmäusen aus einer Lymphknotenmetastase hervor (Bex A et al, 2001). Auch sie ist androgenunabhängig.

CWR22

Nach subkutaner Xenograft-Transplantation von primären Prostatakarzinomzellen eines Grad 4-Tumors (ossäre Metastasen, Gleason-Grade von 9) in Nacktmäuse entstand die Zelllinie *CWR22* (Pretlow T et al., 1993). Sie reagiert sensibel auf Hormonentzug (Wainstein M et al., 1994).

American Type Cell Culture Collection
ATCC, Rockville, USA

CWR22-RVI

Durch Hormonentzug schrumpften die hormonsensiblen CWR22-Tumore in den Nacktmäusen. Nach Entwicklung eines Rezidivs wurde 1999 von Sramkoski (Sramkoski R et al., 1999) die hormonunabhängige Tochterzelllinie CWR22-RVI isoliert.

American Type Cell Culture Collection
ATCC, Rockville, USA

LNCaP

Diese Tumorzelllinie wurde 1980 von Horoszewicz aus einer supraclaviculären Lymphknotenmetastase des hormonabhängigen PCa eines 50-jährigen Europäers isoliert (Horoszewicz J et al., 1983).

American Type Cell Culture Collection
ATCC, Rockville, MD, USA

5.12 Gewebeproben

Mit der *Real-Time*-PCR bestimmten wir die Genkopienzahlen unserer Zielgene in 20 primären Adenokarzinomen der Prostata. Die Tumorproben stammten aus radikalen Prostatektomien von noch nicht vorbehandelten (therapienaiven) Patienten der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar. Die Gewebeproben wurden nach der Operation von einem Pathologen aufgearbeitet und anhand der histologischen Kriterien nach Gleason klassifiziert. Es wurden nur Proben in die Untersuchungen eingeschlossen, die zu mehr als 50% aus Tumorzellen bestanden.

Von den 20 Tumorproben wurden 11 als pT2 und 9 als pT3 klassifiziert. Fünf der pT3-Tumoren wiesen schon Lymphknotenmetastasen auf, wohingegen bei keinem der Patienten zum Zeitpunkt der Operation Fernmetastasen vorlagen.

Der Gleason-Score zur Bestimmung des Malignitätsgrades war bei dreizehn der Tumoren größer 7, in zwei Fällen gleich 7 und in fünf Fällen kleiner als 7 (siehe hierzu Tabelle 2).

Das mittlere Alter der Patienten bei Operation lag bei 66 Jahren und 8 Monaten (66,65 Jahre) und variierte von 57 bis 74 Jahre.

Tabelle 2: 20 Prostata-Gewebeproben

Angaben zu Patientenalter und Klassifikation des Prostatakarzinoms (TNM-Stadium, postoperativer Resektionsstatus und Gleason-Score)

Nummer	Tumor- probe	Alter des Patienten	TNM-Stadium			postop. R-Status	Gleason- Score
1	PCa 22	73	pT3b	pN1	M0	1	4+5=9
2	PCa 42	73	pT3b?	pN0	M0	0	5+3=8
3	PCa 72	65	pT2b	pN0	M0	1	2+3=5
4	PCa 80	65	pT3a	pN0	M0	1	3+5=8
5	PCa 89	67	pT2b	pN0	M0	1	2+1=3
6	PCa 91	61	pT3b	pN1	M0	1	4+5=9
7	PCa 95	74	pT3b	pN1	M0	1	5+5=10
8	PCa 101	68	pT3a	pN0	M0	1	3+5=8
9	PCa 119	62	pT3b	pN1	M0	1	4+5=9
10	PCa 121	65	pT2b	pN0	M0	1	2+4=6
11	PCa 137	72	pT2b	pN0	M0	1	3+5=8
12	PCa 139	64	pT3b	pN1	M0	1	4+5=9
13	PCa 149	61	pT2b	pN0	M0	0	3+3=6
14	PCa 157	57	pT2a	pN0	M0	0	3+5=8
15	PCa 187	68	pT2b	pN0	M0	0	3+5=8
16	PCa 191	71	pT2b	pN0	M0	1	3+4=7
17	PCa 193	67	pT2b	pN0	M0	0	3+5=8
18	PCa 199	68	pT2b	pN0	M0	0	2+1=3
19	PCa 209	70	pT3a	pN0	M0	1	4+3=7
20	PCa 217	62	pT2b	pN0	M0	0	3+5=8

6 Methoden

6.1 Zellkultur

6.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Zellen der Prostatakarzinomzelllinien wurden in Zellkulturflaschen (75cm² Kulturfläche) als Monolayer kultiviert und regelmäßig mittels DAPI-Färbung auf eventuelle Kontamination durch Mykoplasmen getestet. Je nach Zelllinie wurden die Zellen in DMEM- bzw. RPMI-Medium unter Supplementierung von jeweils 100 µg/ml Penicillin sowie Streptomycin und 10% FCS gezüchtet.

Die Zellen der Tumorzelllinie *PC3_{HOM}* sowie deren Abkömmling *PC3-N* wurden in phenolrothaltigem DMEM-Medium mit 2 mM L-Glutamin, 1,5 g/l Natriumbicarbonat, und 1 mM Natriumpyruvat unter Zugabe nicht-essentieller Aminosäuren kultiviert.

Die Zellen der Tumorzelllinie *DUI45* und ihrer Sublinie *DUI45-MNI* sowie die *LNCaP*-Zellen wuchsen hingegen in phenolrothaltigem RPMI-Medium, supplementiert mit 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen in einem Brutschrank mit einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂-Sättigung. Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

6.1.2 Passagierung, Subkultivierung und Zellzählung

Die Passagierung und Subkultivierung der Zellen geschah abhängig von deren Metabolismus und Wachstumsaktivität mehrfach wöchentlich nach Standardbedingungen. Dazu wurde ein Teil des alten Mediums in ein Zentrifugenröhrchen überführt, der Rest aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA (0,25% (w/v) Trypsin, 0,53 mM EDTA) innerhalb von 1 min im Brutschrank vom Boden gelöst. Danach wurde die Zellsuspension in das vorbereitete Zentrifugenröhrchen gegeben. Das im Medium enthaltene FCS stoppt die Proteolyse durch Trypsin-EDTA. Nach Zentrifugation bei ca. 900 × g (Berechnung siehe Kapitel 9 Abkürzungsverzeichnis), wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml neuem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Zur Lagerung wurden die Zellen in speziellem Einfriermedium zuerst bei -80°C im Gefrierschrank eingefroren und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert.

6.2 Nukleinsäureanalytik

6.2.1 DNA-Isolierung mit dem Blood and Cell Culture Midi Kit (Qiagen)

6.2.1.1 Vorbereitung der Zellen aus Kultur

Zur Vorbereitung wurden die kultivierten Zellen geerntet und in 2 ml PBS entsprechend einer Zelldichte von ca. 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Danach wurden 2 ml Zellsuspension mit 2 ml C1-Puffer und 6 ml A. dest. (jeweils auf 4°C gekühlt) über Kopf gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugieren bei ca. $1700 \times g$ für 10 min wurde der Überstand verworfen. Diese Einzelschritte wiederholte man nach erneuter Zugabe von 1 ml C1-Puffer und 3 ml A. dest.. Das gereinigte Zellpellet wurde in 5 ml G2-Puffer durch Vortexen aufgeschlossen. Zuletzt fügte man 95 µl Proteinase-K-Lösung zu und inkubierte den Ansatz für mindestens 60 min bei 50°C.

Das weitere Vorgehen wird im Kapitel 6.2.1.3 (DNA-Isolierung) beschrieben.

6.2.1.2 Vorbereitung der Blutlymphozyten

5 ml EDTA-Blut wurden mit 5 ml C1-Puffer (4°C) und 15 ml A. dest. (4°C) über Kopf gemischt. Die entstandene Lösung wurde für jeweils 10 min auf Eis inkubiert sowie bei etwa $1700 \times g$ zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden 1 ml C1-Puffer sowie 3 ml A. dest. zugegeben und die Lösung erneut auf Eis inkubiert sowie zentrifugiert. Zu dem verbleibenden Zellpellet mischte man 5 ml G2-Puffer. Das Pellet wurde durch Schütteln mit dem Vortex aufgeschlossen. Nach Zugabe von 95 µl Proteinase-K-Lösung folgte eine Inkubation für mindestens 60 min bei einer Temperatur von 50°C.

6.2.1.3 DNA-Isolierung

Die Säulen aus dem *Blood and Cell Culture Midi Kit* (Qiagen) wurden auf Falcon-Reaktionsgefäße mit 50 ml Volumen gesetzt und mit jeweils 4 ml QBT-Puffer equilibriert. Danach wurden die sorgfältig aufgemischten Blut- bzw. Zellsuspensionen ggfs. mit gleichem Volumen QBT-Puffer verdünnt und auf die Säulen gegeben. Über jede Säule ließ man zweimal 7,5 ml QC-Puffer zur Spülung laufen. Die DNA wurde mit 5 ml auf 50°C erhitzten QF-Puffer nach Umsetzen auf neue Falcon-Reaktionsgefäße aus der Zellsuspension gelöst.

Die verbleibende DNA-Lösung verteilte man in Aliquots zu 1 ml auf 2 ml-Eppendorf-Gefäße und gab je 700 µl kaltes Isopropanol zu. Anschließend wurde die DNA in der Kühlzentrifuge bei 4°C 20 min bei über $20\,000 \times g$ gefällt. Die Überstände wurden verworfen und die DNA durch Zentrifugieren (10 min bei über $20\,000 \times g$) mit 200 µl 70% Ethanol gereinigt. Zuletzt

ließ man die DNA an der Luft trocknen und löste sie in jeweils 50 µl TE-Puffer zur weiteren Verwendung.

6.2.2 DNA-Isolierung aus einem BAC mit dem *Maxi-Plasmid-Isolierungs-Kit* (Qiagen)

Ein *BAC* (*Bacterial Artificial Chromosome* = künstliches Bakterienchromosom) ist eine zusätzliche DNA-Ringstruktur in einem Bakterium, in die große, bis etwa 300 Kilobasenpaare lange Stücke einer Fremd-DNA einkloniert werden können. Meist handelt es sich bei der Fremd-DNA um eine humane Gensequenz, die wiederum in eine *ALU*-Sequenz eingebettet ist. Eine *ALU*-Sequenz ist eine bestimmte Form von repetitiven, also regelmäßig wiederkehrenden, DNA-Abschnitten. Sie hat Erkennungsstellen für eine Restriktionsendonuclease namens *ALU I*.

Als Vektorbakterium dient meist *E. coli*. Bei seiner Vermehrung gibt das Bakterium auch sein *BAC* mit der einklonierten menschlichen Gensequenz weiter. Kultiviert man das Bakterium, wird die entsprechende DNA-Sequenz ganz spezifisch beliebig oft amplifiziert. Bei speziellen *BAC*-Banken sind mittlerweile für fast jedes bekannte Gen solche Bakterien erhältlich.

Wir verwendeten das *BAC* RP11-165H19 (Region 9p13.3, GenBank accession number AQ382511) in einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH, siehe Kapitel 6.6) als Sonde für unser Zielgen *DCTN3*. Es wird, eingelagert in *E. coli*-Bakterien, in einem Agarose-Transportmedium geliefert. Zusätzlich sind diese Bakterien mit einem Resistenzgen gegen das Antibiotikum Chloramphenicol ausgestattet. So kann durch Zugabe von ebendiesem Antibiotikum bei der Kultivierung leicht eine Überwucherung mit anderen Bakterien verhindert werden.

Zur Kultivierung der Bakterien wurde zuerst 1 Spatelspitze Agarose-Medium mit *E. coli*-Bakterien in 500 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µl Chloramphenicol in einen autoklavierten Erlenmeyerkolben gegeben, dieser mit Watte verschlossen und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Lösung 15 min bei 4°C und etwa 2700 × *g* zentrifugiert, das Zellpellet mit P1-Puffer versetzt und durch Vortexen aufgeschlossen. Die in 1 oder 2 Falcon-Gefäße überführte Lösung vermischte man mit 10 ml P2-Puffer und inkubierte 5 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 10 ml P3-Puffer wurde jeweils mindestens 30 min auf Eis inkubiert sowie abschließend bei 250 × *g* zentrifugiert.

Die Isolierung der *BAC*-DNA aus dem Bakterium mithilfe des *Maxi-Plasmid-Isolierungs-Kit* erfolgte gemäß dem Anwendungsprotokoll des Herstellers. Pro *BAC* wurden ein bis zwei Säulen aus dem Kit auf je ein Falcon gesetzt und die Säulen mit je 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Danach gab man die Bakteriensuspension über einen Faltenfilter auf die Säule. Anschließend

wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gespült. Danach ließ man insgesamt 10 ml auf 65°C erwärmten QF-Puffer in Einzelvolumen von einem Milliliter über die Säule laufen. Es wurden Aliquots von 1 ml Lösung in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen hergestellt und jeweils 700 µl kaltes Isopropanol (4°C) beigemischt. Durch Zentrifugation bei über 20 000 × g und 4°C für 20 min wurde die BAC-DNA gefällt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die DNA bei hoher Umdrehungszahl für 10 min in der Zentrifuge pelletiert. Es folgte eine Reinigung mit 500 µl 70% Ethanol und anschließende Trocknung der DNA an der Luft. Die einzelnen DNA-Pellets wurden über Nacht bei 4°C in 20 µl TE-Puffer gelöst und am darauf folgenden Tag in einem Eppendorf-Gefäß zusammengeführt.

Die in TE-Puffer gelöste DNA konnte für kurze Zeit bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Zur langfristigen Lagerung wurde sie bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

6.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde mit dem Spectrophotometer NanoDrop® ND1000 (Peqlab, Erlangen) vorgenommen und erfolgte durch Messung der Extinktion E bei den Wellenlängen 260 nm sowie 280 nm. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine (oder genauer die aromatischen Aminosäuren in Proteinen) ihres bei 280 nm. Die Reinheit der DNA wird über den Quotienten E_{260}/E_{280} bestimmt. Der Wert des Quotienten sollte optimal zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Eine mögliche Kontamination der DNA mit Proteinen wird durch eine Verringerung des Quotienten sowie eine Kurvenerhöhung bei 280 nm auffallen. Der NanoDrop® misst Konzentrationen von 4 ng/µl bis 4 000 ng/µl.

Zur Konzentrationsmessung wurden jeweils 2 µl in TE-Puffer gelöste DNA eingesetzt.

6.2.4 Markierung der DNA mit dem Bio Prime Genomic Labeling Kit (Invitrogen)

6.2.4.1 Anhängen eines Cy 3- bzw. Cy 5-Fluoreszenzfarbstoffes

Zur Vorbereitung der Markierung wurde 1 ml einer modifizierten dNTP-Mischung (Mischung aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) mit reduziertem Anteil Desoxythymidintriphosphat (dTTP) = „low T-Mix“) angesetzt. Die Lösung bestand aus je 12 µl dATP, dCTP und dGTP, aber nur 6 µl dTTP mit 958 µl TE-Puffer (pH 8,0).

Von jeder zu markierenden DNA-Probe wurden jeweils 10 µg eingesetzt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit A. dest. bis auf 21 µl aufgefüllt. Dazu kamen 20 µl 2,5-fach *Random Priming Solution* aus dem verwendeten Kit. Zur Denaturierung wurde die DNA für 5 min im Heizblock auf 98°C erhitzt. Um das erneute Zusammenlagern der DNA-Stränge zu

verhindern, erfolgte der nächste Schritt auf Eis. Pro Ansatz wurden 5 µl *low T-Mix*, 3 µl des gewünschten Cy-Farbstoffes (*CyDyeTM 3-dUTP* bzw. *CyDyeTM 5-dUTP*) und 1 µl Klenow-Fragment aus dem Kit hinzugefügt. Während der Inkubation im Thermocycler für 2 h bei 37°C lagerten sich die Farbstoff-markierten sowie die unmarkierten Desoxyribonukleosidtriphosphate an die DNA an. Der Grad der Markierung wurde anschließend mit einer speziellen Funktion des Spectrophotometers NanoDrop® gemessen.

Bei Cy3 handelt es sich um einen roten, bei Cy5 um einen blauen Fluoreszenzfarbstoff.

6.2.4.2 Markierung mit Biotin bzw. Digoxigenin (*Nick-Translation*)

Die Markierung von Sonden mit den Haptenen Biotin (Bio) oder Digoxigenin (Dig) erfolgte nach dem Prinzip der *Nick-Translation*. In Gegenwart von Mg²⁺-Ionen kann das Enzym DNase 1 die *Template*-DNA (Ausgangs-DNA für Versuche) nicht komplett denaturieren, sondern erzeugt nur Einzelstrangsnitte an ganz bestimmten Stellen, sogenannte „*nicks*“. Die Doppelstrangstruktur der DNA bleibt dadurch erhalten.

Im zweiten Schritt erkennt die DNA-Polymerase 1 die gesetzten Schnitte und verlängert die freien 3'-Enden fortlaufend mit den zugegebenen Nukleotiden. Thymidin wird dabei jedoch durch die speziellen Desoxyuridintriphosphate Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP ersetzt. Gleichzeitig baut die DNA-Polymerase 1 mit ihrer 5'→3'-Exonukleaseaktivität das 5'-Ende des Stranges in Syntheserichtung ab. Der alte Strang wird durch einen neuen mit Hapten-Markierung ersetzt.

6.2.5 Aufreinigung der DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

Mit diesem System können einzel- oder doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 10 kb von Verunreinigungen wie *Primern*, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen befreit werden.

Vor Verwendung in der *ArrayCGH* wurde die mit Cy-Farbstoffen markierte DNA (*Cy3-gelabelte* Normal-DNA bzw. *Cy5-gelabelte* Tumor-Zelllinien-DNA) mit dieser Methode aufgereinigt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei etwa 18 000 × g in einer konventionellen Tischzentrifuge.

Zur Aufreinigung wurde 1 Volumen (60 µl) PCR-Produkt mit 5 Volumina (300 µl) PB-Puffer gemischt. Um die DNA in der Reinigungssäule zu binden, ließ man das Gemisch durch die QIAquick-Säule (platziert auf einem 2 ml-Eppendorf-Gefäß) laufen und zentrifugierte für 1 min. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur Aufreinigung der DNA wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die DNA erneut für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein frisches

Reaktionsgefäß platziert und die DNA durch Zugabe von 50 µl auf 50°C erwärmten EB-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) eluiert. Die so gereinigte DNA wurde gelagert oder weiterverwendet.

6.3 DNA-Vervielfältigung durch *Whole Genome Amplification* (WGA)

Speziell zur Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen (z. B. aus getrocknetem Blut, neonatalen Blutproben oder Wangenschleimhautabstrichen etc.) wurde die *Whole Genome Amplification* (WGA) entwickelt (Schock G et al., 2005). Die ersten PCR (= Polymerase-Kettenreaktion) -basierten WGA-Methoden arbeiten mit hitzestabilen DNA-Polymerasen und haben „Nachteile in Ausbeute, Qualität und Fragmentlänge der amplifizierten DNA“ (Schock G et al., 2005). Die unterschiedliche Affinität der verwendeten DNA-Polymerase zu verschiedenen Sequenzen führt häufig zu Fehlamplifikationen: manche Abschnitte sind im Produkt unter-, andere dafür überrepräsentiert (Schock G et al., 2005).

Eine im Jahr 2007 neuere Entwicklung auf diesem Gebiet ist die *Multiple Displacement Amplification* (MDA), auch *rolling-circle*-Replikation genannt. Da sie auf einem isothermalen Reaktionsprinzip ohne zyklische Denaturierungsschritte beruht, kann man die nicht-thermostabile *Phi 29*-DNA-Polymerase (ϕ 29-DNA-Polymerase) einsetzen. Das hat zwei entscheidende Vorteile. Zum einen arbeitet die *Phi 29*-DNA-Polymerase um einiges effizienter als die *Taq*-Polymerase, zum anderen kann die Amplifikation über Nacht bei konstanter Temperatur in nur einem Reaktionsgefäß ablaufen (Schock G et al., 2005). Die 3'→5'-Exonuclease(korrektur)aktivität der *Phi 29*-Polymerase gewährleistet eine zuverlässige Replikation mit einer Fehlerrate von nur 3 Mutationen pro 1 Million Nukleotide (3×10^{-6} Mutationen/ Nukleotid) (Nelson J et al., 2002). Dadurch kann die amplifizierte DNA sogar für Sequenzierungen (Schock G et al., 2005) oder *SNP*- bzw. Punktmutationsanalysen (Hosono S et al., 2003) verwendet werden. Im Vergleich dazu arbeitet die *Taq*-Polymerase, trotz „*proof-reading*-Aktivität“, deutlich ungenauer. Sie erzeugt durchschnittlich 1×10^{-3} Mutationen/ Nukleotid, also 1 Mutation pro Tausend Nukleotide (Dunning A et al., 1988). Zudem ist die DNA-Ausbeute nach *MDA* relativ unabhängig von der eingesetzten DNA-Menge, die Reaktion scheint bei einer bestimmten Produktkonzentration selbstlimitierend zu sein (Dean F et al., 2002). Die amplifizierte hochmolekulare DNA erreicht Längen bis zu 100 kb, mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 10 kb (Schock G et al., 2005). Sowohl vor als auch nach der Amplifikation kann auf Reinigungsschritte verzichtet werden (Schock G et al., 2005; Hosono S et al., 2003). Die DNA steht direkt für weitere Anwendungen zur Verfügung. Das

spart Zeit und Kosten und reduziert die Gefahr von Kontamination oder Degeneration der Ausgangs-DNA (Hosono S et al., 2003).

Bei der *Multiple Displacement Amplification* oder *rolling-circle-Replikation* binden die Primer zufällig (Hosono S et al., 2003) an die alkalisch denaturierte *template*-DNA (Ausgangs-DNA-Strang, von dem abgelesen wird) und beginnen an mehreren Stellen gleichzeitig mit der Replikation. Erreicht eine DNA-Polymerase den gerade von einer anderen Polymerase replizierten komplementären Strang, kommt es zu einer kontinuierlichen Verdrängung dieses komplementären Stranges vom 3'-Ende her (*strand displacement*). Ohne Denaturierung der gesamten DNA entstehen so ständig „neue Einzelstrang-*template*-Bereiche, die als Ausgangspunkt neuer Replikationen dienen“ (siehe Abb. 3, Bild 3; Schock G et al., 2005).

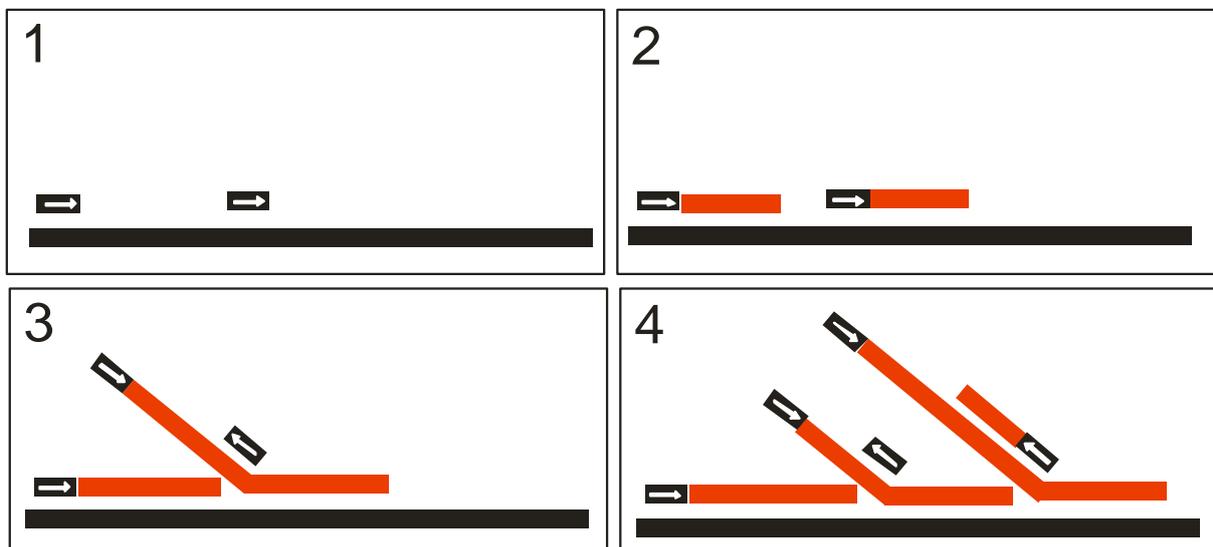


Abb. 3: Prinzip der *Multiple Displacement Amplification* (modifiziert nach Schock G et al., 2005)

Nach der Hybridisierung der Zufallsprimer (dargestellt mit weißem Pfeil für die Replikationsrichtung) bewegt sich die *Phi 29*-Polymerase entlang des DNA-*Templates* (schwarz) und verdrängt dabei den komplementären, von einer anderen DNA-Polymerase neu-synthetisierten Strang (rot). Daran binden wieder Primer als Ausgangspunkte für weitere Replikationen.

6.3.1 MDA mit dem REPLI-g Midi Kit (Qiagen)

Für die *ArrayCGH* wurde die verwendete DNA (normales Blut als Referenz und PCa-Zelllinien als untersuchte Probe) vor der Markierung mit Cy-Farbstoffen nach dem sehr fehlerarmen Prinzip der *rolling-circle*-Replikation amplifiziert. Alle Arbeitsschritte erfolgten gemäß den Herstelleranweisungen im *REPLI-g Midi Kit (Qiagen)*.

Die benötigten Lösungen (DLB-Puffer, Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer) wurden laut Anwenderprotokoll aus den mitgelieferten Ansätzen und nucleasefreiem Wasser (A. dest.) frisch angesetzt. Für die DNA-Denaturierung wurden je 2,5 µl *template*-DNA (Kon-

zentration 4 ng/ μ l, entspricht 10 ng DNA) mit der gleichen Menge (2,5 μ l) Denaturierungspuffer in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, gemischt und bei ca. 2500 \times g kurz anzenrifugiert. Nach Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur, wurden 5 μ l Neutralisierungspuffer zugefügt und durch Vortexen sowie kurze Zentrifugation (ca. 2500 \times g) vermischt. Die im Neutralisierungspuffer enthaltene Stopplösung beendet den alkalischen Denaturierungsprozess der DNA.

Die *REPLI-g* DNA-Polymerase wurde auf Eis aufgetaut, die anderen Komponenten für den Mastermix bei Raumtemperatur. Der Mastermix (40 μ l pro Reaktionsansatz) wurde auf Eis aus 10 μ l A. dest., 29 μ l *REPLI-g* Reaktionspuffer und 1 μ l DNA-Polymerase angesetzt.

Die vorbereitete denaturierte DNA (10 μ l) wurde anschließend mit 40 μ l Mastermix gemischt und zur Vervielfältigung nach dem beschriebenen Prinzip der *Multiple Displacement Amplification* für 16 Stunden bei 30°C inkubiert. Vor weiterer Verwendung der replizierten DNA wurde die *Phi 29*-DNA-Polymerase durch dreiminütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert.

Die neue Konzentration der DNA wurde wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben mit dem Spectrophotometer NanoDrop® gemessen. Die erreichten Konzentrationen der durch *rolling circle*-Replikation generierten DNA lagen zwischen 10 und 30 μ g/ μ l.

Mit der Intra-*ALU*-PCR (Beschreibung siehe Kapitel 6.4.1.2) wurde die nicht aufgereinigte *REPLI-g*-DNA einer zusätzlichen Qualitätskontrolle unterzogen.

6.4 DNA-Vervielfältigung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die erst in den Achtziger Jahren von Kary Mullis (Saiki R et al., 1985; Mullis K and Faloona F, 1987) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion stellt die wohl „bedeutendste Methode der Molekularbiologie“ dar (Mülhardt C, 2006). Theoretisch kann mit Hilfe der PCR aus einem einzigen DNA-Molekül eine beliebig große Anzahl identischer DNA-Stränge gewonnen werden. Die drei Schritte Denaturierung, *Annealing* und Elongation werden dabei viele Male in der gleichen Reihenfolge wiederholt.

Liefere diese Reaktion fehlerlos und ohne Störfaktoren ab, würde die Zahl der DNA-Moleküle in jedem Zyklus verdoppelt werden. Aus einem einzigen Ausgangsmolekül könnten nach 10 Zyklen mehr als 1000 Moleküle, nach 20 Zyklen schon weit mehr als 1 Million DNA-Moleküle entstehen.

Allerdings erreicht die *Taq*-Polymerase nie einen Multiplikationsfaktor von 2, sondern schafft pro Zyklus etwa eine Amplifikationsrate von 1,6 bis 1,8. Deswegen fällt die wirkliche Endmenge an DNA bedeutend geringer aus, als theoretisch zu errechnen wäre.

Als Ausgangsmaterial müssen wenigstens 10 000 DNA-Moleküle eingesetzt werden, um eine sichere Amplifikation zu erreichen (Mülhardt C, 2006). Ansonsten können die *Primer* die wenigen Einzelstränge vermutlich überhaupt nicht finden. Zu Beginn der PCR liegt die Vermehrungsrate wohl aus dem gleichen Grund noch einiges unter der erreichbaren Maximalrate. Mit Fortschreiten der Reaktion steigt die Wahrscheinlichkeit, dass *Template*, *Primer* und Polymerase aufeinandertreffen und so steigt auch die DNA-Vermehrungsrate pro Zyklus. Aus hauptsächlich zwei Gründen sinkt der Multiplikationsfaktor nach etwa 30 bis 40 Zyklen dann stark ab (auch wenn noch ausreichend *Primer* und Nukleotide im Reaktionsgefäß vorhanden sind). Einerseits kommt es im Reaktionsgefäß zu einer Endprodukthemmung, andererseits passiert es immer häufiger, dass zwei Amplifikationsprodukte untereinander anstatt mit neuen *Primern* hybridisieren.

6.4.1 ALU-PCR

6.4.1.1 ALU-Sequenzen

Im gesamten menschlichen Erbgut verteilt gibt es hochrepetitive Sequenzen außerhalb von Genen. Je nach ihrer Länge (100-400 bp bzw. 6-8 kb) spricht man von *short* bzw. *long interspersed nuclear elements* (*SINEs* und *LINEs*). *SINEs* liegen beim Menschen am häufigsten in Form sogenannter *ALU*-Wiederholungen vor. Hierbei handelt es sich um phylogenetisch hochkonservierte, etwa 300 bp lange, regelmäßig wiederkehrende DNA-Sequenzen von noch nicht vollständig erforschter Funktion. Sie weisen eine dimere Struktur auf und sind in *Clustern* angeordnet. *ALU*-Sequenzen haben einen Anteil von etwa 10% am menschlichen Genom und besitzen bestimmte Erkennungsstellen für die Restriktionsendonuclease *ALU I* (*The Genome Sequencing Consortium*, 2001). Laut Herr kommen sie vor allem in genreichen und rekombinationsaktiven Regionen des Humangenoms vor (Herr A, 2005).

6.4.1.2 Intra-ALU-PCR

In einer Intra-*ALU*-PCR werden mithilfe spezieller *Primer* selektiv nur die *ALU*-Sequenzen vervielfältigt. Dafür binden die *Primer* jeweils an das 5'-Ende der *ALU*-Sequenz und initiieren deren Amplifikation. Der Nachweis von *ALU*-Sequenzen in einem DNA-Gemisch kann als Beweis für das Vorliegen menschlicher DNA gewertet werden (siehe Abb. 4).

In der Qualitätskontrolle der *REPLI-g*-Amplifikation sollte in allen humanen Proben eine *ALU*-Sequenz nachweisbar sein, nicht jedoch in den Kontrollproben.

Zur Durchführung der Intra-*ALU*-PCR verwendeten wir folgende *Primer*:

Alu-forw: 5'-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3' und

Alu-rev: 5'-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3'.

Die *Multiple Displacement Amplification* wurde als erfolgreich gewertet, wenn der Anteil an menschlichen *ALU*-Sequenzen 10 bis 30% betrug und die vorrangige Fragmentgröße in der Gelelektrophorese zwischen 1 und 20 kb lag.

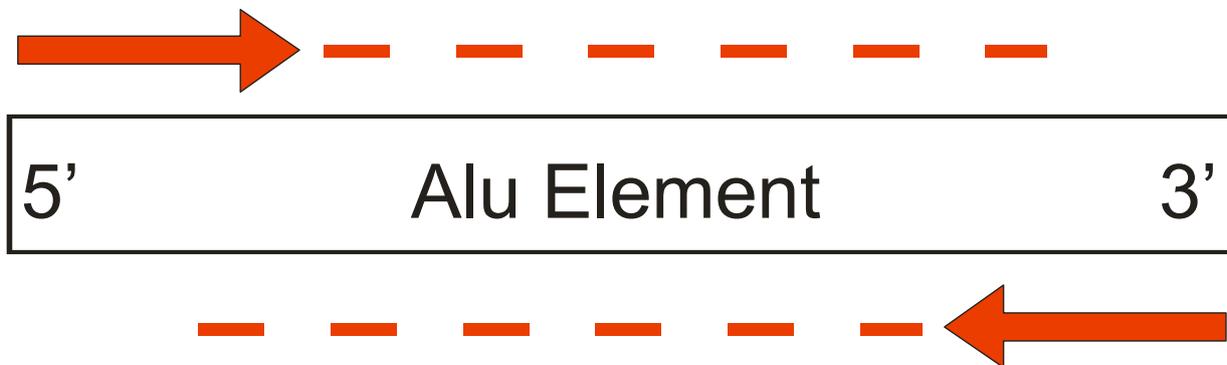


Abb. 4: Schema einer *Intra-ALU-PCR* (modifiziert nach Walker J et al., 2003)

Nachweis humaner DNA-Sequenzen und Quantifizierung der DNA z.B. nach *REPLI-g*-Amplifikation (*Primer* als rote Pfeile in Replikationsrichtung).

6.4.1.3 Inter-ALU-PCR

Um die in *ALU*-Segmente eingebettete menschliche Sequenz in einem *BAC*-Genom (siehe Kapitel 6.2.2) spezifisch zu amplifizieren, wird eine *Inter-ALU-PCR* eingesetzt. Dafür setzt man besondere *ALU-Primer* ein, die spezifisch an die Enden der *ALU*-Sequenzen binden:

AluBari-1: 5'-GGATTACAGGYRTGAGCCA-3' und

AluBari-2: 5'-RCCAYTGCACTCCAGCCTG-3'.

Sie bilden die Anfangspunkte für die Replikation der dazwischenliegenden Bereiche. Die *ALU*-Segmente dienen also nur zur Erkennung der menschlichen Sequenzen, werden jedoch selbst nicht vervielfältigt, wie folgendes Schema (Abb. 5) zeigt.

In der *Primersequenz* sind die meisten Stellen fest einer der vier DNA-Nukleobasen (A = Adenin, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin) zugeordnet. An manchen Stellen ist jedoch nur vorgegeben, ob eine der beiden Purinbasen (Adenin oder Guanin, Buchstabe R) oder eine der beiden Pyrimidinbasen (Cytosin oder Thymin, Buchstabe Y) in der Sequenz folgt.

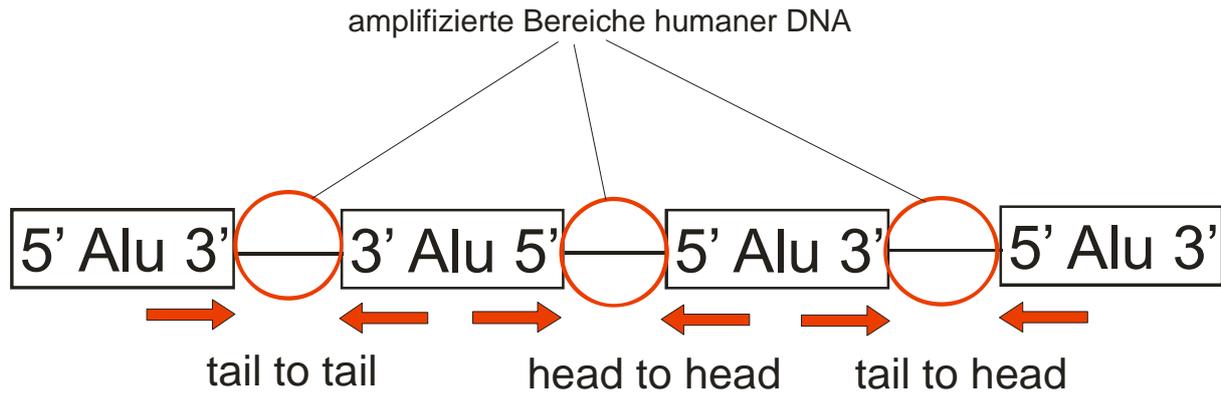


Abb. 5: Schema einer Inter-ALU-PCR (modifiziert nach Walker J et al., 2003)

Amplifizierung humaner DNA-Sequenzen zwischen benachbarten humanspezifischen *ALU*-Elementen in jeder denkbaren Richtung („tail to tail“, „head to head“ or „tail to head“, Primer als rote Pfeile in Replikationsrichtung), z.B. in einem *BAC*.

6.4.2 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Seit Entwicklung des PCR-Grundprinzips in den frühen Achtziger-Jahren gab es einige technische Verbesserungen und das Anwendungsspektrum wurde erweitert. Anfangs wurde die PCR rein qualitativ zur DNA-Vermehrung genutzt. Eine genaue Quantifizierung der DNA-Ausgangsmenge war unmöglich. Im Jahr 1992 wurde diese Limitation mit Entwicklung der Echtzeit- (*Real-Time*-) PCR durch Higuchi (Higuchi R et al., 1992; 1993) gelöst. Durch Einführung eines fluoreszierenden „*Reportermoleküls*“ ins Reaktionsmilieu und dessen fluorimetrische Bestimmung während Ablauf der Reaktion, konnte die Entwicklung der Produktmenge im Reaktionsgefäß in Echtzeit verfolgt werden (Tse C and Capeau J, 2003). Unter Einbeziehung der Zykluszahl erlaubte die quantitative *Real-Time*-PCR eine genaue Berechnung der eingesetzten DNA-Menge.

6.4.2.1 Detektion der Real-Time-PCR-Produkte

Der Nachweis der PCR-Endprodukte kann grundsätzlich unabhängig von der DNA-Sequenz oder an einer spezifischen Sequenz (sequenzabhängig) erfolgen.

Unabhängig der DNA-Sequenz kann der Nachweis mittels interkalierender Fluorochrome wie *SYBR Green 1* oder Ethidiumbromid geschehen. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green 1* bindet spezifisch an die kleine Furche der Doppelstrang-DNA und lagert sich zwischen benachbarte Basenpaare (Interkalation, Zipper H et al., 2004). Er wird bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und hat sein Emissionsmaximum bei 521 nm. Die Leuchtkraft von *SYBR Green 1* ist in gelöster Form sehr gering, in gebundener Form ist sie sehr viel höher. Die Fluoreszenzintensität einer Probe ist direkt proportional zur Menge des neu gebildeten PCR-Produktes.

Neuere Geräte nutzen ein sequenzabhängiges Verfahren mithilfe von Sonden.

Sonden sind etwa 20-30 bp lange Oligonukleotide, in deren Sequenz ein sogenannter *single nucleotide polymorphism (SNP)* liegt. Dabei handelt es sich um eine Variation eines einzelnen Basenpaares in einem DNA-Strang. Jeder *SNP* hat zwei Allele. Bis jetzt hat das internationale *SNP*-Konsortium etwa 1,8 Millionen *SNPs* in unserem Genom identifiziert (im Durchschnitt liegt alle 1 000 bis 5 000 Basen eine Punktmutation: Mülhardt C, 2006). Ca. 90% aller genetischen Varianten im Humangenom werden durch *SNPs* repräsentiert.

Dieser Nachweismethode liegt das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) nach Förster zugrunde (Förster V, 1948; Cardullo R et al., 1988). Ein Fluorochrom 1 (F1, Donor) mit spezifischem Anregungsspektrum A1 wird durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Emissionsenergie E1 an ein zweites eng benachbartes Fluorochrom (F2, Akzeptor) weiter (siehe Abb. 6, Mülhardt C, Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics, S. 106). Dessen Anregungsspektrum A2 entspricht dem Emissionsspektrum E1 des ersten Fluorochroms ($E1 = A2$). Solange die beiden Fluorochrome in räumlicher Beziehung zueinander stehen, erfolgt ein Fluoreszenz-Energietransfer von F1 auf F2. Nach Anregung im Spektrum A1 wird Licht der Wellenlänge E2 emittiert. Vergrößert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, so nimmt der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ab. Das Fluoreszenzsignal des Akzeptors (E2) wird geringer, während das des Donors (E1) zunimmt.

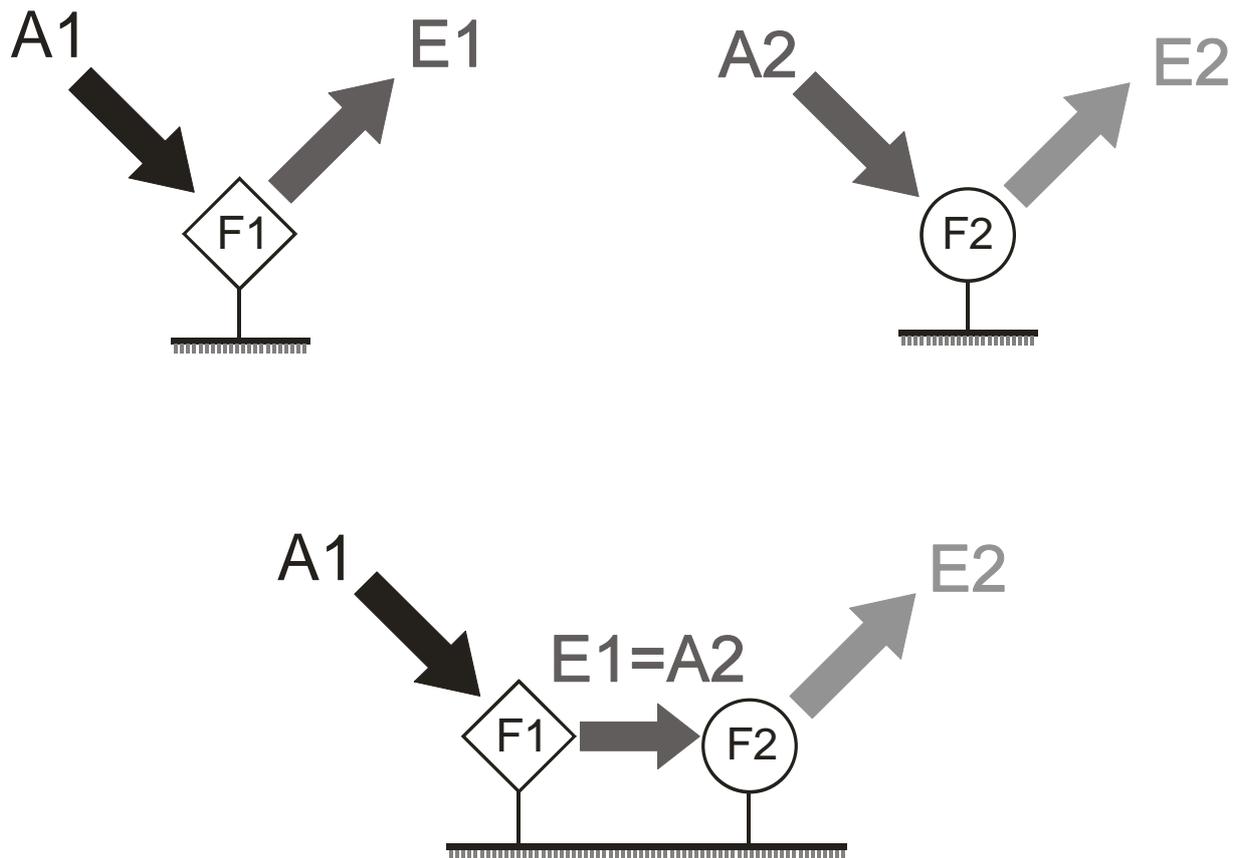


Abb. 6: Prinzip des fluorescence resonance energy transfer (FRET) nach Förster

(modifiziert nach Mülhardt C, *Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics*, S. 106)

Fluorochrom 1 (F1) besitzt ebenso wie Fluorochrom 2 (F2) ein charakteristisches Anregungs- und ein typisches Emissionsspektrum (A1 und E1 bzw. A2 und E2). Sind die beiden Fluorochrome nahe beieinander lokalisiert und entspricht das Emissionsspektrum E1 dem Anregungsspektrum A2, so kann das von F1 emittierte Licht das zweite Fluorochrom anregen und es entsteht Licht der Wellenlänge E2. Regt man folglich mit einem Licht A1 an, kann durch Messung von E1 bzw. E2 erkannt werden, ob die beiden Fluorochrome getrennt oder benachbart sind.

Das von uns verwendete *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (7900HT SDS*, Firma Applied Biosystems, California/ USA) arbeitet mit sogenannten Hydrolysesonden (*TaqMan*[®]-Prinzip: *Reporter und Quencher*).

Die *TaqMan*[®] PCR-Sonden sind spezielle fluorogene Sonden (1993 entwickelt von Lee L et al., für Applied Biosystems). Sie bestehen „aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten *Reporter*-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen sogenannten *Quencher*-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt“ (Schild T, Einführung in die *Real-Time TaqMan*[®] PCR-Technologie, Seite 6). Zudem wird das 3'-Ende mit einem Phosphatrest blockiert, um dessen Extension während der PCR zu verhindern.

Wir verwendeten kommerziell erworbene, bereits validierte *SNP*-Sonden (Applied Biosystems, CA, USA). Für die beiden Allele des *SNP* wurden die zwei verschiedenen *Reporter*-Farbstoffe FAM und VIC gewählt (jeweils ans 5'-Ende der Sonde gekoppelt). Bei beiden Sondentypen stand gegenüber am 3'-Ende der *Quencher*-Farbstoff TAMRA. TAMRA wird über ein *Linker Arm Nucleotide (LAN)* gebunden (Schild T, Einführung in die *Real-Time TaqMan*[®] PCR-Technologie, Seite 8).

Während der *Annealing*-Phase der PCR binden sowohl die *Primer* als auch die Sonden mit den beiden Farbstoffen (*Reporter* und *Quencher*) an den Matrizenstrang. Der *Reporter*-Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argonlaser zur Fluoreszenz angeregt. Solange die Oligonukleotid-Sonde intakt ist, wird die Fluoreszenz des *Reporters* wegen der räumlichen Nähe zum *Quencher* durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ausgelöscht. Das Emissionsspektrum des *Reporters* entspricht dem Absorptionsspektrum des *Quenchers*.

Während der Elongationsphase der PCR erreicht die *Taq*-Polymerase beim Anhängen der Einzelnukeotide auch die „Sonde und beginnt sie zu verdrängen“. Dabei „entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur“, welche „die 5' → 3'-Exonucleaseaktivität der *Taq*-Polymerase aktiviert“ (Schild T, Seite 6). Beim Fortschreiten der *Taq*-Polymerase kommt es zu einer Hydrolysierung der Sonde. „Die räumliche Nähe zwischen *Reporter* und *Quencher* und damit auch der FRET“ (Schild T, Seite 7) werden aufgehoben. In dem Maß, wie die *Reporter*moleküle mit Zunahme des PCR-Produktes freigesetzt werden (siehe Abb. 7), wird deren Fluoreszenz messbar. Das dabei gebildete Signal ist streng sequenzspezifisch, da Sondenmoleküle, die nicht absolut korrekt binden, durch die *Taq*-Polymerase verdrängt, aber nicht hydrolysiert werden. Auch freie, nicht-hybridisierte Sondenmoleküle werden von der *Taq*-Polymerase nicht hydrolysiert (Schild T, Seite 7).

Die Veränderungen der Fluoreszenz der beiden *Reporter*-Farbstoffe werden mit Hilfe des *ABI Prism 7900HT Sequence Detector* im geschlossenen Reaktionsgefäß in jedem Zyklus erfasst. Die Fluoreszenz hat eine Wellenlänge zwischen 500 und 660 nm und wird mittels CCD-Kamera in digitale Daten umgewandelt.

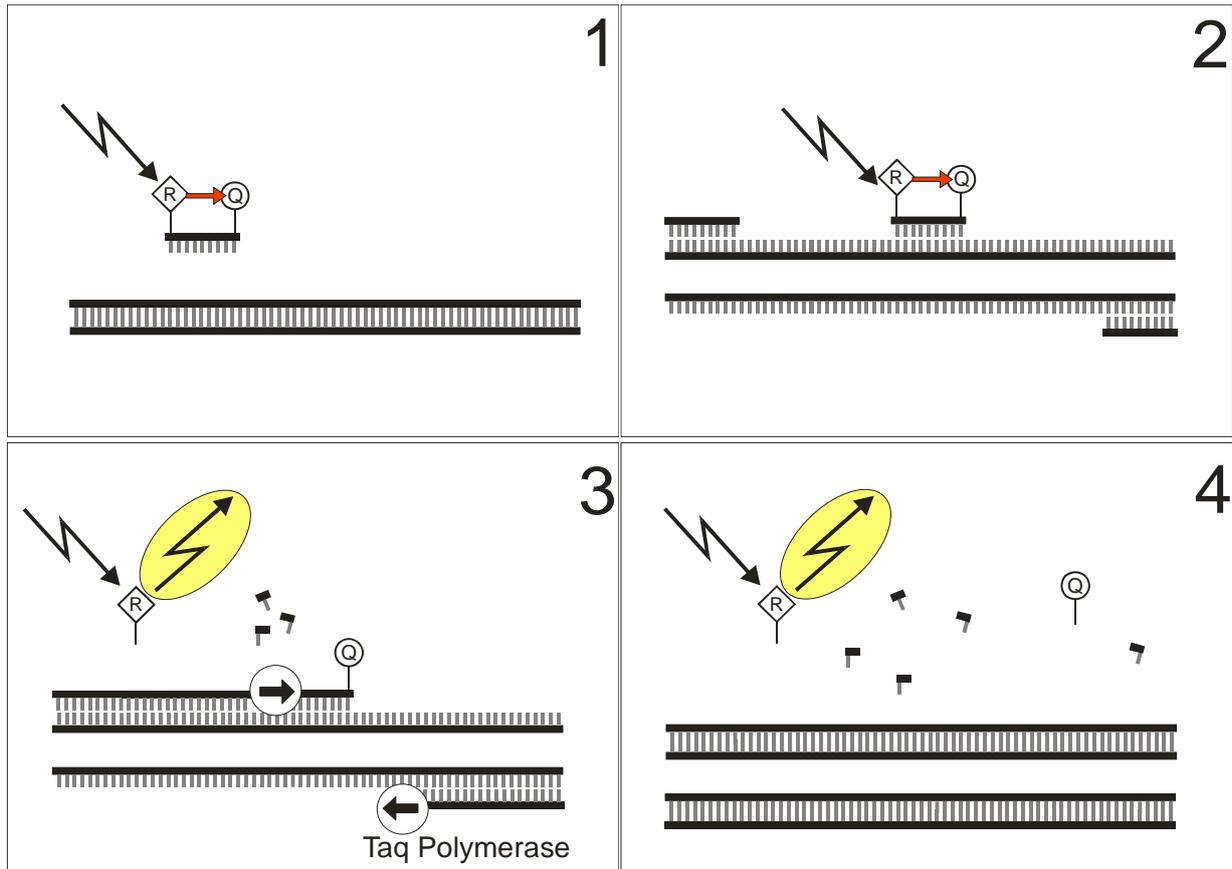


Abb. 7: TaqMan®-Nachweismethode
(modifiziert nach Mülhardt C, *Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics*, S. 107)

TaqMan®-Sonden fluoreszieren, wenn das Oligonukleotid von der Polymerase abgebaut und der *Reporter* dadurch freigesetzt wurde. Dessen Lichtemission E1 steigt proportional mit der zunehmenden Sonden-Hydrolyse an (messbare Fluoreszenz gelb unterlegt).

Die Hybridisierungssonden des *LightCycler*® (Firma Roche Diagnostics, Mannheim) bestehen aus zwei kurzen Oligonukleotiden, von denen das eine am 3'-Ende mit einem Fluorochrom 1 (Donor) und das andere am 5'-Ende mit einem Fluorochrom 2 (Akzeptor) versehen ist. Beide Fluorochrome besitzen charakteristische Anregungs- (A1, A2) und Emissionsspektren (E1, E2), wobei das Emissionsspektrum E1 dem Anregungsspektrum A2 entspricht. Die Oligonukleotide sind so gewählt, dass sie beide an ausgesuchten Sequenzen des gleichen DNA-Stranges mit einem Abstand von nur 1 bis 5 Nucleotiden binden.

Sind beide Oligonukleotide an die DNA gebunden, findet ein Energietransfer statt. Regt man den Donor mit der Wellenlänge A1 an, gibt er seine Emissionsenergie direkt an das Fluorochrom 2 (Akzeptor) weiter ($E1 = A2$) und der Akzeptor emittiert Licht der Wellenlänge E2. Wird der komplementäre DNA-Strang während der fortschreitenden PCR-Reaktion verlängert, werden die Oligonukleotid-Sonden vom DNA-Strang verdrängt und voneinander getrennt. Der FRET kann nicht stattfinden und die Fluoreszenz im Spektrum E2 lässt sich nicht

mehr messen. Stattdessen wird die Emission E1 des ersten Fluorochroms messbar, da das zweite Fluorochroms nicht mehr angeregt wird.

Durch Messung der zwei möglichen Emissionsspektren E1 und E2 kann eine Aussage über die Menge des PCR-Endproduktes getroffen werden.

6.4.2.2 Primer

Die von uns verwendeten *Primer* waren von der Firma Applied Biosystems käuflich erworben. In dem zwanzigfach konzentrierten *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assay Mix* befand sich zum einen jeweils einer der vier *Primer*, spezifisch für die Gene *IL11RA*, *DCTN3*, *TOP2B* und *ALDH1* (in komplementärer Ausführung für beide Stränge der DNA). Zum anderen beinhaltete diese Mischung die beiden mit den *Reporterfarbstoffen* FAM und VIC (für die beiden Allele der *SNP*-Region) unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sonden.

Die beiden Zielgene der Versuchsreihe *IL11RA* (AssayID: C__11340987_10, Länge 9702 kb, Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology) und *DCTN3* (AssayID: C__25472566_10, Länge 6949 kb) befinden sich auf Chromosom 9 benachbart in der Region 9p13.3. *IL11RA* kodiert für die α -Untereinheit des Interleukin 11-Rezeptors, *DCTN3* für die Untereinheit 3 von Dynactin. Das Gen für das Enzym Topoisomerase 2 β (*TOP2B*, AssayID: C__8063527_10) liegt auf Chromosom 3 (Region 3p24.2). *ALDH1B1* (AssayID: C__8777946_1_) kodiert für die Aldehyddehydrogenase 1 und liegt im Bereich 9p11.1 (Funktionsbeschreibung der Genprodukte im Kapitel 8 Diskussion).

6.4.2.3 Bestimmung der Toleranzintervalle (CUTOFF)

Um Veränderungen der Genkopienzahlen in malignen Zellen (PCa-Zelllinien und native Prostatakarzinome) nachweisen zu können, muss zuerst bestimmt werden, in welchem Toleranzbereich die normale Kopienzahl eines bestimmten Gens in einem Normalgewebe liegt.

In DNA-Proben aus Leukozyten von 11 männlichen gesunden Spendern wurden die Kopienzahlen der betreffenden Zielgene untersucht (jeweils normiert auf das Referenzgen). Aus den erhaltenen Werten wurden jeweils der Mittelwert und die zweifache Standardabweichung *SD* (*standard deviation*) berechnet. Der Mittelwert der normalen Kopienzahl eines Gens +/- zweifache Standardabweichung wurde als Toleranzintervall *T* definiert.

Das **Toleranzintervall T** wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T = \frac{\sum CN}{n} \pm 2 \times SD$$

CN Kopienzahl, n Anzahl der Replikate, SD Standardabweichung

Für das Zielgen *DCTN3* ergab sich ein Toleranzintervall von **1,62 bis 3,17**, für das zweite Zielgen *IL1RA* lagen die Normalwerte im Intervall von **1,77 bis 2,94**.

Ein Wert innerhalb des zuvor ermittelten Toleranzintervalls wird definitionsgemäß als „normal“ bezeichnet. Es liegen also zwei Kopien des entsprechenden Gens vor.

Liegt die Kopienzahl des Gens außerhalb des Intervalls, liegt die entsprechende Genregion entweder vermindert (Deletion) oder vermehrt (Duplikation, höhere Amplifikation) im Genom des untersuchten Gewebes vor.

6.4.2.4 C_T -Wert

Der C_T -Wert (*cycle threshold* = Schwellenwert-Zyklus) entspricht der PCR-Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal der Probe gerade deutlich vom Hintergrund (*background*) abhebt. Ab diesem Zyklus geht die DNA-Vermehrung in die exponentielle Phase über. Am C_T -Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Unter Berücksichtigung der *Primer*-Effizienz kann auf die DNA-Ausgangsmenge in jedem Reaktionsgefäß zurückgerechnet werden.

6.4.2.5 Relative Quantifizierung der Genkopienzahl mit einer Modifizierung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode

Die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode wurde im Jahr 2001 beschrieben, um die Expression eines Gens relativ zu bestimmen (Livak K and Schmittgen T, 2001).

Im Jahr 2005 entwickelte unsere Arbeitsgruppe eine Modifikation dieser $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, um damit auch die in einer quantitativen *Real-Time*-PCR ermittelten Genkopienzahlen relativ, also in Beziehung zueinander, quantifizieren zu können (Kindich et al., 2005).

Bei der relativen Quantifizierung wird die Veränderung der Kopienzahl eines Zielgens in Relation zur Kopienzahl eines Referenzgens beschrieben (Kindich et al., 2005).

Als Referenzgen eignet sich prinzipiell jedes Gen, welches in der untersuchten Situation (hier: maligne Transformation von Prostatazellen) keine numerischen Veränderungen erfährt. Zudem sollte es auf einem anderen Chromosom gelegen sein als das Zielgen. Würden Ziel- und Referenzgen auf dem gleichen Chromosom oder sogar auf dem gleichen Chromosomenarm liegen, könnten Vorgänge wie die Duplizierung dieses Chromosoms oder Chromosomenarms leicht übersehen werden, da beide Gene in gleichem Maße vervielfältigt werden.

Setzt man ein Zielgen in Relation zu einem Referenzgen, nennt man das „Normierung der Ergebnisse“. Die Vorteile dieser Normierung liegen in der reduzierten Varianz, da z.B. Gewebefeffekte oder Fehler in der DNA-Replikation gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen (Pfaffl M, 2004).

Die relative Kopienzahl jedes der in den Proben untersuchten Gene wird jeweils auf ein gesundes oder unbehandeltes Kontrollprobenmaterial, in unserem Falle Blut eines gesunden männlichen Probanden, bezogen.

Zur Berechnung der relativen Genkopienzahl verwendeten wir eine Abwandlung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Die Herleitung der Formel

$$\text{relative Menge der Zielsubstanz} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

C_T cycle threshold = Schwellenwert-Zyklus

kann man zahlreichen Publikationen entnehmen (Livak K and Schmittgen T, 2001; User bulletin #2, Applied Biosystems).

Dabei ist die Menge der Zielsubstanz (meist die Expression eines Gens, bei uns jedoch die Kopienzahl) normiert auf ein Referenzgen und in Relation zu einem Kalibrator bzw. Kontrollmaterial angegeben (Livak K and Schmittgen T, 2001; Kindich et al., 2005).

Zur Anwendung dieser Methode müssen die *Primer* von Ziel- und Referenzgen annähernd gleiche Effizienzen haben. Gut designte und industriell optimierte *Primer* erreichen fast eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus. Je nach Literatur wird diese *Primer*-effizienz mit 2 (Verdopplung je Zyklus) oder häufiger mit 1 (entsprechend 100%) angegeben. Die von Applied Biosystems erworbenen *Primer* sind gut validiert und erreichen Effizienzen von annähernd 2. Auch in unseren Effizienzberechnungen haben wir Ergebnisse nahe am Optimalwert von 2 erhalten (siehe Kapitel 7.3.1).

Zur Berechnung des $\Delta\Delta C_T$ wird zuerst für jede untersuchte Tumorprobe der C_T -Wert des Referenzgens vom C_T -Wert des Zielgens subtrahiert. Dies ist die bereits beschriebene Normierung der Ergebnisse ($\Delta C_{T, \text{Tumor}}$).

Dabei ist zu beachten, ob ein Gen in einer Probe beide *SNP*-Allele besitzt (in unserer Untersuchung durch die *Reporter*farbstoffe FAM und VIC markiert) oder nur eines von beiden. Liegen beide Allele vor, existiert nur die halbe DNA-Ausgangsmenge im Vergleich mit einem Allel. Der erste PCR-Zyklus stellt in diesem Fall also nur die gleiche DNA-Ausgangsmenge her (Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus). Vom betreffenden C_T -

Wert muss 1 subtrahiert werden. Mit den Ergebnissen im Kontrollmaterial, d.h. im Normalgewebe, wird ebenso verfahren ($\Delta C_{T, Normalgewebe}$).

Der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ergibt sich durch Subtraktion des $\Delta C_{T, Normalgewebe}$ vom $\Delta C_{T, Tumor}$.

$$\Delta C_{T, Tumor} = C_{T, Tumor} \text{ Zielgen} - C_{T, Tumor} \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta C_{T, Normalgewebe} = C_{T, Normalgewebe} \text{ Zielgen} - C_{T, Normalgewebe} \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen})_{Tumor} - (C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen})_{Normalgewebe}$$

In der Herleitung der Formel (Livak K and Schmittgen T, 2001) wird deutlich, dass es sich bei dem Wert von $2^{-\Delta\Delta C_T}$ um ein Verhältnis handelt, denn die Werte der Tumorproben werden durch die Werte der Normalproben dividiert. Das Ergebnis von $2^{-\Delta\Delta C_T}$ beschreibt den relativen Unterschied zwischen den Kopienzahlen der beiden Gewebe (jeweils normiert auf ein Referenzgen ohne numerische Veränderung in malignen Prostatazellen).

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{relative Menge der Zielsubstanz} = \text{Relation zw. Tumor und Normalgewebe}$$

Unter der Voraussetzung, dass Normalgewebe einen diploiden Chromosomensatz aufweisen und somit jeweils 2 Kopien eines Gens enthalten, wird das Ergebnis von $2^{-\Delta\Delta C_T}$ zur Berechnung der Absolutzahl der Genkopien mit 2 multipliziert.

$$\text{Genkopienzahl} = 2 \times 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Ein Wert für $2^{-\Delta\Delta C_T}$ von beispielsweise 2,5 bedeutet, dass das Zielgen in der Tumorprobe zweieinhalb mal häufiger vorkommt als im Normalgewebe. Ein Verhältnis von 0,5 besagt, dass das Zielgen im Tumor nur halb so viele Kopien hat wie im Normalgewebe. Geht man von 2 Genkopien im Normalgewebe aus, erwartet man im ersten Fall 5 Genkopien, im zweiten Beispiel jedoch nur eine einzige Kopie des Zielgens im Tumorgewebe.

6.4.2.6 PCR-Bedingungen und Versuchsaufbau

Für den standardisierten Ablauf der PCR wurden 96-well-Mikrotiterplatten verwendet. Das Reaktionsvolumen je Einzelgefäß betrug 25 µl, bestehend aus 23 µl PCR-Mastermix (12,5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix, 1,25 µl 20-fach TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix und 9,25 µl steriles Wasser) und 2 µl genomischer DNA (Konzentration 10 ng/µl, entspricht 20 ng DNA). In jedem PCR-Lauf wurden die vier Genloci (2 Zielgene *IL1IRA* und *DCTN3*, Referenzgen *TOP2B*, 2. Referenzgen *ALDH1B1*) nebeneinander untersucht, um möglichst gleichwertige Ausgangsbedingungen zu schaffen und die Daten vergleichsfähig zu halten. Jede Probe wurde mindestens in Duplikaten untersucht.

Als Positivkontrolle und zur Kalibrierung wurde bei jedem *Primer* normales Blut (Blut A) eines gesunden Spenders mit drei technischen Replikaten mitgeführt. Als Negativkontrolle (*no-template*-Kontrolle) wurde ein Reaktionsgefäß in jedem Lauf mit sterilem Wasser befüllt.

Die *Real-Time*-PCR mit dem *TaqMan*®-Gerät lief nach folgenden Standardbedingungen ab:

Initiale Denaturierung	95°C	10 Minuten
PCR: Denaturierung	92°C	15 Sekunden
PCR: Annealing und Elongation	60°C	1 Minute

Bei jedem Versuch wurden 40 Zyklen durchlaufen.

6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit einer Agarose-Gelelektrophorese kann man rein qualitativ den Erfolg einer DNA-Vervielfältigung zu messen.

Die Netzstruktur eines Gels wird beim Anlegen eines Stroms von kleinen Molekülen schneller durchwandert als von großen Molekülen. So wird die DNA der Größe ihrer Fragmente nach in Banden aufgetrennt, da kurze Fragmente mit kleinerem Molekulargewicht schneller und somit eine weitere Strecke wandern, als große, schwerere DNA-Stücke. Die relative Fragmentgröße bestimmt man durch Anlegen eines Größenstandards mit DNA-Fragmenten bekannter Größen, einer sogenannten DNA-Leiter.

Vor der *ArrayCGH* prüften wir in einer Gelelektrophorese die Länge der durch *REPLI-g*-DNA-Amplifikation entstandenen DNA-Fragmente. Wir verwendeten den 50 bp-Marker als Größenstandard.

6.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Mit der Methode der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ist es möglich, in einem Genom gezielt nach chromosomalen Ungleichgewichten und genetischen Veränderungen wie Amplifikationen und Deletionen zu suchen. Dabei können nur wenige veränderte Stellen gleichzeitig untersucht werden.

Aus den zu untersuchenden Blut- oder Tumorzellen werden die Metaphasechromosomen als Hybridisierungsuntergrund extrahiert. Beim Auftropfen der Zellen auf einen Objektträger zerplatzen sie und verteilen die einzelnen Chromosomen auf dem Objektträger. Vor der Hybridisierung werden die Chromosomen auf dem Objektträger fixiert. Anschließend werden zwei verschiedene, unterschiedlich markierte Sonden (z. B. mit Digoxigenin und Biotin) auf den Objektträger hybridisiert. Die erste Sonde ist lokusspezifisch für den speziellen Chromosomenbereich, der auf Deletion, Amplifikation oder Translokation untersucht werden soll. Als

zweite wird eine für das Zentromer des gleichen Chromosoms spezifische Sonde gewählt, um dieses Chromosom später in der Auswertung sicher lokalisieren zu können.

Nach der Hybridisierung bindet man Fluorochrom-gekoppelte Antikörper an die nach einer Waschung verbliebenen (also gebundenen) Sonden. Der Versuch wird unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Um die Qualität der Sonden zu beurteilen, werden sie zur Kontrolle zusätzlich auf normale Metaphasechromosomen eines gesunden Spenders hybridisiert. Dabei erwartet man in der Auswertung für jede Sonde zwei Signale pro Interphasekern.

6.6.1 BAC-FISH

Bei dieser FISH verwendet man als Sonde eine in ein *BAC* einklonierte genomische Sequenz, die daraus zuerst isoliert und vervielfältigt werden muss.

Der *BAC* RP11-165H19 (9p13.3, *GenBank accession number* AQ382511, käuflich erworben von BACPAC Resource Center Children's Hospital, Oakland Research Institute in Oakland, California, USA) wurde mithilfe des *Maxi-Plasmid-Isolierungs-Kit* von Qiagen aus dem Bakterium isoliert (siehe Kapitel 6.2.2). Danach wurde wie in Kapitel 6.4.1.3 beschrieben eine *Inter-ALU-PCR* zur Amplifikation humaner Sequenzen im Bakteriengenom durchgeführt.

Hier wurde die Sonde für das Zentromer von Chromosom 9 mit dem Hapten Digoxigenin, das verwendete *BAC* mit Biotin markiert (zur Markierung siehe Kapitel 6.2.4.2).

Wir untersuchten die Tumorzelllinien *CWR22* und *CWR22-RV1* (Metaphasechromosomen), sowie Blutlymphozyten eines gesunden männlichen Spenders als Kontrollmaterial.

6.6.2 Experimenteller Aufbau einer FISH

Zuerst wurde der Objektträger mit den aufgeblotteten Metaphasechromosomen aus Blut- oder Tumorzellen für die spätere Hybridisierung vorbereitet, indem er in speziellen Waschlösungen gewaschen und von Verunreinigungen befreit wurde.

Die Metaphasechromosomen auf dem Objektträger wurden mit Denaturierungsmix (70% Formamid/ 2x SSC) denaturiert und dieser Vorgang anschließend durch Dehydratation in einer eiskalten aufsteigenden Ethanolreihe gestoppt.

Die beiden Sonden wurden für den Versuch mit *Cot-I*-DNA in einem bestimmten Verhältnis zusammengemischt: 2 µl digoxigenierte Chromosom 9-Zentromersonde, 9 µl Biotinmarkierte *BAC* H19-Sonde und 12 µl *Cot-I*-DNA. Dazu kam noch 1/10 dieses Volumens (2,3 µl) 3 M Natriumacetat (pH 5,5).

Cot-I-DNA sind etwa 50 bis 300 bp lange DNA-Stränge aus der menschlichen Plazenta, die viele repetitive DNA-Sequenzen wie zum Beispiel *ALU*- oder *Kpn*-Elemente enthalten. In

MicroArray-Untersuchungen wird sie üblicherweise verwendet, um nichtspezifische Hybridisierungen zu verhindern. In der FISH-Analyse besetzt die *Cot-1*-DNA während der *Preannealing*-Phase z.B. die Zentromerregionen und andere hochrepetitive Bereiche der Sonden-DNA. Diese Blockung verhindert während der Hybridisierung auf die Proben-DNA eine überproportionale Bindung der hochrepetitiven Sonden-Regionen und vermeidet falsch positive Signale bei der späteren Auswertung (Produktbeschreibung *Human Cot-1 DNA*[®] von Invitrogen[™], www.lifetechnologies.com).

Nach Fällern, Pelletieren, Waschen und Trocknen der DNA wurde sie in 4x SSC/ 20% Dextransulfat wieder gelöst und anschließend in einem Thermomixer inkubiert.

Die Sonden-DNA wurde anschließend im Wasserbad erst denaturiert und danach während eines sogenannten *Preannealings* wieder rehybridisiert. In dieser *Preannealing*-Phase lagerte sich die *Cot-1*-DNA (repetitive Sequenzen) zum Blocken der hochrepetitiven Bereiche als Erstes an die Einzelstränge der Sonden-DNA an. Erst anschließend fügten sich die komplementären DNA-Stränge der Sonden aneinander.

Zur Hybridisierung wurde die *preannealte* Sonde auf die Objektträger mit der Probe aufgebracht und nach der Trocknung für 3 Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer gehalten.

Nach den Stringenzwaschungen in 50% Formamid/ 2x SSC sowie 0,1x SSC wurden unspezifische Bindungsstellen und Proteine auf dem Objektträger durch BSA (bovines Serumalbumin = *Blocking*-Reagenz) besetzt und für die Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen geblockt. Dadurch wurde das Risiko für falsche Fluoreszenzsignale minimiert.

Der Nachweis beider Sonden durch Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte parallel. Wir verwendeten den grünen Farbstoff *FITC* zum Nachweis der Biotin-markierten *BAC*-Sonde, den roten Farbstoff *Cy 3* zur Detektion der Digoxigenin-gelabelten Chromosom 9-Zentromersonde.

Nach Kopplung der Fluorochrom-bindenden Antikörper an die Sonden, wurden die Chromosomen durch Überschichten des Objektträgers mit 25 µl *DAPI-Antifade* (4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) gegengefärbt.

DAPI ist ein blauer chromatinfärbender Fluoreszenzfarbstoff. *Antifade* ist eine Lösung, die die Lichtbrechung beim späteren Mikroskopieren optimiert.

Die Auswertung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung erfolgte unter Verwendung eines Olympus BX 50-Auflichtfluoreszenzmikroskops. Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat eigene charakteristische Anregungs- und Emissionsspektren. Für jedes Spektrum wurden spezifische Filter verwendet (siehe Kapitel 5.1: Geräte).

Jeder Fluoreszenzfarbstoff wurde mithilfe des speziellen Einzelfarbfilters alleine mit einer CCD-Kamera schwarz-weiß fotografiert. Am Computer wurden dann die entsprechenden Falschfarben (grün für *FITC*, rot für *Cy 3*, blau für *DAPI*) für jede Aufnahme definiert, die Einzelbilder übereinandergelegt und das Gesamtbild konstruiert.

6.7 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

6.7.1 Chromosomale vergleichende genomische Hybridisierung (cCGH)

Die klassische Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung wurde 1992 von A. Kallioniemi et al. (Kallioniemi A et al., 1992) entwickelt, um Gewinne und Verluste von genetischem Material auf den Chromosomen zu lokalisieren.

Dabei wird verschieden fluoreszenzmarkierte Tumor- und Normal-DNA im Verhältnis 1:1 zusammen mit einem Überschuss an humaner *Cot-1*-DNA mit einer FISH-Technik auf Metaphasechromosomen aus Blutlymphozyten eines gesunden Spenders hybridisiert (Arbeitsprotokoll: Lensch R et al., 2002; Kamradt J, 2011). Die *Cot-1*-DNA dient zur Vermeidung unerwünschter Fluoreszenzsignale an hochrepetitiven Sequenzen im Bereich der Chromosomenzentromere. Die bekannte DNA der Metaphasechromosomen bezeichnet man als Sonde, die unbekannt, zu untersuchenden DNA-Moleküle werden Proben genannt (siehe Abb. 8).

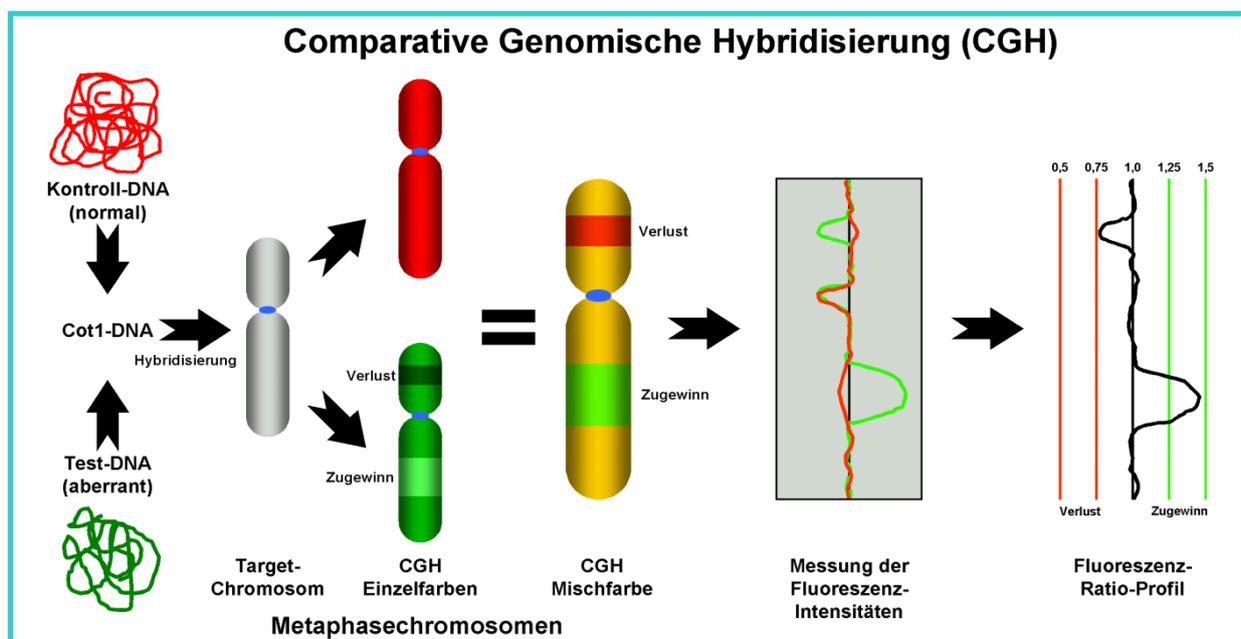


Abb. 8: Prinzip der konventionellen vergleichenden genomischen Hybridisierung (modifiziert nach Kleine A, S. 36)

Kontroll-DNA entspricht der meist rot-markierten Normal-DNA, Test-DNA bezeichnet die aus einem Tumor oder einer Tumorzelllinie stammende grün markierte DNA.

Die Proben-DNA bindet kompetitiv an die homologen Sequenzen der Sonden-DNA. Bei Verlust einer Gensequenz im Tumor wird in diesem Bereich die Normal-DNA häufiger auf die Sonde hybridisieren und später deren Fluoreszenzsignal überwiegen. Umgekehrt bindet im Fall einer Amplifikation einer Tumorsequenz entsprechend mehr Tumor-DNA an die betreffende Chromosomenregion und die Fluoreszenz des Tumorgenoms übertrifft die der Normal-Probe. Nach Auswertung mit einem digitalen Bildauswertungssystem (MetaSystems, Altlußheim) auf Basis eines Olympus-Auflichtfluoreszenzmikroskops erhielt man mit der MetaSystems ISIS 3 Software (MetaSystems, Altlußheim) die Dreifarbenbilder aus Rot, Grün und Blau aus jeweils 15 bis 20 Metaphasen. Für jedes Chromosom wurden für die endgültigen Werte die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert und die Fluoreszenz-Ratio-Profile entlang der Chromosomen generiert (siehe Abb. 8). Die Ergebnisse wurden wie in bereits veröffentlichten Protokollen interpretiert (vgl. Sattler H et al., 1999).

6.7.2 ArrayCGH (aCGH)

Eine Weiterentwicklung der klassischen CGH-Methode war die Kombination dieses Prinzips mit der Technologie der Expressionsanalyse auf *MicroArrays* zur *ArrayCGH* (siehe Abb. 9). *MicroArrays* sind definiert als eine Anordnung von miniaturisierten Reaktionsbereichen auf einer Oberfläche (z.B. Membran oder Objektträger) in einer geordneten Reihenfolge, welche die gleichzeitige Analyse von mehreren Hundert bis Tausend Reaktionen erlaubt (Kamradt J, 2011). Der Begriff *MicroArray* wurde 1995 erstmals von Schena zur Beschreibung einer Genexpressionsanalyse von 48 auf einen Objektträger gedruckten Pflanzen-cDNAs eingeführt (Schena M et al., 1995).

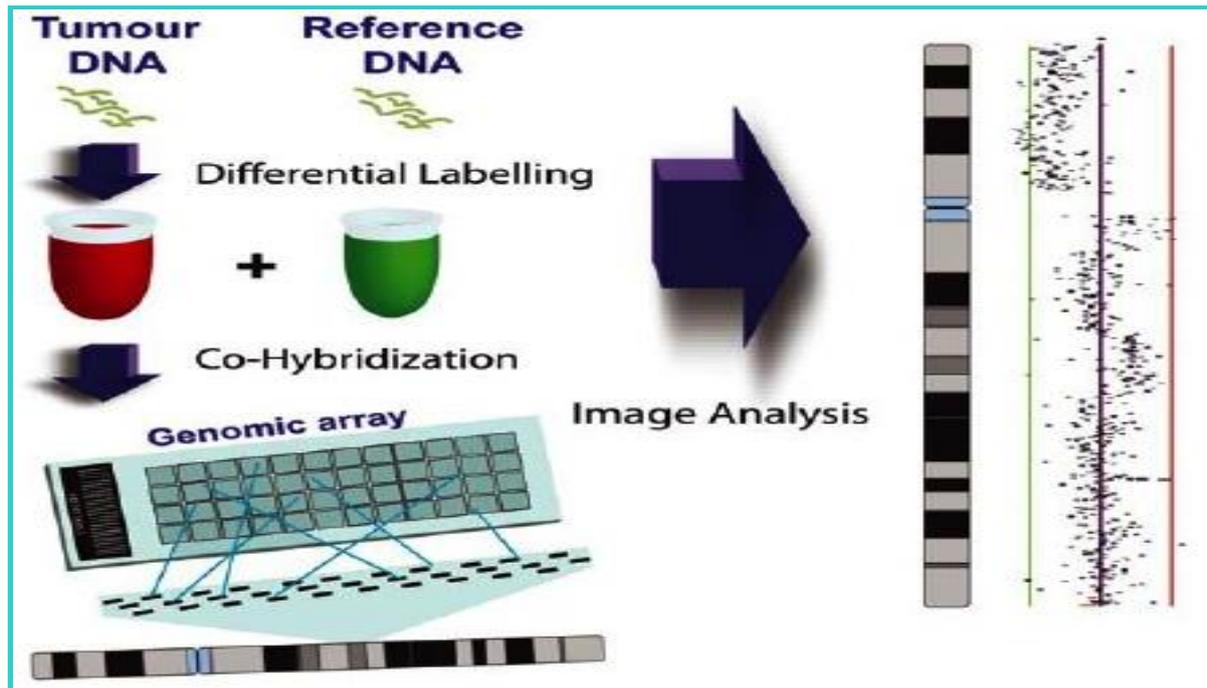


Abb. 9: Prinzip der ArrayCGH (Davies J et al., 2005)

Seit es möglich wurde, expressionsoptimierte Oligonukleotide, das heißt rein genspezifische Exonsequenzen, entweder auf den Objektträger aufzuspritzen oder sogar direkt auf dem Array zu synthetisieren, können Arrays mit bis zu zwei Millionen Oligonukleotiden hergestellt werden (z.B. Nimblegen). Mit dieser sensitiven Technik erreicht man mit einer hohen Auflösung von bis zu 1Mb einen Überblick über das gesamte Genom.

Vor Entwicklung der hochauflösenden Oligonukleotid-CGH wurden *BACs* mit einer Länge von ca. 100 bis 200 Basenpaaren auf einen Objektträger aufgespottet. Diese geben ebenfalls einen Überblick über das gesamte Genom. Sie liefern jedoch ungenauere Daten als die optimierten Expressions-Arrays, da die verwendeten *BACs* zu den Gen- auch nichtkodierende Intronsequenzen enthalten. Zudem ist die Auflösung mit einer Verteilung des Genoms auf 3000 bis 4000 Punkte deutlich geringer als bei der Oligonukleotid-ArrayCGH.

In unserem Fall waren 34.580 Oligonukleotide mit einer Länge von jeweils 70 Nukleotiden auf die Objektträger aufgespottet (*NHGRI/NIH MicroArray-Core Facility mit Operon 70mer oligonucleotide set version 3*), die insgesamt 24.650 Gene repräsentierten.

6.7.2.1 Experimenteller Aufbau einer ArrayCGH

Die Konzentrationen der Proben-DNA aus Tumorzelllinien sowie aus dem Normalgewebe wurden mit dem *NanoDrop*[®] gemessen und sollten etwa 25 bis 75 ng/µl betragen. Danach wurde die DNA nach dem Prinzip der *rolling-circle*-Replikation mit dem *REPLI-g Midi Kit* vervielfältigt. Die mit dem *NanoDrop*[®] gemessene DNA-Menge betrug zwischen 10 und

30 µg. Zur Erfolgskontrolle der *REPLI-g*-Amplifikation wurde mit einer Intra-*ALU*-PCR die Menge der menschlichen *ALU*-Sequenzen quantifiziert und bei einem Anteil von etwa 10- 30% wurde die Reaktion als erfolgreich angesehen. Mit der folgenden Gelelektrophorese wurde das Ergebnis der vorangegangenen *ALU*-PCR rein qualitativ kontrolliert. Dabei sollten mehrere Banden mit DNA-Fragmenten in Längen zwischen 1 und 20 kb im Agarosegel sichtbar sein, um den Erfolg der Reaktion zu bestätigen.

Nach *Labeling (Bio Prime Genomic Labeling Kit)* der Normal- bzw. Tumor-DNA mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen *Cy3* (rot) und *Cy5* (blau) wurde die DNA gereinigt, das Gesamtvolumen pro *Cy*-Ansatz mit der Vakuumzentrifuge von 80 µl auf 10 µl reduziert und die DNA später auf die vorbehandelten Objektträger hybridisiert. Zur Vermeidung von Fehlhybridisierungen der Proben-DNA auf Proteinstrukturen auf dem Objektträger wurden die *MicroArray*-Objektträger (Operon, Köln) zuvor mit Prähybridisierungspuffer inkubiert. Das im Prähybridisierungspuffer enthaltene BSA (bovines Serum-Albumin) diente zur Präblockierung dieser Proteinstrukturen.

Zur Hybridisierung wurden die *Mixer chambers* (BioMicro Systems) auf der bedruckten Oberfläche der *MicroArrays* befestigt. Die Kammern wurden mit 50 µl einer Mischung aus folgenden Bestandteilen gefüllt: Formamid-Hybridisierungspuffer, *Cy 3-gelabelte* Normal-DNA-Lösung und *Cy 5*-markierte Tumor-DNA im Verhältnis 1:1 sowie 10fach *Cot-1*-DNA. Die Objektträger wurden im MAUI[®] hybridization system (BioMicro Systems) für 16 bis 18 h bei 42°C hybridisiert. Eine homogene Hybridisierung wurde durch die aktive Mischung des MAUI[®]-Systems erreicht (Kamradt J, 2011).

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger in zwei verschiedenen Waschlösungen (siehe Kapitel 5.6.2) jeweils zweimal 5 min bei Raumtemperatur gewaschen, in einer Zentrifuge getrocknet und in einem dunklen Exsikkator bis zum Scannen aufbewahrt. Während der Waschung wurden die nicht-gebundenen DNA-Fragmente sowie Reste des Formamidpuffers und andere Verunreinigungen von der Oberfläche abgelöst.

Die *MicroArrays* wurden mit dem *Scan Lite Express Scanner* (Perkin Elmer) ausgelesen. Eine erste Bildanalyse der generierten Graustufenbilder erfolgte mit der Software *DeArray* (Chen Y et al., 1997). Die Fluoreszenz jedes Punktes wurde um die Hintergrundfluoreszenz korrigiert und ein Qualitätsindex (zwischen 0 und 1) berechnet. Zusätzlich wurden alle *MicroArray*-Bilder direkt angeschaut und beschädigte Punkte von Hand gelöscht. Die Ergebnisdateien wurden mit der frei zugänglichen Software R (<http://www.r-project.org>, Software für statistische Berechnungen und graphische Darstellung) sowie mit Anwendungen aus dem Bioconductor-Software-Projekt (Gentleman R et al., 2004; <http://www.bioconductor.org>,

Software zur Analyse und zum Verständnis großer Mengen genomischer Daten) weiterbearbeitet. Diese von *DeArray* generierten Daten wurden LOWESS (*locally weighted scatterplot smoothing*) -normiert und die Oligonukleotide mit einem Qualitätsindex $>0,3$ herausgefiltert (Kamradt J, 2011).

Um die chromosomalen Regionen mit veränderter Kopienzahl zu detektieren, erfolgte eine statistische Analyse in zwei Schritten. Nach Zuordnung der gemessenen Genkopienzahl-Verhältnisse (Quotient aus Genkopienzahl im Tumorgewebe zu Genkopienzahl im Normalgewebe) zu der entsprechenden Chromosomenbande kam für die Glättung der Daten eine Kombination aus verschiedenen biomathematischen und statistischen Modellen zum Einsatz. Zur Identifizierung von Regionen mit konstanter Kopienzahl verwendeten wir den Glättungsbasierten Algorithmus GLAD (Hupé P et al., 2004). Dieser Algorithmus passt eine teilweise konstante Funktion an die logarithmischen Quotienten entlang der Chromosomen an. Dann wurden für jede Probe die amplifizierte oder deletierte Regionen identifiziert, der Median- und Quartilsabstand berechnet und eine normale Verteilung an die entsprechenden Parameter angepasst. Zuletzt wurden konstante Regionen mit Werten größer oder kleiner der spezifischen Cutoff-Intervalle als Gewinne oder Verluste interpretiert. Zur Unterscheidung zwischen schwachen und starken Abweichungen wurde entweder der Mittelwert plus einfache oder der Mittelwert plus zweifache Standardabweichung gewählt (Kamradt J, 2011).

7 Ergebnisse

7.1 *ArrayCGH*: Genkopienzahlveränderungen beim Prostatakarzinom

7.1.1 Minimal recurrent regions of alterations und Vergleich der *ArrayCGH*-Ergebnisse mit früheren Daten aus chromosomaler CGH

In den *Array*-Analysen zeigte sich, dass die untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien *PC3_{HOM}*, *DUI145_{HOM}*, *LNCaP* und *CWR22*, sowie die aus ihnen entstandenen Sublinien *PC3-N*, *DUI145-MNI* und *CWR22-RV1* zahlreiche genomische Veränderungen im Vergleich zu gesunden Prostatazellen aufweisen. Weil bei *ArrayCGH*-Untersuchungen sehr große Datenmengen entstehen, war eine einfache visuelle Begutachtung der veränderten Genloci zu ungenau und ineffizient. Mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Laura Tolosi (Institut für Biomathematik und angewandte Algorithmik, Max-Planck-Institut für Informatik, Saarbrücken) und Dr. Jörg Rahnenführer (Institut für Statistische Methoden in der Genetik und Chemometrie, Universität Dortmund) wurden die *ArrayCGH*-Daten durch Anwendung verschiedener biomathematischer und statistischer Modelle ausgewertet.

Bei den Autosomen der Tumor-Zelllinien fanden sich zahlreiche Regionen regelmäßig wiederkehrender Veränderungen, viele davon kleiner als eine einzelne Chromosomenbande. Diese Genombereiche nennt man „*minimal recurrent regions of alterations*“ (kleinste Regionen wiederkehrender Veränderungen).

Im Vergleich mit den vorliegenden Daten der Arbeitsgruppe aus konventioneller chromosomaler CGH fielen einige kleine Veränderungen auf, die nur mit Hilfe der *ArrayCGH*-Untersuchungen gefunden wurden. Vor allem im Bereich rund um die Zentromere sowie nahe der Telomere konnten mit der *ArrayCGH* einige bis dahin noch nicht beschriebene Veränderungen detektiert werden. Bei diesen Veränderungen handelte es sich sowohl um Amplifikationen (z.B. Gengewinn auf 9p) als auch um Deletionen (z.B. Genverlust auf 14q) (siehe Abb. 10). Mit einer deutlich höheren räumlichen Auflösung in der *ArrayCGH* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass einige in der konventionellen CGH gefundene große Amplifikationsbereiche sich in Wirklichkeit aus einer Vielzahl kleinerer Gewinne mit dazwischenliegenden nicht-amplifizierten Bereichen zusammensetzen.

Die kleinsten mit Hilfe der *aCGH* zu detektierenden Veränderungen lagen bei einer Größe von 110 kb für Verluste von genetischem Material (Region 19q13.41 in den Zelllinien *DUI145-MNI* und *CWR22-RV1*), sowie einer Größe von 760 kb für Gewinne (Region 14q32.11-14q32.12 in den Zelllinien *PC3_{HOM}*, *PC3-N*).

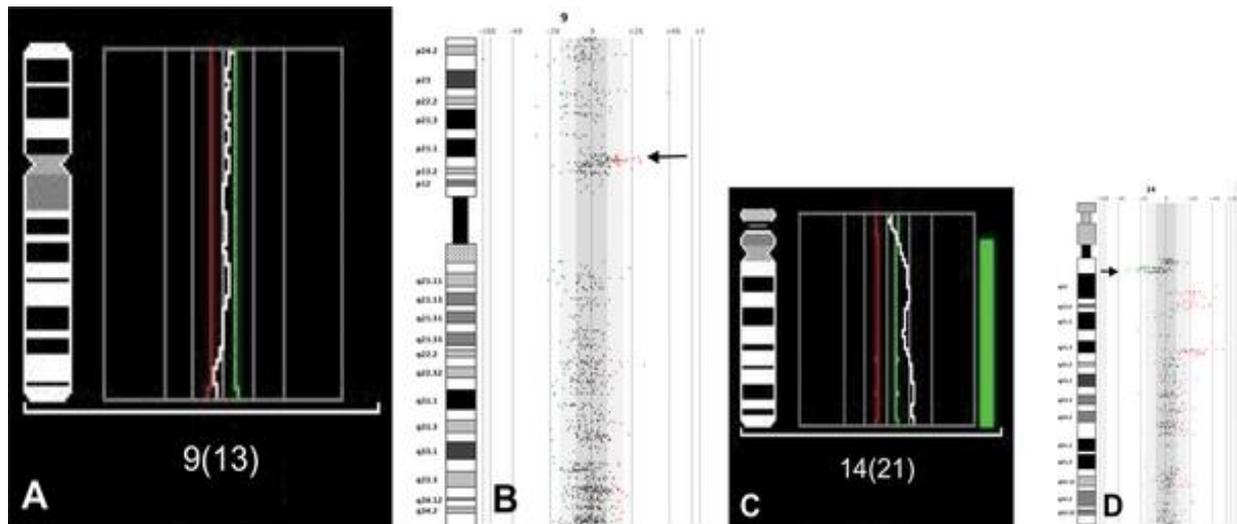


Abb. 10: Vergleich der Ergebnisse aus cCGH (A, C) und aCGH (B, D) am Chromosom 9 der Zelllinie *CWR22* sowie am Chromosom 14 der Zelllinie *DUI45-MNI* (Kamradt J et al., 2007)

Eine kleine Region mit einem Gengewinn nahe des Zentromers auf Chromosom 9p (B, mit Pfeil markiert), sowie ein kleiner Genverlust auf Chromosom 14q (D, mit Pfeil markiert) wurden nur in der *ArrayCGH* entdeckt.

Obwohl die meisten chromosomalen Veränderungen in beiden (sowohl in chromosomaler CGH- als auch in *ArrayCGH*-) Versuchsreihen auffielen, konnten jedoch mit der *Micro-Array*-Methode mehr Verluste detektiert werden. Mit Hilfe der konventionellen Metaphase-Technik hingegen wurden mehr Stellen großer Genamplifikationen gefunden. Für die meisten Bereiche mit quantitativen Abweichungen im Genmaterial gab es jedoch keinen Unterschied in der Sensitivität der beiden Methoden (Tabelle 3, vgl. Kamradt J et al., 2007).

7.1.2 Vergleich parentaler Tumorzelllinien und ihrer Sublinien

Im direkten Vergleich der primären Tumorzelllinien (*PC3_{HOM}*, *DUI45_{HOM}* und *CWR22*) mit der jeweils korrespondierenden Sublinie (*PC3-N*, *DUI45-MNI* und *CWR22-RV1*) zeigte die *ArrayCGH* große Übereinstimmungen in den zytogenetischen Veränderungen. Häufig unterschieden sich Eltern- und Tochter-Zelllinie jedoch in der Länge der sich entsprechenden veränderten Regionen. So konnte beispielsweise zwischen der Zelllinie *PC3_{HOM}* und ihrer Sublinie *PC3-N* ein deutlicher Längenunterschied der amplifizierten Bereiche auf den Chromosomenarmen 12q und 15q nachgewiesen werden. In beiden Fällen wies die Sublinie die längere Amplifikation auf.

Tabelle 3: Überblick über die chromosomalen Veränderungen, die entweder nur mit der chromosomalen CGH oder nur mit der ArrayCGH gefunden wurden (vgl. Kamradt J et al., 2007)

Zelllinie	chromosomale Veränderungen		
	Gesamtzahl in beiden Untersuchungen	nur mit ArrayCGH gefunden	nur mit cCGH gefunden
<i>PC3_{HOM}</i>	26	-1q24.3, -1q32.2, -3q25.1, -3q27.1-q28, +5q11-5q12.2, +12p12.1-p13, -12p11.2, -12q24.33	+2p23-p25, +5p14-p15, +7, +11q14-q25
<i>PC3-N</i>	28	-1q21-q24.3, +1q25.1-q32.1, +1q43, +17q11, -17q21.31-q25	+2q21-q24, +7p11-p22, +9q22-q34
<i>DUI145_{HOM}</i>	12	+9p13.2-p13.3, +9p21-q34, +12p11.1-p13	+2p14-p25, +7p11.2-p22, +10q22-q26, +11q11-q25, +12q11.2-p24.3, +15, +16q21-q24
<i>DUI145-MNI</i>	15	+1p12, +11p15.4, +12p12.1, -14q21.3, -17q12, -19q13.4	+2p14-p25, +10q22-q26, +11q13-q14, +15, +16q21-q24
<i>LNCaP</i>	8	-1p33, -11q21.1-q34, -13, -19q13.2-q13.43	-19p13.3
<i>CWR22</i>	14	+9p13.3	+8p21-p23, +10q25-q26
<i>CWR22-RVI</i>	20	-2p, -9p21-p24, +9p13.3	

7.1.3 Region 9p13.3

In den ArrayCGH-Analysen der Tumorzelllinien *CWR22* und *CWR22-RVI* konnte auf Chromosom 9 eine zuvor noch nicht als vermehrt beschriebene Region mit eindeutigem Kopienzahlgewinn identifiziert werden. Diese Amplifikation konnte der zentromernahen Bande 9p13.3 zugeordnet werden. Mit einer Größe von 1,7 Mb war der Bereich offensichtlich zu klein, um in der konventionellen cCGH aufzufallen. Obwohl eine frühere Veröffentlichung die Größe dieser amplifizierten Region mit 3,1 Mb beschreibt (Saramäki O et al., 2006), konnte der Amplifikationsbereich mit unseren Daten auf eine Größe von 1,7 Mb eingegrenzt werden.

7.2 BAC-FISH: Validierung der ArrayCGH-Daten

Zur Validierung des Gengewinns in der Region 9p13.3 kam eine spezielle Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH, zur Technik siehe Kapitel 6.6) zur Anwendung. Mit Hilfe des von Sa-

ramäki im Jahr 2006 schon validierten *BAC*-Klons RP11-165H19, der für die zu untersuchende Region auf der Chromosomenbande 9p13.3 kodiert, wurden die beiden Tumorzelllinien *CWR22* und *CWR22-RVI* auf einen möglichen Kopienzahlgewinn untersucht. Als Kontrolle diente eine für das Zentromer von Chromosom 9 spezifische Sonde (D9Z1), die zur Unterscheidung mit einer anderen Farbe markiert wurde als der *BAC*.

In der *BAC*-FISH-Analyse zeigte der verwendete *BAC*-Klon bei beiden Tumorzelllinien deutlich vermehrte Signale (siehe Abb. 11, A und B) im Vergleich zum Referenzversuch auf normalen Metaphase-Chromosomen aus Blutlymphozyten eines gesunden männlichen Spenders. Im Referenzversuch zum Ausschluss eventueller Kreuzhybridisierungen waren erwartungsgemäß zwei rote Signale für die Chromosom 9-Zentromerregion, sowie zwei grüne Einzelsignale für den *BAC*-Klon zu sehen (Abb. 11, C). Die Genamplifikation in der Region 9p13.3 konnte mithilfe der *BAC*-FISH eindeutig bestätigt werden.

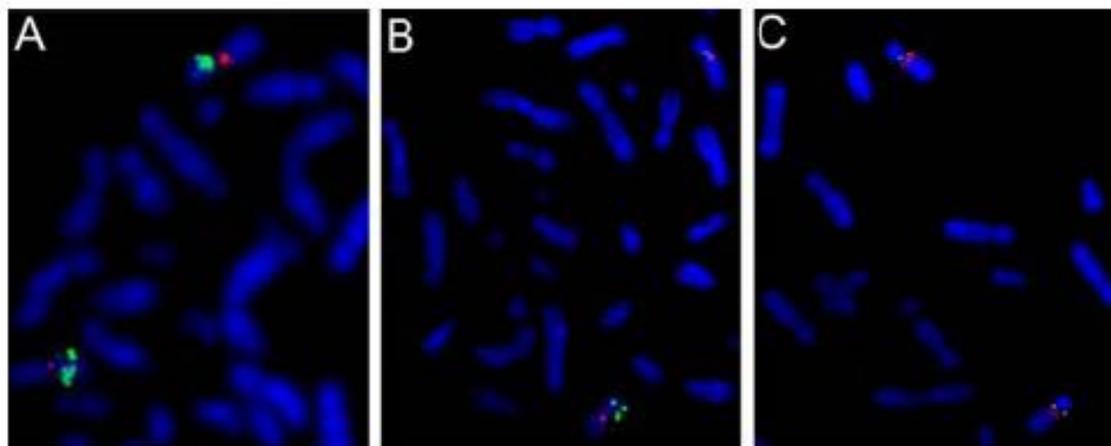


Abb. 11: Nachweis einer DNA Kopienzahlvermehrung in der Region 9p13.3 mittels FISH-Analyse an den Zelllinien *CWR22* (A) und *CWR22-RVI* (B) (Kamradt J et al., 2007).

Signale des *BAC*-Klons RP11-165H19 erscheinen in grüner, die der Zentromerregion auf Chromosom 9 (D9Z1) in roter Farbe.

A, B Nachweis vermehrter Signale des verwendeten *BAC*-Klons in den Zelllinien *CWR22* und *CWR22-RVI*.

C Referenzversuch zum Ausschluss einer Kreuzhybridisierung an normalen Metaphase-Chromosomen.

Der verwendete *BAC*-Klon trägt nicht nur die Sequenz eines einzelnen Gens, sondern kodiert für zwei verschiedene, in der beschriebenen Region benachbarte Gene.

Diese beiden Gene - *IL11RA* (Zurita A et al., 2004; Campbell C et al., 2001) und *DCTN3* (Saramäki O et al., 2006) - wurden in früheren Arbeiten bereits teilweise untersucht. Ihnen wird eine nicht unerhebliche Rolle in der Entstehung von Prostatakarzinomen zugeschrieben. Auf-

grund der Ergebnisse der angeführten Publikationen sowie unserer eigenen Datenlage schien es Erfolg versprechend, diese beiden Kandidatengene mit Hilfe einer quantitativen *Real-Time-PCR* genauer zu untersuchen.

7.3 Quantitative *Real-Time-PCR*

Nachdem in der *ArrayCGH* in zwei PCa-Zelllinien eine Amplifikation der Chromosomenregion 9p13.3 aufgefallen und diese Amplifikation mit der *BAC-FISH*-Technik bestätigt worden war, konnten mit der *Real-Time-PCR* genauere Informationen über die einzelnen Gene in diesem Bereich gewonnen werden.

Unter Verwendung spezifischer *Primer* für die beiden Gene *IL11RA* und *DCTN3* war es möglich, die jeweiligen Kopienzahlen in der DNA eines Gewebes einzeln und voneinander unabhängig zu beurteilen.

Wir untersuchten die Genkopienzahlen von *IL11RA* und *DCTN3* in den primären Prostatakrebs-Zelllinien *PC3_{HOM}*, *DUI45_{HOM}* und *CWR22*, sowie in den aus ihnen hervorgegangenen Sublinien *PC3-N*, *DUI45-MNI* und *CWR22-RV1*. Zusätzlich wurden die Genkopienzahlen von *IL11RA* und *DCTN3* in 20 primären Prostatakarzinomproben aus radikalen Prostatektomien aus unserer Klinik ermittelt.

7.3.1 PCR-Effizienz bzw. *Primer*-Effizienz und Standardkurven

Vor Beginn der Experimente ermittelten wir die Effizienzen der verwendeten *Primer*. Im ersten PCR-Lauf wurden sechs verschiedene Verdünnungsstufen einer Probe (bei uns: 80 ng, 40 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng und 1 ng) eingesetzt. Für jeden *Primer* wurde eine Standardkurve erstellt. Dafür wurden die ermittelten C_T -Werte (= PCR-Zykluszahl) gegen den Zehner-Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Unter Verwendung der Steigung der Geraden (siehe Abb. 12) lässt sich die Effizienz E eines *Primers* nach folgender Formel (Pfaffl M, 2004) errechnen:

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

Der Nachteil dieser Methode ist, dass sie die Effizienz der *Real-Time-PCR* überschätzt. So errechnen sich oft Werte über 2,0 (Pfaffl M, 2004).

Für unsere *Primer* ergaben sich folgende, sehr nahe an 2 gelegene, Effizienzwerte:

IL11RA → $E = 1,95$

DCTN3 → $E = 2,03$

TOP2B → $E = 1,95$

ALDH1 → $E = 2,02$

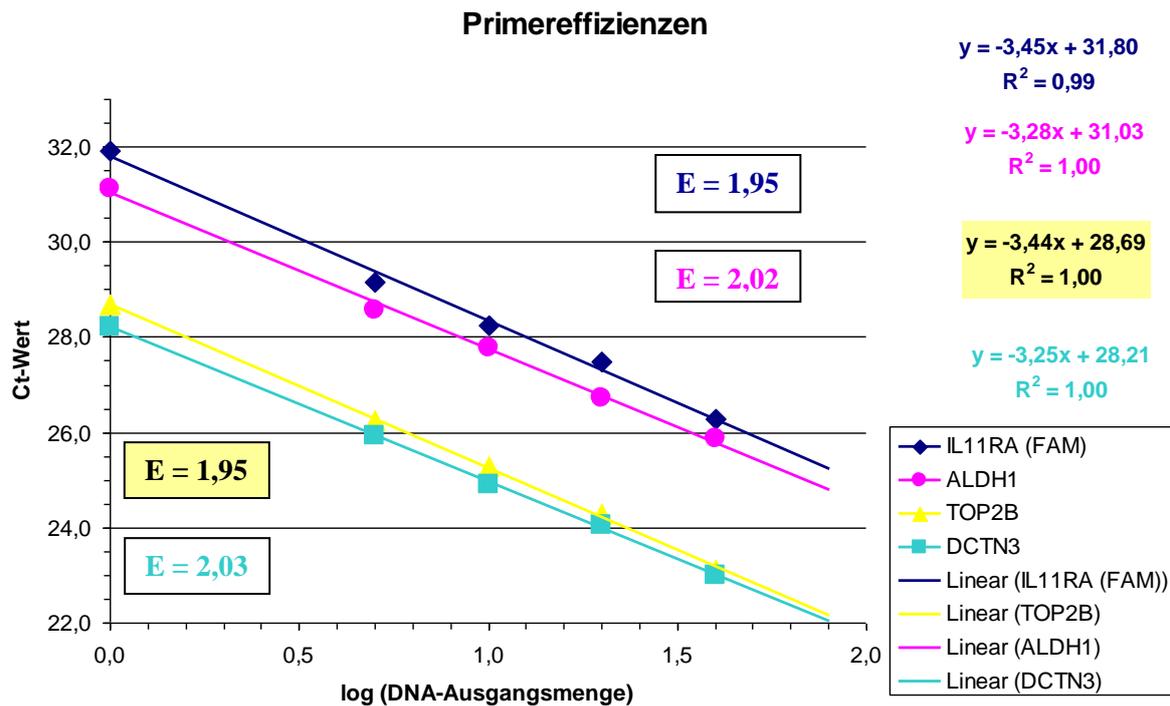


Abb. 12: Standardkurven der verwendeten Primer mit Darstellung der Bestgeraden und der Funktionsgleichungen.

Die C_T -Werte, die sich beim Einsatz von 80 ng DNA ergaben, lagen außerhalb des linearen Bereichs und wurden daher zur Berechnung der *Primereffizienzen* nicht berücksichtigt.

Vor Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode ohne interne Standardkurven mussten die *Primereffizienzen* untereinander verglichen werden. Zum direkten Vergleich zweier Effizienzen wurden die ΔC_T -Werte aus Ziel- und Referenzgen gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen DNA-Ausgangsmengen aufgetragen.

Wir verglichen die Zielgene *IL11RA* und *DCTN3* sowie das Gen *ALDH1B1* jeweils mit dem von uns gewählten Referenzgen *TOP2B* (siehe Abb. 13).

Die errechneten Steigungen lagen bei allen untersuchten Genen nahe am geforderten Absolutwert von 0,1 (User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System*, 1997, S. 11-14).

IL11RA → Steigung = 0,01

DCTN3 → Steigung = 0,19

ALDH1 → Steigung = 0,16

Da die kommerziellen *Primer* von *Applied Biosystems* zudem gut validiert sind, wurde entschieden, in den einzelnen Läufen keine internen Standards zu berücksichtigen.

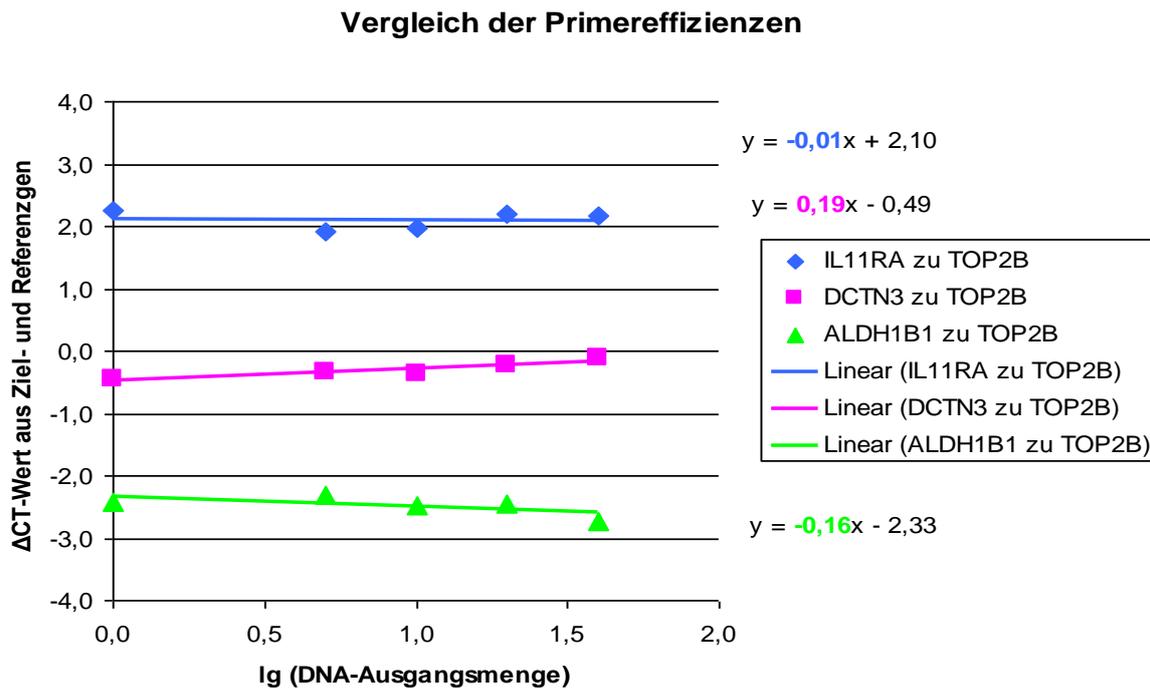


Abb. 13: Vergleich der Effizienzen der Zielgene mit dem Referenzgen *TOP2B* mit Darstellung der Bestgeraden.

Die Steigungen lassen sich aus den Funktionsgleichungen ablesen.

Als Referenzen zur Normierung der DNA-Kopienzahlbestimmung diente das in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe bereits validierte Gen *TOP2B*. Während der malignen Transformation von normalen Prostatazellen zu Prostatakarzinomzellen erfährt das Gen der Topoisomerase 2 beta weder einen Gewinn noch einen Verlust von Material bzw. Information (Kindich R et al., 2005).

Die C_T -Werte der einzelnen Proben für *TOP2B* lagen jeweils innerhalb eines Experiments sehr eng beieinander, die Standardabweichung zwischen den Werten war gering. Diese Ergebnisse sprechen für eine stabile, wenig störanfällige Expression des Gens *TOP2B*. Über alle Versuche hinweg lag der mittlere C_T -Wert für *TOP2B* bei 26,25.

Die Kopienzahlen des Gens *TOP2B* auf dem Chromosom 3p24.2 waren im Vergleich zu den Kontrollproben aus normalem Blut unverändert.

Somit bestätigte sich erneut die Tauglichkeit von *TOP2B* als Referenzgen für Untersuchungen an Prostatakarzinomen und PCa-Zelllinien (vgl. Kindich R et al., 2005).

7.3.1.1 Veränderungen der Genkopienzahl des Zielgens *IL11RA*

Das Gen *IL11RA* hatte in vier von sechs Zelllinien (*DU145_{HOM}* und *DU145-MN1*, *CWR22* und *CWR22-RV1*) sowie in 15 von 20 primären Tumorproben eine deutlich erhöhte Kopienanzahl gegenüber Normalwerten (Toleranzintervall von 1,77 bis 2,94).

Eine verminderte Genkopienzahl für *IL11RA* wurde nur in der Zelllinie *PC3_{HOM}* gefunden.

Somit konnten in 19 von 26 untersuchten Proben (entspricht 73%) deutlich über den für *IL11RA* ermittelten Normalwert erhöhte Genkopienzahlen gefunden werden (s. Abb. 14).

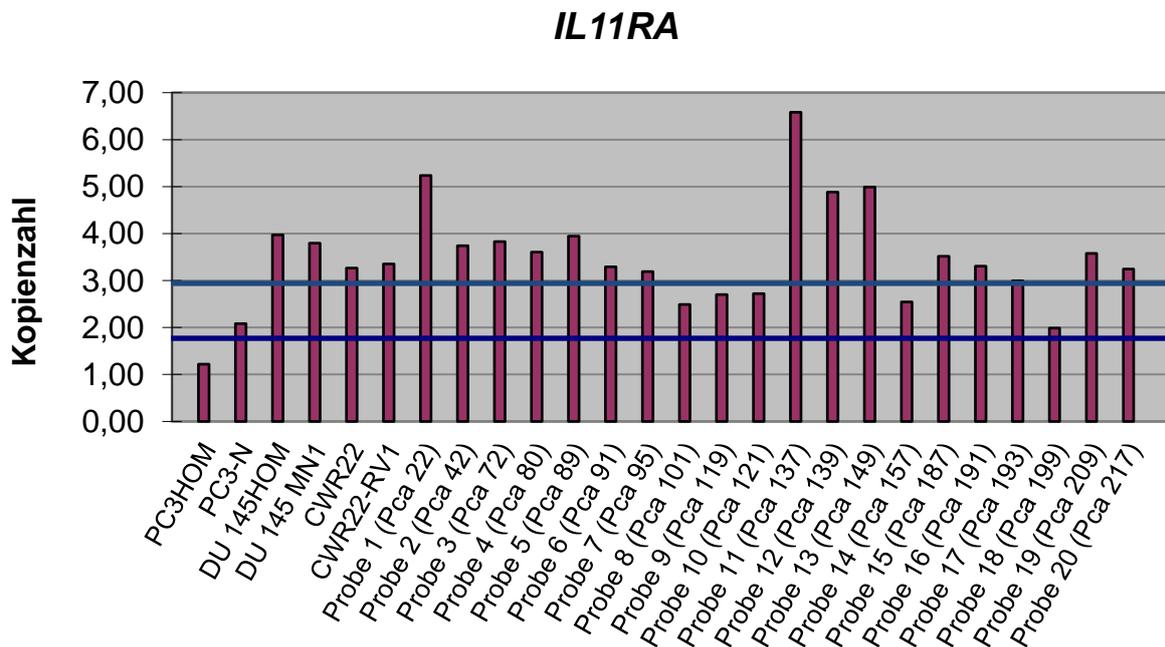


Abb. 14: Kopienzahlen des Gens *IL11RA* in den untersuchten Tumorzelllinien und Prostatakarzinomen.

Die graublau horizontale Linie markiert den oberen Wert (2,94), die blaue Linie den unteren Wert (1,77) des *Cutoff*-Intervalls für *IL11RA*.

Werte oberhalb der oberen *Cutoff*-Linie wurden als erhöhte Genkopienzahl in der entsprechenden Probe bezeichnet, Werte unterhalb der unteren *Cutoff*-Linie als verminderte Genkopienzahl.

7.3.2 Veränderungen der Genkopienzahl des Zielgens *DCTN3*

Die Kopienzahlen des zweiten Zielgens *DCTN3* waren in keiner der sechs untersuchten Zelllinien und nur in zwei von 20 (10%) Prostatakarzinomproben leicht über den *Cutoff* (Intervall von 1,62 bis 3,17) erhöht.

Jedoch fanden sich in drei von sechs Zelllinien (*PC3_{HOM}*, *PC3-N* und *DU145-MN1*) sowie in zwei von 20 primären Karzinomproben unter den unteren Rand des Toleranzintervalls verminderte Kopienzahlwerte.

Eine Kopienzahlvermehrung von *DCTN3* konnte insgesamt in nur zwei von 26 Fällen (entspricht 8%) festgestellt werden. Allerdings war die Kopienzahl des Gens *DCTN3* in fünf von 26 untersuchten malignen Proben (19%) deutlich unter den *Cutoff* vermindert (s. Abb. 15).

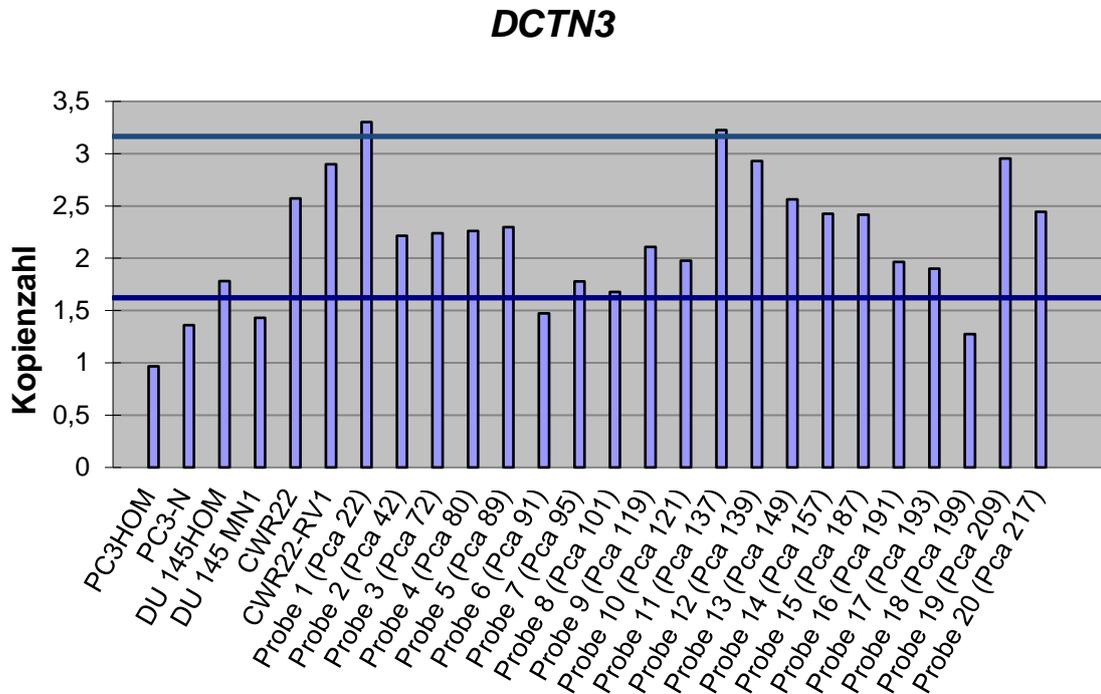


Abb. 15: Kopienzahlen des Gens *DCTN3* in den untersuchten Tumorzelllinien und Prostatakarzinomen.

Die graublau horizontale Linie markiert den oberen Wert (3,17), die blaue Linie den unteren Wert (1,62) des *Cutoff*-Intervalls für *DCTN3*.

Werte oberhalb der oberen *Cutoff*-Linie wurden als erhöhte Genkopienzahl in der entsprechenden Probe bezeichnet, Werte unterhalb der unteren *Cutoff*-Linie als verminderte Genkopienzahl.

7.3.3 Vergleich der Genkopienzahlen der beiden Zielgene *IL11RA* und *DCTN3*

Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse für beide Zielgene in einem gemeinsamen Säulendiagramm (Abb. 16) zusammenfassend dargestellt. Die Abbildung zeigt die Unterschiede in den Kopienzahlen der beiden Zielgene *IL11RA* und *DCTN3* sehr deutlich. Bei allen untersuchten Proben besitzt *IL11RA* mehr Kopien als *DCTN3*, in manchen Proben (*DU145HOM*, *DU145-MN1*, *PCa 91*, *PCa 137* und *PCa 149*) erreicht *IL11RA* sogar doppelt so hohe Kopienzahlen wie *DCTN3*. *IL11RA* zeigt sowohl in Tumorzelllinien als auch in primären Karzinomproben deutlich erhöhte Genkopienzahlen (73% der untersuchten Proben). *DCTN3* hat nur in 8% der untersuchten Proben einen Kopienzahlgewinn, jedoch in 19% der Proben einen Kopienzahlverlust.

DCTN3 vs. IL11RA

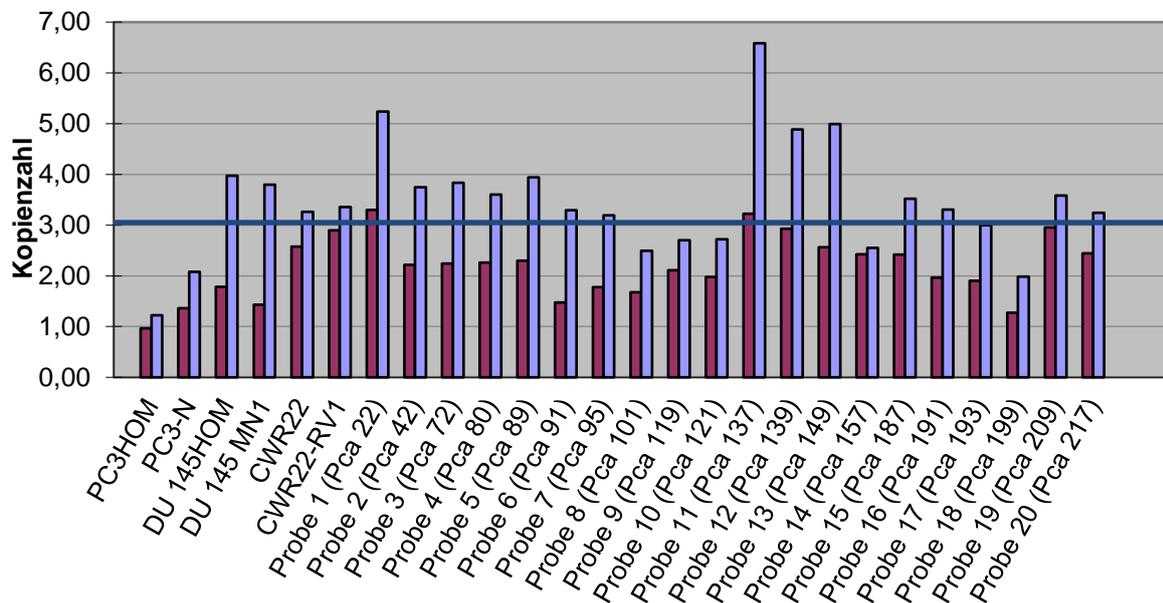


Abb. 16: Kopienzahlen der beiden Zielgene *DCTN3* und *IL11RA* im direkten Vergleich.

Die graublaue horizontale Linie markiert den oberen Wert des *Cutoff*-Intervalls für *DCTN3* (3,17).

7.3.4 Relevanz bei Prostatakarzinom-Patienten

Bei den 20 von uns untersuchten primären Prostatakarzinomproben waren sechs *intermediate risk*-Tumoren und 14 *high risk*-Tumoren. Auch die beiden Tumoren mit einem Gleason-Score von nur 3 hatten eine Tumorausdehnung von pT2b und wurden damit als *intermediate risk*-Tumoren eingestuft (siehe Tabelle 1, Seite 13).

Bei den 15 Tumoren mit einer Erhöhung der *IL11RA*-Kopienzahl sind elf *high risk*-Tumoren und vier *intermediate risk*-Tumoren (entsprechend 73% *high risk*-Tumoren). Allerdings sind bei den fünf Tumoren ohne *IL11RA*-Erhöhung auch drei *high risk*-Tumoren (entsprechend 60%) dabei. Von den vier PCas mit den höchsten *IL11RA*-Werten haben drei einen Gleason-Score von 8 oder 9, ein Pca einen Gleason-Score von 6.

Auffällig ist, dass die fünf systemisch fortgeschrittenen Tumoren mit Befall regionaler Lymphknoten (pN1) alle auch eine große Primärausdehnung (pT3, Tumor durchbricht die Prostata kapsel, ist aber noch nicht mit den umgebenden Strukturen wie zum Beispiel Blase oder Rektum verwachsen) und einen hohen Gleason-Score von 9 oder 10 haben. Vier von ihnen haben auch deutlich erhöhte *IL11RA*-Werte, einer jedoch nicht. Von den vier lokal fortgeschrittenen Tumoren (mindestens pT3, aber pN0) zeigen 3 eine *IL11RA*-Erhöhung.

Insgesamt scheint es eine gewisse Korrelation zwischen erhöhten *IL11RA*-Werten und (lokal oder systemisch) fortgeschrittenen Tumorstadien sowie höheren Gleason-Scores zu geben. Leider ließ sich kein eindeutiger Zusammenhang finden und keine allgemeingültige Aussage treffen, sodass nicht zwingend von einem erhöhten *IL11RA*-Wert auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium oder einen höheren Gleason-Score geschlossen werden kann.

7.3.5 Beurteilung des Kontrollgens *ALDH1B1*

Bei der Auswertung der PCR-Daten des Gens *ALDH1B1* legten wir eine gesicherte Kopienstabilität des in Prostatakarzinomen validierten Referenzgens *TOP2B* zugrunde. Für die Normalwerte von *ALDH1B1* ergab sich ein Toleranzintervall von 1,34 bis 3,69. Betrachtet man die Kopienzahlen von *ALDH1B1* in den Tumorproben, liegen 19 von 20 Werten innerhalb des Toleranzintervalls, ein einziger Wert liegt gerade außerhalb der unteren Intervallgrenze. Von sechs Zelllinien besitzen vier normwertige Kopienzahlen für *ALDH1B1*, in einer Zelllinie konnte ein Verlust, in einer anderen ein Gengewinn gefunden werden. Somit liegen die Kopienzahlen des Gens *ALDH1B1* in 23 von 26 (88%) untersuchten malignen Proben innerhalb des Intervalls, in dem normalerweise in gesunden Zellen die Kopienzahl von *ALDH1B1* liegt.

Die absoluten Werte variieren jedoch so stark von den *TOP2B*-Werten, dass keineswegs von einer Kopienstabilität des Gens *ALDH1B1* in Prostatakarzinomen ausgegangen werden kann. Vergleicht man das Gen *ALDH1B1* mit *TOP2B*, dann lagen die $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte bei den 20 Tumorproben zwischen 0,65 und 1,71, bei den untersuchten Zelllinien sogar zwischen 0,49 und 1,85. Eine für *ALDH1B1* normale Kopienzahl variiert folglich zwischen 0,98 und 3,7. Normalerweise liegt ein Gen im Erbgut mit 2 Kopien vor. *ALDH1B1* zeigte in unseren Versuchen stark abweichende Werte zwischen „halber“ und „annähernd doppelter“ Kopienzahl.

Betrachtet man die beiden eigentlichen Zielgene *IL11RA* und *DCTN3* mit *ALDH1B1* als Kontrollgen in der $\Delta\Delta C_T$ -Berechnung, müssten sich unter Annahme einer Kopienstabilität zumindest sehr ähnliche Werte bezüglich Gewinn und Verlust im malignen Genom ergeben, wie bei der Verwendung von *TOP2B* als Referenzgen.

Tatsächlich gibt es für *IL11RA* bei Gegenüberstellung der beiden verschiedenen Kontrollgene eine Überschneidung der Ergebnisse in insgesamt 17 von 26 Proben (65%). Und auch für das Gen *DCTN3* finden sich in 65% der Fälle (17 von 26) vergleichbare Ergebnisse.

Obwohl *TOP2B* als Referenzgen viel besser geeignet ist als *ALDH1B1*, stimmen beim Vergleich von *TOP2B* und *ALDH1B1* dennoch 65% der Ergebnisse für *IL11RA* und *DCTN3* überein. Ein klares Muster, warum manche Werte übereinstimmen und andere stark differieren, ließ sich aus unseren Daten jedoch nicht herauslesen. Nach Auswertung aller Daten

konnte *IL1RA* eindeutig als Zielgen der Amplifikation beim Prostatakarzinom identifiziert werden.

8 Diskussion

Das Prostatakarzinom ist eine häufige und klinisch äußerst heterogene Erkrankung. Jedes Jahr betrifft diese Diagnose in Deutschland mehrere Zehntausend Männer. Ein Großteil der Patienten wünscht und bekommt eine radikale und definitive Therapie. Allerdings zeigen nur wenige Tumoren eine rasche Progredienz mit Ausbildung von lymphatischen und Fernmetastasen. Viele Tumore, da zunehmend in einem frühen Stadium entdeckt, verlaufen indolent und hätten niemals Auswirkungen auf die Lebenserwartung des Betroffenen. Sie müssten nicht aggressiv therapiert werden. Trotz vielversprechender Forschungsbemühungen zur Prostatakarzinogenese in den vergangenen Jahren ist eine frühe prognostische Einteilung in indolente und aggressive Tumoren anhand des Gewebes aus Stanzbiopsien zurzeit noch immer nicht verlässlich möglich, weshalb viele Patienten auf Kosten ihrer Lebensqualität übertherapiert werden (Stenman U, 2005; Recker F, 2006; Pilia I, 2007). Dieses Problem gilt es zu lösen.

Und obwohl die Therapieoptionen des kastrationsresistenten und eventuell bereits metastasierten Prostatakarzinoms in den vergangenen Jahren deutlich erweitert wurden, bleibt es weiterhin Ziel der Forschung, eine individuelle, auf jeden einzelnen Patienten zugeschnittene Therapie auf der Basis verschiedener molekularer Besonderheiten des jeweiligen Tumors anbieten zu können. Dadurch könnten Therapienebenwirkungen minimiert und die spezifische Antitumorwirkung maximiert werden (Attard G et al., 2016; Smits M et al., 2017).

8.1 Diskussion der verwendeten Methoden

8.1.1 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die Methode der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH) wurde im Jahr 1992 von Anne Kallioniemi et al. entwickelt und im Magazin Science erstbeschrieben. Durch die gleichzeitige Hybridisierung (mit FISH-Technik im Verhältnis 1:1) zweier unterschiedlich markierter DNA-Proben (zum Beispiel Tumor-DNA gegen normale Kontroll-DNA) auf gesunde Metaphasechromosomen (bekannte DNA = Sonde) konnten erstmals zwei komplette Genome hinsichtlich der relativen Kopienzahlen bestimmter Regionen direkt in einem einzigen Experiment miteinander verglichen werden (Kallioniemi A et al., 1992). Anfang der 1990er war dies ein Meilenstein in der Untersuchung von Genkopienzahlen. Die Methode hatte aber den relevanten Nachteil, dass nur echte Gewinne oder Verluste wie Duplikationen, Amplifikationen und Deletionen erkannt wurden. Strukturelle Chromosomenaberrationen ohne Veränderungen der Kopienzahl (balancierte Translokationen, Inversionen oder auch Punktmutationen) blieben verborgen. Mit einer durchschnittlichen räumlichen Auflösung von etwa 10 bis 20 Megabasen (Weiss M et al., 1999) konnte quantitativ eine Veränderung von

einer Chromosomenkopie bis hin zu vier Kopien Gewinn oder Verlust unterschieden werden (Kallioniemi A et al., 1992) und ein einziges Experiment bot einen Überblick über das gesamte Genom (Kallioniemi O et al., 1994).

Die Weiterentwicklung zur Matrix-CGH oder *ArrayCGH* im Jahr 1998 durch Kombination der konventionellen chromosomalen CGH mit der Technologie der Expressionsanalyse auf *MicroArrays* (Pinkel D et al., 1998; Pollack J et al., 1999) brachte sowohl bei Verwendung von *BACs* als auch bei *cDNA* wesentliche Verbesserungen in der räumlichen Auflösung (van Dekken H et al., 2004; Paris P et al., 2006; Wolf M et al., 2004; Pollack J et al., 1999). Auch konnten Anomalien nahe der Telomere oder Zentromere mit *cDNA-Arrays* deutlich besser sichtbar gemacht werden als mit der konventionellen CGH (Wolf M et al., 2004).

Seit die Abfolge aller Basenpaare des menschlichen Genoms im Jahr 2013 entschlüsselt war (Human Genome Project: Nationales Genomforschungsnetz http://www.ngfn.de/de/verstehen_der_menschlichen_erbsubstanz.html), verwendete man synthetisch hergestellte Einzelstrang-Oligonukleotide auf Objektträgern (Oligonukleotid-*ArrayCGH* = oCGH). Sie waren expressionsoptimiert und beinhalteten nur genspezifische Exonsequenzen und weder repetitive Abschnitte, noch nicht-kodierende Intronsequenzen (Macgregor P and Squire J, 2002). Je nach Länge und Menge der verwendeten Elemente auf dem *Array* wurden bereits im Jahr 2007 problemlos Auflösungen von etwa 10 kb erreicht (Paris P et al., 2007).

Die praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation fanden in den Jahren 2006 und 2007 statt. Zu dieser Zeit war die *ArrayCGH* mit expressionsoptimierten Oligonukleotid-*Arrays* ein etabliertes, da vielfach beschriebenes Verfahren und für uns wegen der vertretbaren Kosten und der relativ einfachen Handhabung interessant. Mit verhältnismäßig geringem Aufwand konnten wir einen Überblick über numerische Veränderungen in sieben verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien gewinnen. Trotz des generellen CGH-Defizits, dass strukturelle Chromosomenaberrationen nicht abgebildet werden können, entschieden wir uns mit der Oligonukleotid-CGH für ein zu dieser Zeit noch fortschrittliches Verfahren. Mit dem Einsatz von knapp 35.000 70mer-Oligonukleotiden (expressionsoptimiertes 35K-70mer-*Array*) konnten eine hohe Auflösung und präzise Ergebnisse zu vertretbaren Kosten erreicht werden. Da uns aus früheren Versuchen der Arbeitsgruppe Ergebnisse der gleichen Tumorzelllinien aus konventioneller Chromosomen-CGH vorlagen, verglichen wir die Ergebnisse aus beiden Techniken auf Unterschiede. In unseren aktuellen Versuchsreihen entdeckten wir mit der *ArrayCGH* im Vergleich zur chromosomalen CGH deutlich mehr Deletionen sowie mehr kleine Gengewinne, da die chromosomale CGH vor allem nahe der Zentromere und der Telomere keine zuverlässigen Informationen über Nukleinsäureveränderungen liefert (Kamradt J et al., 2007; Kal-

lionemi O et al., 1994). Allerdings wurde ein großer, fast einen ganzen Chromosomenarm umfassender Gengewinn nur mit der konventionellen cCGH gefunden und mit der höherauflösenden *Array*-Technik übersehen. Sehr ähnliche Beobachtungen wurden 2006 von Saramäki publiziert, der verschiedene Prostatakarzinomzelllinien mit cDNA-basierter *aCGH* untersucht und ebenfalls mit cCGH-Daten verglichen hatte (Saramäki O et al., 2006). Diese Differenzen könnten - außer Fehlern, die bei der Normierung der Daten entstehen - vielleicht im Schritt der DNA-Vervielfältigung begründet sein. Während uns für die cCGH nicht-vervielfältigte DNA zur Verfügung stand, wurden die Nukleinsäuren für die *aCGH* mit der *phi 29*-Polymerase in der „*whole genome amplification*“ vermehrt. Obwohl diese im Vergleich zur herkömmlichen DNA-Amplifikation nach PCR-Prinzip als sehr genaue und fehlerarme Vorgehensweise beschrieben wurde (Hosono S et al., 2003), können dabei dennoch Fehler passieren (Kamradt J et al., 2007), die bei Weiterverarbeitung der DNA in solchen Unterschieden resultieren.

8.1.2 copy number variations in der Beurteilung der CGH-Daten

Große Probleme bei der Datenauswertung von CGH-Experimenten bereiten generell physiologische Kopienzahl- oder Sequenzabweichungen (*CNV = copy number variations*) im Erbgut verschiedener Individuen, z.B. segmentale Duplikationen (Pinkel D and Albertson D, 2005). *CNVs* gehören zu den langstreckigen, meist bis zu mehreren Hundert Kilobasen langen Variationen im menschlichen Erbgut, während die schon beschriebenen *SNPs* immer nur eine einzelne Base betreffen. Beide physiologisch vorkommenden genomischen Abweichungen zwischen verschiedenen Individuen sind Ausdruck der genetischen Vielfalt der Menschen. Bei der Untersuchung von Tumor-DNA ist es am besten, Normal-DNA vom gleichen Individuum als Kontrolle zu verwenden. Dann enthalten beide Proben die gleichen individuellen und krankheitsunabhängigen *CNVs* und diese werden nicht als tumorbedingte Kopienzahlveränderung fehlinterpretiert (Park P, 2008). Allerdings wird ein Experiment dadurch deutlich aufwändiger in der Planung und Durchführung als mit einer einzigen Kontrolle für alle Proben. Wenn eine individuelle Kontrollprobe fehlt und eine allgemeine Kontrolle für alle Proben verwendet wird, sinkt die Spezifität (Park P, 2008). Bei unseren CGH-Experimenten wurde trotz schlechterer Spezifität immer die gleiche Kontrollprobe eines gesunden Gewebes verwendet. So erhielten wir mit ungleich geringerem Aufwand dennoch aussagekräftige Ergebnisse.

Zu dieser Zeit war die Sequenzierung von Gensequenzen bereits möglich und die Vorteile der Methode über eine CGH klar ersichtlich. Damals kam gerade die erste und eine Zeit lang auch einzige Sequenzierungsplattform auf den Markt, es gab damit jedoch noch keine Erfahrungs-

werte und sowohl die technischen, als auch finanziellen und personellen Voraussetzungen waren nicht gegeben. Heute käme eine Oligonukleotid-CGH, auch mit ähnlicher Fragestellung, nicht mehr infrage.

8.1.3 Sequenzierung – state of the art in der genetischen Forschung

Die Doppelhelix-Struktur der DNA wurde bereits im Jahr 1953 durch Watson und Crick (Watson J and Crick F, 1953) erstbeschrieben. Aber erst knapp 25 Jahre später, im Jahr 1977, wurde ein Verfahren zur systematischen Analyse von DNA-Sequenzen entwickelt. Während sich die Methode von Maxam und Gilbert (Maxam A and Gilbert W, 1977) jedoch nie durchsetzen konnte, gilt Frederick Sanger mit Entwicklung der Sequenzierung über eine Dideoxy-Kettenterminierung (Sanger F et al., 1977) als Vater der Sequenzierung (Pillai S et al., 2017). Für einen Zeitraum von fast 40 Jahren war die **Sanger-Dideoxy-Methode** das weltweit am meisten verwendete Sequenzierungsverfahren (Morozova O and Marra M, 2008) und Ausgangspunkt für relevante technische Verbesserungen und die Entwicklung neuer Verfahren. Mit dieser ersten Schrotschuss-Sequenzierung (*shotgun sequencing*) konnten DNA-Sequenzen von mehr als 1000 Basenpaaren bis hin zu einem ganzen Chromosom entschlüsselt werden. Die Methode basiert auf der Synthese eines zur Matrize komplementären DNA-Stranges durch eine DNA-Polymerase in Gegenwart von normalen 2'-Deoxynukleotiden (dNTPs) und Beendigung der Synthese durch modifizierte und fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxynukleotide (ddNTPs) als irreversible Endpunkte. Immer wenn ein ddNTP an die wachsende Oligonukleotidkette angefügt wird, wird die DNA-Synthese beendet. So entstehen verschachtelte Fragmente variierender Länge mit dem entsprechenden ddNTP am 3'-Ende. Die Fragmente werden anschließend durch eine Gelelektrophorese der Größe nach sortiert und die DNA-Sequenz mithilfe der End-ddNTPs entschlüsselt (Metzker M, 2005; Morozova O and Marra M, 2008). Bis zur Einführung von vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarben für jedes der vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) mit gleichzeitiger Detektion musste für jedes der Dideoxynukleotide eine eigene Reaktion ablaufen und die Ergebnisse miteinander kombiniert werden (Smith L et al., 1986; Prober J et al., 1987). Die Länge der in einem Lauf gelesenen DNA-Sequenz betrug anfangs typischerweise zwischen 500 und 600 Basenpaare. Die Methode wurde über die Jahre kontinuierlich an verschiedenen Punkten verbessert. Zur möglichst fehlerfreien Sequenzierung eines größeren Genoms mussten viele Abschnitte mehrfach sequenziert und dann verglichen werden (Metzker M, 2005).

1981 war ein menschliches Mitochondrium als erste größere DNA-Sequenz komplett analysiert worden (Anderson S et al., 1981). Im Jahr 1996 folgte die Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* als erstes komplettes eukaryontisches Genom mit insgesamt rund 6000 Genen (Goffeau

A et al., 1996). Die Entschlüsselung der gesamten menschlichen DNA-Sequenz durch das Human Genome Project im Jahr 2003 (Collins F et al., 2003; Human Genome Project: Nationales Genomforschungsnetz http://www.ngfn.de/de/verstehen_der_menschlichen_erbsubstanz.html), mit Fertigstellung 50 Jahre nach Entdeckung der DNA-Doppelhelix-Struktur, war noch komplett mit der Sanger-Methode erfolgt, hatte mehrere Jahre gedauert und rund 2,7 Milliarden US-Dollar gekostet (Sequenzierungskosten: <https://www.genome.gov/11006943/human-genome-project-completion-frequently-asked-questions/>, Zugriff am: 10.08.2017). Im Jahr 2005 konnte ein gesamtes Säugetiergenom in etwa sechs Monaten mit Kosten von ungefähr zwölf Millionen US-Dollar analysiert werden (Metzker M, 2005). Insgesamt ist dieses Verfahren zeitintensiv und teuer, aber recht genau. Nach den Erfolgen des Humangenomprojektes wurden bald neue Systeme entwickelt, um in kürzerer Zeit zu geringeren Kosten größere Gensequenzen bis hin zu ganzen Genomen zu analysieren (Pillai S et al., 2017). Diese Methoden nannte man *next-generation sequencing (NGS)*.

Das bis etwa 2010 erfolgreichste NGS-Verfahren war die Pyrosequenzierung, eine Form der „Einzel-Nukleotid-Ergänzung“ (Metzker M, 2005). Sie wurde 1988 durch Hyman erstbeschrieben (Hyman E, 1988), von Ronaghi weiterentwickelt (Ronaghi M et al., 1996; Ronaghi M et al., 1998) und im Jahr 2005 als erste kommerziell erhältliche Sequenzierungs-Plattform (*454 Life Sciences platform*® von Roche Applied Sciences) auf den Markt gebracht.

Bei dieser Technik, die ohne Fluoreszenzmarkierung auskommt, ist immer nur eines der vier möglichen Nukleotide verfügbar und kann während der fortschreitenden Synthese von der DNA-Polymerase an den DNA-Strang angefügt werden. Beim Einbau des gerade verfügbaren Nukleotids wird ein anorganisches Pyrophosphat (= Diphosphat, Salz der Diphosphorsäure $H_4P_2O_7$) freigesetzt. Dieses wird durch eine Reihe von enzymatischen Reaktionen in sichtbares Licht verwandelt (Chemilumineszenz) und in einem sogenannten Pyrogramm detektiert. Die DNA-Polymerase beendet die Synthese sobald das gerade vorliegende Nukleotid nicht komplementär zur Matrize passt. Im nächsten Zyklus wird ein anderes Nukleotid hinzugefügt und die DNA-Polymerase setzt ihre Arbeit fort, wenn dieses Nukleotid an den neu synthetisierten DNA-Strang passt (Metzker M, 2005). Hier wurden anfangs pro Durchlauf etwa 20 Mb in kurzen DNA-Sequenzen von 100 bis 200 Basenpaaren analysiert (Metzker M, 2005; Pillai S et al., 2017). Durch verschiedene Verbesserungen konnte die bis 2013 weltweit am meisten verwendete kommerzielle Plattform (*454 Life Sciences platform*® von Roche Applied Sciences) in einem zehn Stunden dauernden Lauf 700 Mb in Abschnitten mit einer Länge von 700 Basenpaaren sequenzieren (Pillai S et al., 2017). Die Pyrosequenzierung ist aber noch immer teuer und es entstehen zudem recht viele Fehler. Somit ist sie insbesondere ge-

eignet, kleinere bereits bekannte *SNP*-Loci zu überprüfen, aber deutlich schlechter zur Sequenzierung ganzer Genome einzusetzen (Metzker M, 2005).

Die anderen beiden kommerziell erhältlichen Plattformen des NGS sind sehr unterschiedlich. Die *Illumina*® (*Illumina/solexa genome analyser*®, 2006, San Diego, California) hat eine „*sequencing by synthesis*“-Methode mit fluoreszenzbasierter Sequenzerkennung und reversibler Synthesebeendigung über abspaltbare protektive Gruppen an den Nukleotiden. Sie überzeugt insbesondere durch die geringen Kosten von etwa 0,02 US-Dollar für die Analyse von 1 Megabase (Pillai S et al., 2017).

Das *SOLiD*®-System (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*, 2007, Applied biosystems/life technologies, Waltham, Massachusetts) fügt immer eine von 16 verschiedenen Dinukleotidkombinationen, fluoreszenzmarkiert mit vier unterschiedlichen Farben, an den wachsenden DNA-Strang an. Durch Verwendung der Dinukleotide wird jede Base des zu analysierenden DNA-Stranges zweimal geprüft und so kann dieses Dinukleotid-Kodierschema als einziges verfügbares System einerseits zwischen Sequenzierungsfehlern und Sequenzvariationen unterscheiden (Morozova O and Marra M, 2008) und andererseits eine Sequenzierungsgenauigkeit von mehr als 99,85% bei jedoch hohen Kosten erreichen (Pillai S et al., 2017).

Seit dem Jahr 2014 ist die dritte Generation an Sequenzierungssystemen (***Third generation sequencing, TGS***) auf dem Markt. Der entscheidende Vorteil der Drittgenerations-Verfahren ist die direkte Sequenzierung von einzelnen Nukleinsäuremolekülen ohne vorherige Amplifikationsschritte, was die Kosten weiter senken wird.

MinION® (2014, Oxford Nanopore Technologies (ONT), Oxford Science Park, Oxford) ist die erste kommerziell erhältliche Sequenzierungsmethode auf dem Prinzip der Nanopor-Technologie (Pillai S et al., 2017). Die DNA-Basen werden analysiert über Messung der Leitfähigkeitsänderung (Änderung der elektrischen Leitfähigkeit) während der DNA-Strang eine nanoskopische biologische Pore passiert. Durch die große Länge der analysierten DNA-Sequenzen bietet die Nanopor-Technologie eine noch nie dagewesene Genauigkeit und ein hohes Auflösungsvermögen bei der *de novo*-Sequenzierung sowie bei der Erkennung struktureller Aberrationen (Magi A et al, 2017). Wegen der Transportfähigkeit, der verhältnismäßig geringen Kosten und der Geschwindigkeit scheint dieses System sogar für *real-time*-Anwendungen in der täglichen Diagnostik mit limitierter Probenmenge geeignet (Lu H et al, 2016). Das *MinION*® -System von der Größe eines USB-Sticks sequenziert in sechs Stunden über 150 Millionen Basenpaare (150 Mb) zu einem Preis von 900 US-Dollar (*MinION*®, <http://newatlas.com/minion-disposable-dna-sequencer/21513/>Zugriff am: 10.08.2017).

Somit kann mit dieser Methode aktuell ein gesamtes menschliches Genom mit einer Größe von 3,27 Milliarden Basenpaaren (3,27 Gb) für einen Preis von unter 20.000 US-Dollar komplett sequenziert werden. Mit anderen Technologien sind die Kosten einer kompletten Humangenom-Sequenzierung (*WGS = whole genome sequencing*) bzw. eines Krebsgenoms bereits auf etwa 5000 US-Dollar gesunken (Nakagawa H, 2013).

Weil sich die Sequenzierungsmethoden und deren Anwendungsmöglichkeiten während der vergangenen zehn Jahre so rasant weiterentwickelt haben und nun in der westlichen Welt flächendeckend verfügbar und finanziell erschwinglich geworden sind, sieht die Prostatakrebsforschung natürlich anders aus als zur Zeit unserer Versuche. Nur noch selten erscheinen Daten zu genetischen Veränderungen im Prostatakarzinom, die mithilfe der *ArrayCGH* erhoben wurden (Poniah P et al., 2017). Erst vor 2 Jahren allerdings wählte eine Arbeitsgruppe, die sich mit der Bedeutung von *IL1RA* beim Magenkarzinom beschäftigte, den exakt gleichen Versuchsaufbau wie wir (konventionelle CGH versus *Array-CGH*, Bestätigung der Ergebnisse über *BAC-FISH* und Quantifizierung über *qRT-PCR*; Calcagno D et al., 2016). Die erste komplette Sequenzierung eines PCa-Genoms wurde erst im Jahr 2011 veröffentlicht (Berger M et al., 2011).

8.1.4 Quantifizierung der Genkopienzahl durch *Real-Time-Genoscopy-PCR (qRT-PCR)*

Seit Entwicklung des Grundprinzips der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kary Mullis im Jahr 1983 (Mullis K and Faloona F, 1987) ist diese Methode zu einer unverzichtbaren Technik der Biologie und Molekularbiologie geworden (Mülhardt C, 2006, „Der Experimentator“, S. 80). Die von uns gewählte *TaqMan*[®]-Methode mit Hydrolysesonden ist das bekannteste sondenbasierte *Real-Time-PCR*-Nachweisverfahren (Whitman D and Dunbar S, 2008). Im Gegensatz zur Technik der Hybridisierungssonden muss an die DNA-Zielsequenz nur eine einzige Sonde binden, welche den *Reporterfarbstoff* am 5'-Ende und den *Quencher* am 3'-Ende trägt. Die *TaqMan*[®]-*Real-Time-PCR* arbeitet äußerst schnell und präzise, ist kostengünstig und bietet einen sensitiven und quantitativen DNA-Nachweis ohne Notwendigkeit einer anschließenden Gel-Elektrophorese (Suzuki N et al., 2005). Suzuki sieht die Überlegenheit der *TaqMan*[®]-Methode aufgrund ihrer Schnelligkeit und einfachen Handhabung besonders in der dringlichen Diagnostik von gefährlichen bakteriellen Infektionen wie z.B. Meningitis, Sepsis oder ansteckenden Atemwegserkrankungen (Suzuki N et al., 2005). Auch andere Autoren halten die gut etablierte *TaqMan*[®]-Methode unter allen sondenbasierten Detektionssystemen für die beste Wahl (Wong M and Medrano J, 2005).

8.1.5 Effizienzen der verwendeten PCR-Primer

Für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten wir kommerzielle, sehr gut validierte *Primer* der Firma *Applied Biosystems*. Diese *Primer* arbeiten mit einer hohen Effizienz ohne nennenswerte Schwankungen. Zur Kontrolle haben wir die *Primer*-Effizienzen über verschiedene Verdünnungsstufen einer bekannten Ausgangs-DNA ermittelt. Die C_T -Werte beim Einsatz von 80 ng DNA lagen außerhalb des linearen Bereichs und wurden daher zur Berechnung der *Primereffizienz* nicht berücksichtigt. Als ursächlich für dieses Ergebnis sehen wir am ehesten sterische Gründe. Bei der hohen Konzentration von 80 ng DNA in 2 μ l Flüssigkeit (40 ng/ μ l) ist es sehr wahrscheinlich, dass die „sperrigen“ DNA-Moleküle sich gegenseitig in ihrer Bewegungsfreiheit einschränken und womöglich auch die *Primer* hindern, an den richtigen Stellen zu binden. Auch kommt es bei einer großen Menge von DNA-Molekülen pro Volumeneinheit häufiger vor, dass bereits aufgetrennte DNA in Einzelsträngen sich wieder mit einem anderen Einzelstrang zusammenlagert und nicht wie gewünscht ein neuer DNA-Strang synthetisiert wird. Dies könnten Erklärungen für die eher niedrige PCR-Effizienz bei der hohen DNA-Ausgangskonzentration sein.

Die ermittelten *Primereffizienzen* waren erwartungsgemäß gut und lagen sehr nahe am Idealwert 2. Sie sind vergleichbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Ohl F, 2006, S. 34f und S. 38; Rawer D, 2005, S. 94-96).

8.2 Diskussion der beiden Kontrollgene *TOP2B* und *ALDH1B1*

In den qRT-PCRs kamen zwei verschiedene Kontrollgene neben unseren Zielgenen *DCTN3* und *IL11RA* zum Einsatz. Das erste Kontrollgen *TOP2B* liegt auf Chromosom 3p24.2 und kodiert für das Enzym Topoisomerase 2 β (beta) (Jenkins J et al., 1992). Topoisomerasen gibt es in den Zellkernen aller eukaryotischen Zellen. Diese Enzyme verändern durch transiente Doppelstrangbrüche die Tertiärstruktur der DNA (Wang J, 1985). Während die α -Isoform (Topoisomerase 2 α) hauptsächlich im Nukleoplasma lokalisiert ist, findet man die für uns relevante β -Isoform vor allem im Nukleolus (Negri C et al., 1992; Zini N et al., 1992), was auf eine Bedeutung bei der Transkription ribosomaler DNA schließen lässt (Jenkins J et al., 1992).

Das Gen *ALDH1B1* kodiert für den Subtyp B1 der Aldehyddehydrogenase 1 und ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 auf der Bande 9p11.1 lokalisiert. Es ist ebenso unter dem Namen mitochondriale *ALDHX* bekannt (NCBI, gene ID 219). Aufgabe dieser ganzen Enzymgruppe ist die Oxidation von Aldehyden, die meisten *ALDH*-Isoenzyme gibt es in den Leberzellen (zytosolisch oder mitochondrial). In der Metabolisierung von Alkohol katalysie-

ren die Aldehyddehydrogenasen wichtige Reaktionen zur Entgiftung von toxischen Abbauprodukten. So baut beispielsweise die *ALDH2* das giftige Acetaldehyd zum ungefährlichen Acetat ab (Hsu L and Chang W, 1991).

In früheren Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe hatte sich *TOP2B* bereits als verlässliches, in Prostatakarzinomen unverändertes Kontrollgen erwiesen. Beide Geschlechter haben im Gesunden gleiche Kopienzahlen dieses Gens (Kindich R et al., 2005). Auch in unseren Versuchen unterschieden sich die Kopienzahlen dieses Gens in allen malignen DNA-Proben (Tumorzelllinien und primäre Prostatakarzinome) nicht von den Kopienzahlen in normalem Blut. Wir schlussfolgerten daraus, dass *TOP2B* in Prostatakarzinomen zumindest numerisch nicht oder nur unwesentlich verändert sein kann und aufgrund dieser Stabilität als Kontrollgen in CGH-Versuchen gut geeignet ist.

Das Gen *ALDH1B1* sollte in unseren Versuchen auf Kopienstabilität in Prostatakarzinomen und somit auf Tauglichkeit als Kontrollgen untersucht werden. Da unsere beiden Zielgene ebenfalls auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 liegen, wurde es als zweites Kontrollgen in allen PCR-Läufen mitgeführt, um gegebenenfalls eine 9p-Mutation gegenüber einer Veränderung eines einzelnen Gens auf dem kurzen Arm abzugrenzen.

Die PCR-Ergebnisse für *ALDH1B1* waren aufgrund ihrer Heterogenität jedoch schwierig zu werten, selbst innerhalb der Normalproben. Die Normalwerte von *ALDH1B1*, normiert auf das validierte Gen *TOP2B*, lagen im Toleranzintervall von 1,34 bis 3,69. Dies bedeutet, dass reguläre Kopienzahlen dieses Gens in gesunden Zellen sowohl unter 3 als auch über 7 liegen können. Sinnvolle Aussagen über die Kopienzahlen in malignen Geweben waren kaum möglich. Es ist aufgrund seiner Kopienzahlvarianz als Kontrollgen somit nicht geeignet. In der gegenüberstellenden Auswertung der Daten mit den beiden unterschiedlichen Kontrollgenen ergab sich für beide Zielgene eine Übereinstimmung von 65% der Werte.

Seit Abschluss unserer Arbeiten wurden über beide Gene neue Erkenntnisse gewonnen, die teils im Einklang mit unseren Ergebnissen stehen, teils unsere Daten infrage stellen.

Ucar et al. postulierten im Jahr 2009 eine Bedeutung des Gens *ALDH1B1* in der Entstehung von Lungenkrebs (Ucar D et al., 2009) und im Jahr 2011 wurde es von Chen sogar als potenzieller Biomarker für das menschliche Kolonkarzinom identifiziert (Chen Y et al., 2011). Chen und seine Mitarbeiter hatten mit immunhistochemischen Färbungen gezeigt, dass *ALDH1B1* in 98% der von ihnen untersuchten humanen Kolonkarzinomgeweben stark überexprimiert wurde, nicht jedoch in gesundem Kolongewebe (Chen Y et al., 2011). Auch die Adenokarzinome anderer Organe zeigten in ihren Experimenten häufig eine höhere Expression von *ALDH1B1* als die entsprechenden Normalgewebe (Lunge 77%, Ovar 85%, Brust

61%). Da das Gen *ALDH1B1* in verschiedenen Geweben offenbar starke Veränderungen während der malignen Transformation erfährt und sogar potenzieller Tumormarker für das Kolonkarzinom sein könnte, scheint es als Kontrollgen ungeeignet. Die Ergebnisse von Chen et al. sowie unsere eigenen Ergebnisse lassen vermuten, dass *ALDH1B1* auch in der Entstehung des Prostatakarzinoms (ebenfalls ein Adenokarzinom) zahlreiche, jedoch wahrscheinlich inconstante Veränderungen erfährt und seine Kopienzahl hochreguliert sein könnte.

Im Kontrast zu unseren stabilen Ergebnissen für das Gen *TOP2B* stehen die Daten von Haffner (Haffner M et al., 2010) und Kolar (Kolar Z et al., 2014). 2010 zeigte Haffner, dass Androgene eine gemeinsame Rekrutierung des Androgenrezeptors und der Topoisomerase 2 β (*TOP2B*) zu den genomischen Bruchstellen im *TMPRSS2*- sowie *ERG*-Gen bewirken und dass die zur Bildung des *TMPRSS2-ERG*-Fusionsgens führenden DNA-Doppelstrangbrüche direkt durch *TOP2B* vermittelt werden, sogar ohne zusätzlichen extrinsischen genotoxischen Stress (Haffner M et al., 2010). Kolar folgerte 2014 aus seinen Ergebnissen, dass die gleichzeitige Untersuchung der *TMPRSS2-ERG*-Umordnung mit den Expressionen des Androgenrezeptors sowie der Gene *TOP2B* und *ERG* in Relation zum klinischen und pathologischen Tumorstadium in Zukunft helfen werden, das vorliegende PCa besser zu charakterisieren (Kolar Z et al., 2014). Diese Erkenntnisse stellen unsere Verwendung von *TOP2B* als Kontrollgen in den PCR-Versuchen primär infrage. Es ist aber durchaus möglich, dass die Kopienzahl des Gens *TOP2B* trotz direkter Mitwirkung des Enzyms bei den DNA-Doppelstrangbrüchen in der Prostatakarzinogenese unverändert bleibt. Das Protein könnte auch erst während der Transkription überexprimiert werden oder die Proteinfunktion könnte durch epigenetische Modifikationen verändert werden ohne Änderungen auf DNA-Ebene.

8.3 Aktuelle Prostatakrebsforschung

Im Vergleich zu gesunden Organzellen finden sich in Tumorzellen des gleichen Gewebes meist verschiedene genetische Veränderungen. Das Genom von Prostatakarzinomen weist im Vergleich zu anderen soliden Tumoren, wie z.B. Bronchial- oder Mammakarzinom, allerdings nur wenige genetische Aberrationen (Chromosomengewinne oder -verluste) und insgesamt eine niedrige Mutationsrate mit ungefähr einer Mutation pro Megabase auf (Barbieri C et al., 2013; Hartmann A et al., 2014). Generell müssen Keimbahnmutationen, die dann in allen Zellen vorkommen und weitervererbt werden, von somatischen Veränderungen, die erst in differenzierten Zellen entstehen, unterschieden werden (Berg K, 2016). Im Wesentlichen führen alle genetischen Veränderungen letztlich zur Aktivierung eines Oncogens oder zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens (Berg K, 2016).

Mittlerweile sind viele verschiedene wiederkehrende Aberrationen in Prostatakarzinomen gefunden worden. Für die meisten Veränderungen weiß man aber bisher nicht, ob sie Auslöser der Karzinogenese sind oder sich während der Tumorentstehung ereignen. Außerdem konnten nur wenige dieser Genom-Varianten eindeutig mit klinischen Eigenschaften oder bisher gebräuchlichen Prognoseparametern korreliert werden, sodass ihre Bedeutung bisher noch nicht ganz klar ist.

Vereinzelt werden neue genetische Veränderungen als prognostische Marker (zur frühen Unterscheidung zwischen aggressiv und indolent verlaufenden Tumoren) oder prädiktive Marker (zur Identifizierung der Patienten, die von einer adjuvanten Hormon- und/ oder Chemotherapie profitieren, evtl. nach kurativ intendierter Primärtherapie) vorgeschlagen. Bisher fehlen aber meist noch valide prospektive Daten an größeren Patientenkollektiven, um ihren Nutzen sicher bewerten zu können.

In etwa der Hälfte aller Prostatakarzinome finden sich durch Chromosomenumordnungen erzeugte Genfusionen, die am ehesten durch eine mangelhafte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen (Berg K, 2016; Haffner M et al., 2010).

Die bei weitem am häufigsten gefundene genetische Veränderung in Prostatakarzinomen ist die Fusion des Gens der androgengesteuerten Serinprotease *TMPRSS2* mit dem Gen des Transkriptionsfaktors *ERG* durch eine Translokation (Hartmann A et al., 2014). Die Fusion koppelt den hochaktiven Promoter des *TMPRSS2*-Gens „mit dem in der Prostata normalerweise inaktiven *ERG*-Gen“ (Hartmann A et al., 2014). Die Folge ist eine massive Expression des nun aktivierten Oncogens *ERG*.

Bereits im Jahr 1999 beschrieben Lin et al. eine androgenvermittelte vermehrte Expression des auf Chromosom 21q gelegenen Gens der Serinprotease *TMPRSS2* in normalen Basalzellen der Prostata sowie in Adenokarzinomzellen, jedoch nicht in luminalen Zellen (Lin B et al., 1999). Das Gen kodiert ein Protein mit 492 Aminosäuren und fünf verschiedenen Domänen, darunter eine transmembranäre Region, was eine Lokalisation an der Zelloberfläche vermuten lässt (Lin B et al., 1999). Im Jahr 2005 fand Tomlins in mehr als der Hälfte der von ihm untersuchten PCa-Geweben (57%) eine Fusion von einem untranslatierten Genbereich des *TMPRSS2*-Gens (am 5'-Ende) mit einem Mitglied aus der Familie der *ETS* (*erythroblast transformation specific*) -Transkriptionsfaktoren (am 3'-Ende), vor allem mit einem der beiden Gene *ERG* (Chromosom 21q22.3) und *ETVI* (Chromosom 7p21.2) (Tomlins S et al., 2005). Im gleichen Jahr war *ERG* bereits als das in Prostatakarzinomen am häufigsten überexprimierte Oncogen beschrieben worden (Petrovics G et al., 2005). In PIN (prostatistische intraepitheliale Neoplasie) und benignem Drüsengewebe hatte man jedoch keine vermehrte

ERG-Expression gefunden. Die Gruppe der *ETS*-Transkriptionsfaktoren umfasst 28 verschiedene Gene, *ERG* wurde im Jahr 1987 entdeckt (Adamo P and Ladomery M, 2016; Reddy E et al., 1987). Aus genetischen Untersuchungen vor allem des Ewing-Sarkoms mit rekurrenten Translokationen unter Beteiligung von *ETS*-Transkriptionsfaktoren weiß man um die funktionelle Redundanz dieser spezifischen genetischen Veränderungen (Tomlins S et al., 2005). In weiteren Untersuchungen bestätigte sich Tomlins initiale Hypothese, dass jeder Prostatatumor immer nur ein Oncogen aus der *ETS*-Familie überexprimiert (Tomlins S et al., 2008 a) und dass die *TMPRSS2-ERG*-Genfusion unter allen Translokationen in Prostatakarzinomen am häufigsten (in etwa der Hälfte der untersuchten Tumoren) gefunden wird (Tomlins S et al., 2008 a). Mittlerweile wurde klar, dass diese Fusion alleine die Karzinogenese nicht erklärt, sondern vorher bereits andere Schäden auf molekularer Ebene vorliegen müssen. Die zur Fusion führende Translokation findet jedoch wahrscheinlich schon früh während der Transformation von der Krebsvorstufe *high grade*-PIN zum Adenokarzinom statt (Tomlins S et al., 2008 a).

Da Prostatakarzinome mit und ohne *TMPRSS2-ETS*-Genfusion verschiedenen genomischen, epigenetischen sowie Genexpressions-Studien zufolge womöglich unterschiedliche biologische Entitäten darstellen (Berger M et al., 2011; Rubin M et al., 2011), wird aktuell bereits eine Unterscheidung in *TMPRSS2*-positive (bzw. *ETS*-positive) und *TMPRSS2*-negative (bzw. *ETS*-negative) PCas propagiert (Berg K, 2016; Attard G et al., 2016). Obwohl die Studienergebnisse nicht ganz eindeutig sind, gibt es Hinweise, dass diese beiden unterschiedlichen Entitäten auch unterschiedliche klinische Verläufe nehmen. Der Nachweis dieser Genfusion bei Patienten in der „*active surveillance*“ scheint mit einer schlechten Prognose zu korrelieren und somit einen gewissen prognostischen Wert zu haben (Berg K, 2016; Barbieri C and Tomlins S, 2015). Dahingegen scheint der *ETS*-Fusions-Status keine eindeutigen Hinweise für den weiteren Krankheitsverlauf nach einer radikalen Prostatektomie zu liefern (keine Verwendungsmöglichkeit als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf einen Androgenentzug) (Berg K, 2016). Eine aktuelle Übersichtsarbeit beurteilt die Ergebnisse insgesamt als zu heterogen, um eine Verwendung als prognostischen Biomarker empfehlen zu können (Smits M et al., 2017).

Verschiedene Untersuchungen konnten belegen, dass die immunhistochemische Untersuchung eines Gewebes nach dem *ERG*-Gen verlässlich das Vorliegen der *TMPRSS2-ERG*-Genfusion anzeigt und zu mehr als 99,9% spezifisch ist für Prostatakrebs (Attard G et al., 2016). Die Immunhistochemie ist ein deutlich günstigeres und schnelleres Verfahren als eine FISH (Berg K, 2016) und somit von übergeordnetem diagnostischem Interesse. Sie kann ins-

besondere die Diagnostik atypischer Fälle oder von Metastasen mit unbekanntem Ursprung unterstützen (Attard G et al., 2016).

Ausgehend von der Einteilung in *ETS*-positive und *ETS*-negative Prostatatumoren konnte man verschiedene genetische Veränderungen nachweisen, die exklusiv in *ETS*-negativen Tumoren vorkommen.

So zeigen etwa 5-15% der PCas eine Mutation im *SPOP*-Gen, welches für eine Substratbindende Einheit einer Cullin-basierten E3-Ubiquitin-Ligase kodiert (Barbieri C and Tomlins S, 2015). Mutationen im *SPOP*-Gen sind die am häufigsten zu findende Punktmutation in Prostatakarzinomen (Barbieri C and Tomlins S, 2015) und ein Hauptgrund für eine ineffiziente Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Smits M et al., 2017). Dadurch kommt es zu einer genomischen Instabilität mit multiplen Kopienzahlveränderungen (Gewinnen und Verlusten) in somatischen Zellen, was beim Prostatakarzinom als unabhängiger Risikofaktor für aggressives Wachstum gilt (Smits M et al., 2017). *SPOP*-Mutationen sind überdurchschnittlich häufig mit einer somatischen Deletion im 5q21-Locus assoziiert. Das in diesem Bereich gelegene *CHD1*-Gen (*Chromodomain-Helicase-DNA-binding*) ist in insgesamt 10-25% der PCas entweder mutiert oder sogar homozygot deletiert (Barbieri C and Tomlins S, 2015). Es besteht ein Zusammenhang zwischen einer *CHD1*-Deletion und einer schlechteren Prognose (Rodrigues L et al., 2015).

Weitere knapp 10% der *ETS*-negativen Prostatatumoren zeigen eine Überexpression des *SPINK1*-Gens (serine protease inhibitor) (Attard G et al., 2016), was mit aggressivem Wachstumsverhalten und einem höheren Risiko für ein PSA-Rezidiv nach kurativer Therapie assoziiert ist (Tomlins S et al., 2008 b). Die Effekte des Oncogens *SPINK1* sind wahrscheinlich teilweise durch eine Interaktion mit *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) verursacht. Dies könnte gegebenenfalls als Ansatzpunkt für eine Therapie mit den bei anderen Tumorarten bereits klinisch etablierten *EGFR*-Inhibitoren genutzt werden (Barbieri C and Tomlins S, 2015). Mutationen in den drei genannten Genen *SPOP*, *CHD1* und *SPINK1* treten üblicherweise gemeinsam auf (Attard G et al., 2016) und schließen gleichzeitige Mutationen der beiden Tumorsuppressorgene *TP53* und *PTEN* aus (Barbieri C et al., 2012, Attard G et al., 2016).

Auch die insgesamt seltenen Genfusionen oder aktivierenden Mutationen von *RAF*, *RAS* und Mitgliedern der *FGF*-Rezeptoren (*fibroblast growth factor receptors*) finden sich ausschließlich in *ETS*-negativen PCas (Attard G et al., 2016). Die dadurch bedingte Hochregulierung des *MAP-Kinase*-Stoffwechselweges (*MAPK-pathway*, *MAP mitogen-activated protein*), eine Reihe mehrstufiger Signaltransduktionswege, die an der Regulation der Embryogenese, der

Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltodes beteiligt sind (Santarpia L et al., 2012), steigert die Aktivität des Androgenrezeptors (Barbieri C and Tomlins S, 2015).

Der Verlust oder die Mutation (mit Funktionsverlust) des Tumorsuppressorgens *TP53* auf Chromosom 17p13.1 ist eine der häufigsten somatischen Mutationen in der Entstehung von Krebserkrankungen allgemein (Barbieri C and Tomlins S, 2015). Das entsprechende Protein hat vielfältige Aufgaben in der Stabilisierung des Kerngenoms sowie in der Unterdrückung der Krebsentstehung durch seine antiproliferativen Eigenschaften, wenn die Zelle durch DNA-Schaden, Hypoxie oder andere Faktoren in Stress gerät (Alvarez-Cubero M et al., 2017). Diese *TP53*-Mutationen ebenso wie Verluste beziehungsweise Mutationen des *PTEN*-Tumorsuppressorgens gehören zu den häufigsten somatischen Mutationen in Prostatatumoren (Attard G et al., 2016). Beide können sowohl in *ETS*-positiven als auch *ETS*-negativen Prostatakarzinomen auftreten, sind jedoch öfter in *ETS*-positiven PCas zu finden (Barbieri C et al., 2012; Attard G et al., 2016). Wie bereits erwähnt, sind die Gene *TP53/PTEN* und *SPOP/CHD1/SPINK1* für gewöhnlich nicht gleichzeitig verändert (Attard G et al., 2016).

Der Tumorsuppressor *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*) ist ein multifunktionelles Enzym in Eukaryoten und reguliert normalerweise die Aktivität des *PI3K/AKT*-Signalweges herab. Durch Deletionen im *PTEN*-Locus (Chromosom 10q23) oder Mutationen mit Funktionsverlust des Gens wird der *PI3K/AKT*-Signalweg konstitutiv aktiviert. Der *PTEN*-Verlust findet sich in etwa 15% aller Prostatatumore (Smits M et al., 2017) und war in verschiedenen Studien eindeutig mit einer erhöhten krankheitsspezifischen Sterblichkeit und schlechterer Prognose verbunden (Hartmann A et al., 2014). Tumore, die gleichzeitig negativ für *PTEN* und für *ERG* waren, hatten in einer Studie ein signifikant höheres Risiko für eine rasche Metastasierung (Smits M et al., 2017; Ahearn T et al., 2016).

Ein alleiniger Gewinn des Oncogens *MYC* auf Chromosom 8q24 (etwa 8% der PCas), aber insbesondere eine Kombination aus den beiden Veränderungen (*MYC*-Gewinn und *PTEN*-Verlust) korreliert ebenfalls signifikant mit einer schlechteren Prognose (Liu W et al., 2013).

In den Jahren 2011 bis 2013 wurden zwei besondere genetische Phänomene mit komplexer Chromosomenumgruppierung nach zufälligen multiplen Brüchen von Gensegmenten entdeckt. Beide sind wahrscheinlich wichtige treibende Kräfte in der Tumorentstehung (Baca S et al., 2013). Obwohl *Chromothripsis* und *Chromoplexie/Chromoplexy* gewisse Ähnlichkeiten aufweisen, konnten doch auch relevante Unterschiede herausgefunden werden. So kommt es bei der relativ seltenen *Chromothripsis* (Chromosomenzertrümmerung), ausgelöst durch ein einmaliges für die Zelle katastrophales Ereignis (z.B. radioaktive Strahlung), zu mehreren

Hundert Bruchstellen und Umlagerungen in normalerweise nur ein bis zwei Chromosomen. Diese Bruchstellen werden mit Deletionen, Duplikationen, Inversionen oder Translokationen im Anschluss wieder verschmolzen (Stephens P et al., 2011). Die entstandenen Veränderungen werden durch Zellteilung weitervererbt und haben typischerweise einen Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen zur Folge. Schätzungen zufolge ist ein solches Ereignis ursächlich für etwa zwei bis drei Prozent aller Krebserkrankungen (Kim T-M et al., 2013).

Bei der in Prostatakarzinomen durchaus regelmäßig und eventuell auch mehrfach hintereinander auftretenden *Chromoplexie/ Chromoplexy* entstehen deutlich weniger Bruchstellen (unter Hundert) in dafür aber vielen Chromosomen (Baca S et al., 2013; Forment J et al., 2012). Dadurch kommt es vermutlich gleichzeitig zu mehreren krebsauslösenden Ereignissen. Brüche im Tumorsuppressorgen *PTEN* und die Fusion der beiden Gene *TMPRSS2* und *ERG* in Prostatakarzinomen werden nach heutigem Kenntnisstand durch *Chromoplexie/ Chromoplexy* verursacht (Shen M, 2013).

In der Studie von Baca et al. (Baca S et al., 2013) fanden sich Hinweise auf zwei unterschiedliche molekulare PCa-Subtypen mit auch unterschiedlichen chromosomalen Neuordnungen. So sahen sie in *ETS*-positiven, *CHD1*-Wildtyp-Tumoren vorwiegend interchromosomale Umgruppierungen zwischen vielen Chromosomen mit Bruchstellen nahe beziehungsweise innerhalb hochexprimierter Regionen, eher verursacht durch das genetische Phänomen der *Chromoplexie/ Chromoplexy*. In *ETS*-negativen, *CHD1*-deletierten Tumoren waren die Veränderungen am ehesten durch *Chromothripsis* entstanden, lagen überwiegend innerhalb einiger weniger Chromosomen und betrafen vor allem Bereiche mit wenig oder gering repliziertem Heterochromatin (Baca S et al., 2013).

Neuere Forschungsansätze auf der Suche nach prognostischen oder prädiktiven Biomarkern für das Prostatakarzinom beschäftigen sich mit *microRNAs* (*miRNAs*), deren Gene schätzungsweise etwa ein Drittel der protein-kodierenden Gene regulieren (Bartel D, 2004). Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass Veränderungen im physiologischen Gleichgewicht der *miRNAs* mit verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes, Alzheimer-Demenz und Atherosklerose in Zusammenhang stehen (Schubert M et al., 2016) und zudem besondere Bedeutung in der Kontrolle von krebsauslösenden Stoffwechselwegen besitzen (Schubert M et al., 2016; Cho W, 2010). Als Biomarker sind vor allem die *miRNAs* interessant, die vom Zytoplasma in extrazelluläre Kompartimente sezerniert werden und damit in Körperflüssigkeiten nachweisbar sind (Schubert M et al., 2016). Laut verschiedener Publikationen korrelieren insbesondere erhöhte Serum-/Plasma-Spiegel von *miR-141* und *miR-375* mit metastasierter oder kastrationsresistenter Erkrankung und sind somit die vielversprechendsten prognostischen *miRNA*-

Marker zur Erkennung eines PSA-Rezidivs (*BCR = biochemical relapse*) (Schubert M et al., 2016).

In der Untersuchung von genetischen Varianten bei Hochrisikogruppen wie Patienten mit familiärem Prostatakrebs (mindestens ein Verwandter ersten Grades mit Prostatakrebs; Ishak M and Giri V, 2011) oder hereditärem Prostatakrebs (Familie mit drei betroffenen Generationen oder drei betroffene Verwandte ersten Grades oder zwei betroffene Verwandte mit Erkrankung vor dem 55. Lebensjahr; Ishak M and Giri V, 2011) wurden bisher einige seltene, aber Hochrisiko-Mutationen identifiziert. Das *homeobox gene HOXB13* scheint eine definitive Prädisposition für die Entwicklung eines Prostata Tumors zu bedeuten (Ewing C et al., 2012). Seltene Keimbahnmutationen wie zum Beispiel im *BRCA2*-Gen erhöhen das Risiko gegenüber einer Vergleichsgruppe um den Faktor 5 bis 7 (Thompson D et al., 2001) und korrelieren zudem mit einem höheren Gleason-Score (Mitra A et al., 2008) sowie einer schlechteren Prognose (Castro E et al., 2013, XX). Diese beiden genetischen Veränderungen und einige andere (z.B. in den Genen *BRCA1*, *CHEK2* oder *NBS1*) zeichnen für etwa 5% der familiären PCa-Fälle verantwortlich (Attard G et al., 2016). Weitere 30% werden verursacht durch häufig auftretende Niedrig-Risiko-Konstellationen wie Veränderungen in einem oder mehreren der mittlerweile mehr als 100 in *genome-wide association studies (GWAS)* identifizierten und mit Prostatakrebs assoziierten *SNP*-Loci (Al Olama A et al., 2014; Eeles R et al., 2014). Die erste in den *GWAS* nachgewiesene, eindeutig mit Prostatakrebs in Verbindung stehende Region, war die nichtkodierende Region 8q24 in unmittelbarer Nachbarschaft zum Onkogen *c-MYC* (Freedman M et al., 2011). Etwa 65% der familiären Prostata-Krebsfälle sind nach heutigem Kenntnisstand noch nicht zu erklären (Attard G et al., 2016).

8.4 Diskussion meiner Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext

Mit der höherauflösenden *ArrayCGH* konnten wir erwartungsgemäß die meisten der zuvor mit konventioneller *CGH* gefundenen Genveränderungen bestätigen. Zusätzlich konnten wir einige Alterationen identifizieren, die mit der chromosomalen *CGH* nicht gefunden worden waren. Die Arbeitsgruppe von Wolf hatte im Jahr 2004 im Vergleich der beiden *CGH*-Methoden sehr ähnliche Beobachtungen gemacht (Wolf M et al., 2004).

Im Vergleich der beiden Methoden zeigten unsere Ergebnisse, dass kleine deletierte Bereiche mit der chromosomalen *CGH* oft nicht detektiert wurden, während große Kopienzahlveränderungen, die oftmals einen ganzen Chromosomenarm betrafen, wiederum in der *ArrayCGH* nicht erkannt wurden. So waren in früheren Chromosomen-*CGH*-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in den Sublinien zahlreiche große Veränderungen im Vergleich mit

den Ursprungszelllinien aufgefallen (Lensch R et al., 2002). In unseren aktuellen *ArrayCGH*-Daten fanden sich jedoch kaum Veränderungen dieser Art (Kamradt J et al., 2007). Saramäki hatte dies im Jahr 2006 (Saramäki O et al., 2006) bereits genauso beschrieben. Seine Beobachtungen bestätigten unsere Daten. Die *ArrayCGH* scheint für die Detektion sehr großer Veränderungen eine geringere Sensitivität zu haben als die konventionelle CGH (Saramäki O et al., 2006; Kamradt J et al., 2007).

Die von uns in der *ArrayCGH* gefundenen Veränderungen in den Tumorzelllinien *PC3*, *DUI45*, *LNCaP* und *CWR22-RV1* wurden durch die damals vorhandene Literatur im Wesentlichen bestätigt (Wolf M et al., 2004; Saramäki O et al., 2006; Clark J et al., 2003; Zhao H et al., 2005; Nupponen N et al., 1998; Paris P et al., 2003; van Dekken H et al., 2004; Hermans K et al., 2004; Yano S et al., 2004).

Die Längen der veränderten Bereiche in Tumorzelllinie und korrespondierender Tochterzelllinie differierten zum Teil ein wenig zwischen den beiden untersuchten Methoden. Generell konnten die Begrenzungen von schon bekannten Amplifikationen mit der *ArrayCGH* (mit einer Auflösung unter 1 Mb) sehr genau bestimmt und die Länge einiger Veränderungen dadurch sogar eingegrenzt werden.

Im Vergleich der cCGH- und oCGH-Ergebnisse der Xenograft-Zelllinien *CWR22* und *CWR22-RV1* fiel uns insbesondere ein neuer Gengewinn in der Nähe des Zentromers auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (Bande 9p13.3) auf. Diese Amplifikation war nur in der Oligonukleotid-CGH, nicht jedoch in der chromosomalen CGH detektiert worden.

Auch Saramäki et al. hatten im Jahr 2006 mit cDNA-basierter *ArrayCGH* eine Amplifikation dieser Region in der Xenograft-Prostatakarzinomzelllinie *LuCaP35* gefunden (Saramäki O et al., 2006), während ihnen diese Region in vorhergehenden Untersuchungen mit konventioneller Chromosomen-CGH noch nicht aufgefallen war. Die Größe der amplifizierten Region konnten wir von 3,1 Mb (Saramäki O et al., 2006) mit unseren Oligonukleotid-CGH-Daten auf eine Länge von 1,7 Megabasenpaaren eingrenzen (Kamradt J et al., 2007). Die geringe Größe von weniger als 2 Mb zeigt deutlich die hohe Auflösung der *ArrayCGH* und beweist, dass die Oligonukleotid-basierte *aCGH* der cDNA-basierten Untersuchung in der Auflösung überlegen ist.

Drei andere Arbeitsgruppen hatten zuvor bereits eine Amplifikation dieser Region 9p13 in der Prostatakarzinom-Zelllinie *DUI45* nachgewiesen, jedoch nicht weitergehend untersucht. Nupponen fand die Amplifikation der Region 9p13 mit der konventionellen chromosomalen CGH (Nupponen N et al., 1998), während die Arbeitsgruppen von Clark und Zhao den Gengewinn in dieser Region in der *ArrayCGH* entdeckten (Clark J et al., 2003; Zhao H et al.,

2005). In den *ArrayCGH*-Untersuchungen von Wolf war die Chromosomenregion 9p13 jedoch in keiner der untersuchten PCa-Zelllinien (*PC3*, *DUI45*, *LNCaP* und *22-RV1*) durch einen Gengewinn aufgefallen.

Wegen dieser differierenden Ergebnisse wollten wir die Amplifikation in der Chromosomenbande 9p13.3 visuell bestätigen. Der *BAC* RP11-165H19 kodiert für den amplifizierten Genbereich auf der Bande 9p13.3. In einer FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) mit einer Sonde für den *BAC* sowie einer Sonde für das Zentromer von Chromosom 9 fand ich eine deutliche Signalanhebung der *BAC*-Sonde in den *CWR22*- und *CWR22-RV1*-Zellen gegenüber der Kontrollprobe (gesunde Zellen). Dies bestätigte unsere *CGH*-Daten. Saramäki hatte in einer FISH-Untersuchung mit dem gleichen *BAC* (RP11-165H19) eine etwa fünffache Amplifikation (mindestens zehn Signale) gegenüber der Normalprobe beschrieben (Saramäki O et al., 2006).

In der Region 9p13.3 gab es laut Saramäki drei Gene, die einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhter Kopienzahl im Genom und Überexpression des betreffenden Genes zeigten (Saramäki O et al., 2006).

Das Gen *UBE2R2* (Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2R2) gehört zur CDC34-Familie (Semplici F et al., 2002) und kodiert für eines von mehreren E2-Isoenzymen, welche im zweiten Schritt der Ubiquitinierung („hierarchisch geordnete Reaktionskette“ aus drei verschiedenen Gruppen „von Ubiquitin aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen“, Enenkel C, 2005, S. 5) benötigt werden.

Die Funktion des Gens *WDR40A* (*WD repeat domain 40A*) war im Jahr 2006 noch unbekannt (Saramäki O et al., 2006). Das Genprodukt ist ein Protein mit einer sich wiederholenden Sequenz aus etwa 40 Aminosäuren, die mit einem Tryptophan-Asparaginsäure-Dipeptid endet. Im Jahr 2008 beschrieb eine japanische Arbeitsgruppe (Li S et al., 2008) das Protein *WDR40A* unter dem Namen *TCC52* als Zentrosomenprotein und Tumor-Hoden-Antigen (*cancer-testis antigen*) mit Lokalisation auf Chromosom 9p13.3. In gesundem Gewebe wird es nur sehr gering exprimiert. In maligne entarteten Zellen wie verschiedenen Tumorzelllinien (untersucht wurde auch die PCa-Zelllinie *PC3*) sowie Lungentumorgewebe wird *TCC52* stark exprimiert. In Serumproben von Patienten mit Prostatakarzinom konnte ein spezifischer Antikörper gegen dieses Protein in knapp 60% (59,4%, 69/116) der Fälle nachgewiesen werden (Li S et al., 2008).

Als drittes Gen auf dieser Chromosomenbande beschrieb Saramäki das Dynactin 3-Gen *DCTN3*, welches für die Untereinheit 3 von Dynactin kodiert (Karki S et al., 1998). Dynactin ist ein großmolekularer Komplex aus zehn verschiedenen Untereinheiten mit vielfältigen int-

razellulären Funktionen. Die dritte ist mit einem Molekulargewicht von 22 kDa die kleinste der zehn Untereinheiten. Für intrazelluläre Transportprozesse (Transport von Lysosomen und Endosomen, Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat) bindet das Dynactinmolekül gleichzeitig an Mikrotubuli und an zytoplasmatisches Dynein. Zudem ist Dynactin an der Spindelformation während Mitose und Meiose, an der Bildung von Axonen an Nervenzellen sowie an der Zellstabilisierung beteiligt (Karki S et al., 1998; Mills D and Jackson C, 2001).

Uns fiel jedoch auf, dass der verwendete *BAC* RP11-165H19 außer der genetischen Information für das Gen *DCTN3* auch das benachbarte Gen *IL11RA* enthielt. Dieses Gen kodiert für die membranständige α -Untereinheit des Interleukin 11-Rezeptors (IL11R α). Die zweite Komponente des Rezeptors ist das Glykoprotein gp 130.

Da wir die DNA-Vermehrung in der Region 9p13.3 in zwei PCa-Zelllinien durch die *BAC*-FISH-Analyse bestätigt hatten, wollten wir herausfinden, ob nur bei einem der beiden benachbarten Gene *DCTN3* und *IL11RA* die Kopienzahl erhöht ist oder ob beide Gene in gleichem Maße amplifiziert sind.

In einer quantitativen *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) verglich ich die Kopienzahlen der Gene *IL11RA* und *DCTN3* in den relevanten Tumorzelllinien. In den Zelllinien *CWR22*, *CWR22-RV1*, *DUI45_{HOM}* und *DUI45-MN1* fanden sich die höchsten Kopienzahlen für *IL11RA*, alle deutlich über den Normalwerten gelegen. *DCTN3* wies hingegen in keiner der untersuchten PCa-Tumorzelllinien signifikante Gewinne auf.

Zur Bestätigung unserer Annahme, dass *IL11RA* alleine das relevante Zielgen der amplifizierten Region sei, untersuchte ich in weiteren qRT-PCR-Läufen zwanzig primäre Prostatakarzinomproben auf Kopienzahlgewinne der Gene *IL11RA* und *DCTN3*.

Die Ergebnisse waren sehr eindeutig. Bei 75% der Tumoren fand sich ein alleiniger Kopienzahlgewinn des Gens *IL11RA* und in 10% der Proben lagen beide Gene *IL11RA* und *DCTN3* in vermehrter Kopienzahl vor. In keiner einzigen untersuchten Tumorprobe fand ich das Gen *DCTN3* alleine vermehrt. Der mittlere Kopienzahlgewinn bei *IL11RA* überstieg den Normalwert um das Zwei- bis Dreifache.

Somit konnte ich *IL11RA* eindeutig als das Zielgen der amplifizierten Region 9p13.3 identifizieren. Eine positive Korrelation zwischen erhöhten *IL11RA*-Werten in den Prostatakarzinomproben und den zugehörigen Patientendaten gelang jedoch weder hinsichtlich der Gleason-Scores noch bezüglich des Tumorstadiums.

8.5 IL11-Rezeptor α und JAK-STAT-pathway

Interleukin 11 (IL-11) gehört wie Interleukin 6 (IL-6), *Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)*, *Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)*, Oncostatin M (OSM) und Cardiotrophin (CT-1) zur Gruppe der Interleukin 6- ähnlichen Zytokine („*IL-6-type cytokines*“) (Kishimoto T et al., 1995). Zytokine sind körpereigene Botenstoffe (interzelluläre Mediatoren), die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren. Interleukine sind eine auf die Immunzellen (v.a. Leukozyten) wirkende Untergruppe der Zytokine. Ihre Wirkung entfalten die Zytokine meist autokrin oder parakrin, seltener endokrin über den Blutweg an spezifischen Zelloberflächenrezeptoren ihrer Zielzellen (vgl. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, W de Gruyter-Verlag; Heinrich P et al., 1998). Eine besondere Eigenschaft von Zytokinen ist, dass diese einerseits an verschiedenen Zielzellen unterschiedliche Reaktionen bewirken (Pleiotropismus). Andererseits können verschiedene Zytokine an einer bestimmten Zelle die gleiche Antwort hervorrufen (Redundanz) (Kishimoto T et al., 1995; Heinrich P et al., 1998).

Die Gruppe der „*IL-6-type cytokines*“ reguliert über die gemeinsame membranständige Rezeptoruntereinheit gp 130 zur Signaltransduktion eine Vielzahl komplexer Zellprozesse wie Proliferation, Differenzierung und Genaktivierung (Heinrich P et al., 1998). Die weiteren Komponenten des jeweiligen Rezeptorkomplexes sind spezifisch für jedes einzelne der genannten Zytokine. Glykoprotein 130-Moleküle werden in Zellen aus sämtlichen Organen exprimiert, auch unabhängig der spezifischen Rezeptorhälfte für die „*IL-6-type cytokines*“ (Saito M et al., 1992). Sie haben somit sicherlich noch weitere unerforschte Funktionen.

Die für IL-11 spezifische Rezeptorkomponente ist eine langkettige α -Helix, der IL-11-Rezeptor α (IL11R α), kodiert durch unser Zielgen *IL11RA*. Sobald IL-11 an seinen spezifischen IL11R α bindet, induziert es eine Verknüpfung der α -Helix mit zwei gp 130-Molekülen zu einem Rezeptorkomplex, aber die weitere Signalübertragung übernimmt allein gp 130. Die α -Helix ist an der intrazellulären Signaltransduktionskaskade nicht beteiligt und kann funktionell durch ihre lösliche Form (*soluble IL11R α = \underline{s} IL11R α*) ersetzt werden (Heinrich P et al., 1998). Zahlreiche Publikationen konnten zeigen, dass die lösliche Form der IL-11- α -Rezeptoruntereinheit ohne membranständige und zytoplasmatische Anteile (*\underline{s} IL11R α*) nach Bindung von IL-11 das gleiche Signal in gp 130-exprimierenden Zellen auslöst wie bei regulärer Bindung von IL-11 an die membranständige α -Rezeptoruntereinheit (Taga T et al., 1989; Mackiewicz A et al., 1992; Karow J et al., 1996; Neddermann P et al., 1996; Curtis D et al., 1997).

Interleukin 11 aktiviert nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor die gleiche intrazelluläre Signaltransduktionskaskade wie alle „Zytokine vom IL-6-Typ“, den *JAK/STAT-pathway* (Janus-Kinase-Signaltransduktions- und Transkriptionsaktivierungsweg). IL-11 kann zusätzlich aber auch den *PI3K/AKT*-Signalweg oder den *MAPK*-Stoffwechselweg aktivieren (Onnis B et al., 2013), beide teils auch an der Prostatakarzinogenese beteiligt (Smits M et al., 2017; Santarpia L et al., 2012). Der Signaltransduktions- und Stoffwechselweg über Interleukin 11/IL11R α ist in die Regulation von zahlreichen biologischen Vorgängen involviert, wie z.B. in die Synthese von Fettsäuren, Osteoklasten und Nervenzellen sowie in die Megakaryozytenreifung und Thrombozytenproduktion (Calcagno D et al., 2016; Schwertschlag U et al., 1999; Teramura M et al. 1996).

Nach Bindung von IL-11 an IL11R α wird ein Dimer aus zwei gp 130-Molekülen gebildet, das im Zytoplasma verschiedene *JAKs* (Janus-Kinasen), v.a. *JAK1* und *JAK2*, aktiviert (Kishimoto T et al., 1995). Diese Janus-Kinasen wiederum aktivieren spezielle *STAT*-Proteine (Signal Transducers and Activators of Transcription), v.a. *STAT3* und *STAT1*. Die aktivierten *STAT*-Proteine formen Dimere und werden vorübergehend in den Zellkern transloziert (Heinrich P et al., 1998; Turkson J and Jove R, 2000), wo sie die Transkription bestimmter Zielgene (z.B. CRP oder gp 130) stimulieren oder hemmen (Heinrich P et al., 1998).

STAT-Proteine werden, mit Ausnahme von *STAT4*, ubiquitär in allen Zellen exprimiert, ihre Aktivität wird hauptsächlich durch posttranslationale Modifizierung reguliert. Da sie in einzelligen Organismen einschließlich der Hefen komplett fehlen, sind die *STATs* in der Evolution wahrscheinlich erst während der Entwicklung mehrzelliger Organismen entstanden (Heinrich P et al., 1998). In gesunden menschlichen und tierischen Zellen werden *STAT*-Proteine (Signaltransduktions- und Transkriptionsaktivierungs-Proteine) immer wieder ligandenabhängig durch Tyrosinphosphorylierung vorübergehend für einige Minuten bis Stunden aktiviert. Vor allem die Proteine *STAT1*, *STAT3* und *STAT5* sind jedoch in vielen Tumorzelllinien und Tumoren aufgrund einer Regulationsstörung von Wachstumsfaktoren dauerhaft aktiviert. In Tumorzelllinien von Prostata, Brust, Ovar und weiteren Entitäten wurde vorwiegend eine vermehrte Aktivität von *STAT3* nachgewiesen (Lavecchia A et al., 2011).

Über die Bedeutung fast aller an diesem Signaltransduktionsweg beteiligten Moleküle (IL-11, IL11R α , aktivierte *STAT*-Proteine) bei verschiedenen Neoplasien wurde bereits intensiv geforscht.

Campbell und Zurita hatten einige Jahre vor unseren Ergebnissen eine Co-Expression von Interleukin 11 und dem zugehörigen membranständigen α -Rezeptor (IL11R α) in normalem Prostata- sowie in maligne entartetem Prostatagewebe (Zelllinien *DUI45*, *PC3* und *LNCaP*,

high-grade PIN und invasive PCas) beschrieben (Campbell C et al., 2001; Zurita A et al., 2004). Beide Arbeitsgruppen hatten eine Hochregulation des Rezeptors während der malignen Transformation postuliert, aber erst Zurita et al. sahen einen klaren Zusammenhang zwischen der Expression des Interleukin 11- α -Rezeptors in Prostatakarzinomen und steigenden Gleason-Scores sowie höherem Tumorstadium (Zurita A et al., 2004). Im Jahr 2005 fand eine Arbeitsgruppe zwar keinen Unterschied in der Höhe der IL-11-Serumlevel zwischen Männern mit BPH und Männern mit Prostatakarzinom, aber Patienten mit einem kastrationsresistenten PCa wiesen deutlich höhere IL-11-Serumwerte auf als solche mit einem unbehandelten Tumor (Furuya Y et al., 2005).

Verschiedene Untersuchungen der vergangenen Jahre konnten die Bedeutung von *IL11RA* in der Entstehung einiger anderer Tumore wie z.B. beim kolorektalen Karzinom (Yamazumi K et al., 2006), beim Urothelkarzinom (Palmer J et al., 2005) oder beim Magenkarzinom (Calcagno D et al., 2016), insbesondere aber beim Mammakarzinom zeigen (Irawan C et al., 2016; Hanavadi S et al., 2006). Zudem ist der IL-11-Rezeptor α insbesondere in primären Knochentumoren wie dem Osteosarkom (Liu T et al., 2015), aber auch in Knochenmetastasen von verschiedenen soliden Tumoren (z.B. Prostatakarzinom) und in diversen Zelllinien von Leukämie, Lymphomen und Myelomen hochexprimiert (Karjalainen K et al., 2015). Auch die für das Hodgkin-Lymphom pathognomonischen Hodgkin- und Reed-Sternbergzellen zeigen eine massive Überexpression des Interleukin-11-alpha-Rezeptors (Karube K et al., 2006). Lewis zeigte in immunhistochemischen Versuchen, dass IL11R α vor allem in den Endothelzellen kleiner Blutgefäße im Tumor und in Metastasen exprimiert wird, nicht jedoch in großen Tumorgefäßen oder in gesundem Kontrollgewebe (Lewis V et al., 2014).

Onnis konnte in 50-60% der von ihr untersuchten PC3-Zellen einen funktionellen IL-11-Rezeptor α nachweisen, denn die Zugabe von rekombinantem IL-11 zu PC3-Zellen führte zu einer raschen Phosphorylierung von *STAT1*, nicht jedoch von *STAT3* (Onnis B et al., 2013). Durch direkte Unterdrückung der IL-11-Expression gelang eine ausgeprägte Hemmung des *in vivo*-Wachstums von Prostatakarzinomzellen. Sie beschrieben sowohl den Rezeptor IL11R α als auch den Liganden IL-11 der IL-11/ IL11R α -Signalkaskade als geeigneten Ansatzpunkt für eine spezifische Therapie (Onnis B et al., 2013).

Nach immunhistochemischen Vorarbeiten an IL11R α -exprimierenden Osteosarkom-Zelllinien (Lewis V et al., 2009), gelang Pasqualini im Jahr 2015 erstmals eine gezielt gegen den IL-11-Rezeptor α gerichtete Pharmakotherapie bei sechs Patienten mit in die Knochen metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakarzinom (Pasqualini R et al., 2015). Sie ver-

knüpften ein kurzes Oligopeptid, welches gezielt an den IL11R α im Tumorgefäß-Endothel bindet, mit einer Apoptose-induzierenden Aminosäuresequenz (Pasqualini R et al., 2015). Bei allen Patienten, die mit dem synthetisch hergestellten, gegen den IL11R α gerichteten, Liganden behandelt wurden, zeigte sich eine Anreicherung der Substanz in den Knochenmetastasen und eine gleichzeitige Tumorapoptose bei nur geringen oder mittelgradigen Nebenwirkungen (insbesondere Nephrotoxizität mit Serum-Kreatininanstieg) (Pasqualini R et al., 2015). In vorherigen Versuchen an Nacktmäusen hatte sich bei allen Tieren eine fast vollständige Unterdrückung des Tumorwachstums gezeigt (Pasqualini R et al., 2015).

Das gleiche synthetische Peptid gegen IL11R α hatten sie zuvor bereits erfolgreich an verschiedenen Leukämie-, Lymphom- und Myelom-Zelllinien einsetzen können und hatten trotz nur geringer Peptid-Konzentrationen einen Zelluntergang von fast 90% der Leukämiezellen innerhalb einer Nacht erzielt (Karjalainen K et al., 2015).

Eine zielgerichtete Bindung von IL11R α über ein synthetisches Apoptose-induzierendes Molekül scheint ein geeigneter Ansatzpunkt in der Therapie verschiedener Neoplasien wie Osteosarkomen (Lewis V et al., 2014), Leukämien (Karjalainen K et al., 2015) und auch von in die Knochen metastasierten Prostatakarzinomen zu sein (Pasqualini R et al., 2015).

Aber auch ein späterer Eingriff in die Signaltransduktionskaskade aus IL-11/ IL11R α und *JAK/STAT-pathway* erst bei den *STAT*-Proteinen erreicht eine Hemmung des Wachstums maligner Prostatazellen. Bereits im Jahr 2000 hatte eine amerikanische Arbeitsgruppe die konstitutive Aktivierung des *STAT3*-Moleküls in den Prostatakarzinomzelllinien *LNCaP*, *PC3* und *DUI45* zeigen können (Lou W et al., 2000; Ni Z et al., 2000). Die direkte Blockade von aktiviertem *STAT3* unterdrückte das *in vitro*-Tumorzell-Wachstum signifikant (Ni Z et al., 2000). Andere Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse bestätigen (Barton B et al., 2004; Turkson J and Jove R, 2000) und bezeichneten *STAT3* als „*cancer-causing factor*“ mit intrinsischem onkogenem Potenzial (Turkson J and Jove R, 2000). Gao konnte durch *Down-Regulation* der *STAT3*-Expression einen Rückgang des *in vivo*-PCa-Wachstums in Nacktmäusen erreichen (Gao L et al., 2005).

Mora zeigte nicht nur, dass die konstitutive *STAT3*-Aktivierung in gesundem Prostatagewebe fehlt, sondern auch, dass höhermaligne kastrationsresistente Zelllinien wie *PC3* und *DUI45* signifikant höhere Werte von aktiviertem *STAT3* aufweisen als die niedrigmalignen hormonsensitiven *LNCaP*-Zellen (Mora L et al., 2002). Die höheren Level von aktiviertem *STAT3* korrelierten in nativen Prostatakarzinomproben signifikant mit höheren Gleason-Scores ≥ 7 (Mora L et al., 2002). Dauerhaft aktivierte *STAT3*-Moleküle induzieren durch Hochregulation von *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*) die Tumorangio-genese (Turkson J, 2004) und

spielen eine Rolle bei der androgenunabhängigen Aktivierung des Androgenrezeptors als Ursache für kastrationsrefraktäres aggressives Wachstum von Prostatakarzinomen (Chen T et al., 2000; Tam L et al., 2007; Edwards J and Bartlett J, 2005).

Interleukin 11 ist nach Bindung an seinen spezifischen α -Rezeptor IL11R α über Aktivierung des *JAK/STAT-pathway* offensichtlich mitverantwortlich für eine *STAT*-Aktivierung in der Zelle. Insbesondere aktiviertes *STAT3* ist in den Kernen maligne entarteter Zellen von verschiedenen Geweben überproportional häufiger zu finden als in gesunden Zellen.

Der aktivierte *JAK/STAT*-Stoffwechselweg, aber auch die Signalübertragungswege *PI3K/AKT* sowie *MAPK* spielen in der Entstehung von Prostatakarzinomen eine zentrale Rolle. Die Blockade des *JAK/STAT*-Stoffwechselweges entweder weit hinten auf Höhe der *STAT*-Proteine oder bereits vorher im Bereich des IL11R α oder gar beim Ligand IL-11 bewirkte je nach Versuchsaufbau einen Rückgang im *in vitro*- bzw. *in vivo*-Tumorstadium von malignen Prostatazellen (Ni Z et al., 2000; Turkson J and Jove R, 2000; Barton B et al., 2004; Gao L et al., 2005; Onnis B et al., 2013; Pasqualini R et al., 2015).

Eine Hochregulation von Interleukin 11 zusammen mit seinem spezifischen α -Rezeptor scheint eine relevante Bedeutung entweder in der Entstehung von Prostatakarzinomen oder beim Wandel vom hormonsensitiven zum kastrationresistenten Wachstum zu haben. Dafür spricht auch, dass eine dauerhafte, das heißt konstitutive, *STAT3*-Aktivierung ausschließlich in der Karzinomzelle, nicht aber in gesunden Prostatazellen zu finden ist.

Wir zeigten in unseren Versuchen eine eindeutige Hochregulation des Gens *IL11RA* in maligne entarteten Prostatazellen (verschiedene Prostatakarzinomzelllinien sowie native Prostatakarzinome aus Operationspräparaten). Eine vermehrte Expression des spezifischen IL11R α in den von uns untersuchten malignen Zellen ist sehr wahrscheinlich und vor dem Hintergrund der zitierten Literatur muss ebenso eine vermehrte *STAT*-Aktivierung (wahrscheinlich *STAT1* oder *STAT3*) vermutet werden.

Initial hatten wir die Idee und Hoffnung, dass die gefundene Hochregulation des Gens *IL11RA* einen Nutzen in der prognostischen Einteilung zwischen indolenten und aggressiven Tumoren oder aber in der primären Tumordiagnostik in Ergänzung des bereits etablierten, aber wenig spezifischen PSA-Wertes erlangen könnte.

Die weitergehende Forschung anderer Arbeitsgruppen, sicher bestärkt durch entsprechende Vorarbeiten wie unsere und ähnliche (Kamradt J et al., 2007; Campbell C et al., 2001; Zurita A et al., 2004), identifizierte das Produkt des hochregulierten *IL11RA*-Gens jedoch bald als möglichen Angriffspunkt einer gezielten Pharmakotherapie (Onnis B et al., 2013; Karjalainen K et al., 2015; Lewis V et al., 2009).

Es ist insbesondere beeindruckend, dass es einer Arbeitsgruppe bereits gelang, ein synthetisches Polypeptid zu generieren, welches spezifisch den in verschiedenen Neoplasien hochregulierten Interleukin-11-alpha-Rezeptor bindet. Durch ein angehängtes Apoptose-Motiv induziert es dann hochselektiv den Zelltod der entsprechenden Zellen. Dies wurde an Zellkulturen von Leukämie-Zellen (Karjalainen K et al., 2015) und Osteosarkom-Zelllinien (Lewis V et al., 2009) ebenso erfolgreich gezeigt wie an einem Nacktmausmodell für das Prostatakarzinom (Pasqualini R et al., 2015). Die erste Untersuchung an sechs Männern mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom und osteoplastischen Knochenmetastasen (Phase-0-Studie, Pasqualini R et al., 2015) bestätigte alle vorherigen Ergebnisse bezüglich der selektiven Bindung des synthetischen Peptids an den Rezeptor $IL11R\alpha$ und der nachfolgenden Apoptose der malignen Prostatazellen. Die zielgerichtete Therapie wurde von den Patienten insgesamt gut und mit relativ geringen Nebenwirkungen vertragen. Dies lässt hoffen, dass weitere Studien an einem größeren Patientenkollektiv mit metastasiertem PCa folgen werden und sich $IL11R\alpha$ als geeigneter Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Tumorthherapie auch gegen andere Therapieansätze beweisen und etablieren wird.

Rückblickend haben wir für unsere Versuche Methoden verwendet, die heute bereits teilweise veraltet sind. Dennoch konnten wir signifikante Ergebnisse erzielen und das Gen *IL11RA* als alleiniges Zielgen der im Prostatakarzinom amplifizierten Genregion 9p13.3 identifizieren und gegenüber dem Gen *DCTN3* abgrenzen.

Zusammenfassend waren unsere Arbeiten ein kleines, aber notwendiges Teilchen in den Vorarbeiten zur Entwicklung einer zielgerichteten Therapie gegen das metastasierte Prostatakarzinom, welche sich in ersten Untersuchungen an Patienten als überaus erfolgsversprechende, da wirksame und zugleich nebenwirkungsarme Therapieoption gezeigt hat.

9 Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua dest., destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ALU	ALU-Sequenzen sind repetitive DNA-Sequenzen im Genom von Primaten, siehe Kapitel 6.4.3.1
BAC	bacterial artificial chromosome, siehe Kapitel 6.2.2
BCR	biochemical relapse, PSA-Rezidiv
bp	Basenpaare
BPH	benigne Prostatahyperplasie
CGH	comparative genomische Hybridisierung
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DCTN3	Bezeichnung des Gens für Dynactin 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetales Kälberserum (Nährlösung für Zellkulturen)
FFPE	Formalin-fixed Paraffin-embedded = formalinfixiert und in Paraffin eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, siehe Kapitel 6.4.4.1.2
h	Stunde
IL-11	Interleukin 11
IL11R α	α -Untereinheit des Interleukin 11-Rezeptors
IL11RA	Bezeichnung des Gens für den spezifischen α -Rezeptor von Interleukin 11
IL-6	Interleukin 6
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar (mol/l)
μ l	Mikroliter
Mb	Megabasen
Mbp	Megabasenpaare
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mmol/l)

ng	Nanogramm
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHI	Prostate Health Index $PHI = (2pPSA/fPSA) \times \sqrt{PSA}$ (2pPSA = pro PSA, fPSA = freies PSA)
PIN	prostatic intraepithelial neoplasia high-grade PIN: direkte Prostatakrebsvorstufe, hochgradig verdächtig
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
rcf	relative centrifugal force = relative Zentrifugalbeschleunigung, Angabe als Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung g ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$) $rcf = \frac{4\pi^2}{g} \times r \times n^2 \approx 0,00001118 \times R \times N^2$ (r = Abstand des Körpers von der Drehachse; n = Drehzahl; R = Radius in Zentimetern; N = Drehzahl in rpm)
rpm	roads per minute, Umdrehungen pro Minute
sek	Sekunde
SNP	single nucleotide polymorphism, siehe Kapitel 6.4.4.1.2
Tab.	Tabelle
TRUS	transrektaler Ultraschall
TUR-P	transurethrale Resektion der Prostata

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Histologische Malignitätskriterien des Prostatakarzinoms nach Gleason (Gleason-Grade 1 bis 5), Berechnung des Gleason-Scores von 2 bis 10 durch Addition der Gleason-Grades des größten und des zweitgrößten Tumorareals

Abb. 2: Altersspezifische Erkrankungsdaten, ICD-10 C61 (Prostatakarzinom), Deutschland 2011 – 2012, je 100.000 (Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016)

Abb. 3: Prinzip der Multiple Displacement Amplification (modifiziert nach Schock G et al., 2005)

Abb. 4: Schema einer Intra-ALU-PCR (modifiziert nach Walker J et al., 2003)

Abb. 5: Schema einer Inter-ALU-PCR (modifiziert nach Walker J et al., 2003)

Abb. 6: Prinzip des fluorescence resonance energy transfer (FRET) nach Förster (modifiziert nach Mülhardt C, Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics, S. 106)

Abb. 7: TaqMan®-Nachweismethode (modifiziert nach Mülhardt C, Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics, S. 107)

Abb. 8: Prinzip der konventionellen vergleichenden genomischen Hybridisierung (modifiziert nach Kleine A, S. 36)

Abb. 9: Prinzip der ArrayCGH (Davies J et al., 2005)

Abb. 10: Vergleich der Ergebnisse aus cCGH (A, C) und aCGH (B, D) am Chromosom 9 der Zelllinie CWR22 sowie am Chromosom 14 der Zelllinie DU145-MN1 (Kamradt J et al., 2007)

Abb. 11: Nachweis einer DNA Kopienzahlvermehrung in der Region 9p13.3 mittels FISH-Analyse an den Zelllinien CWR22 (A) und CWR22-RV1 (B) (Kamradt J et al., 2007)

Abb. 12: Standardkurven der verwendeten Primer mit Darstellung der Bestgeraden und der Funktionsgleichungen

Abb. 13: Vergleich der Effizienzen der Zielgene mit dem Referenzgen TOP2B mit Darstellung der Bestgeraden

Abb. 14: Kopienzahlen des Gens IL11RA in den untersuchten Tumorzelllinien und Prostatakarzinomen

Abb. 15: Kopienzahlen des Gens DCTN3 in den untersuchten Tumorzelllinien und Prostatakarzinomen

Abb. 16: Kopienzahlen der beiden Zielgene DCTN3 und IL11RA im direkten Vergleich

Tabelle 1: Kriterien zur Einteilung von Risikogruppen für die Entwicklung eines Rezidivs beim organbegrenzten Prostatakarzinom

Tabelle 2: 20 Prostata-Gewebeprobe

Tabelle 3: Überblick über die chromosomalen Veränderungen, die entweder nur mit der chromosomalen CGH oder nur mit der ArrayCGH gefunden wurden

11 Literatur

1. Adamo P, Ladomery M (2016) The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. *Oncogene* 35: 403-414.
2. Ahearn T et al. (2016) A Prospective Investigation of PTEN Loss and ERG Expression in Lethal Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 108: djv346.
3. Al Olama A et al. (2014) A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat Genet* 46: 1103-1109.
4. Albertson D et al. (2003) Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34: 369–376.
5. Altshuler D et al. (2005) A haplotype map of the human genome. The International HapMap Consortium. *Nature* 437: 1299-1320.
6. Alvarez-Cubero M et al. (2017) Somatic Mutations in Prostate Cancer: Closer to Personalized Medicine. *Mol Diagn Ther* 21: 167-178.
7. Anderson S et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465.
8. Andriole G et al. (2012) Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst* 104: 125–132.
9. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, atlasgeneticsoncology.org, Beschreibungen der untersuchten Gene.
10. Attard G et al. (2016) Prostate cancer. *Lancet* 387: 70-82.
11. Baca S et al. (2013) Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes. *Cell* 153: 666–677.
12. Barbieri C et al. (2012) Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet* 44: 685-689.
13. Barbieri C et al. (2013) The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol* 64: 567-576.
14. Barbieri C, Tomlins S (2015) Reprint of: The prostate cancer genome: Perspectives and potential. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 33: 95–102.
15. Barry M (2009) Screening for Prostate Cancer — The Controversy That Refuses to Die. *N Engl J Med* 360: 1351-1354.
16. Bartel D (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
17. Barton B et al. (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther* 3: 11-20.

18. Berg K (2016) The prognostic and predictive value of TMPRSS2-ERG gene fusion and ERG protein expression in prostate cancer biopsies. *Dan Med J* 63: B5319.
19. Berger M et al. (2011) The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 470: 214–220.
20. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile (Zugriff am: 12.07.2017).
21. Bex A et al. (2001) Comparison of the malignant phenotype and genotype of the human androgen-independent cell line DU 145 and a subline derived from metastasis after orthotopic implantation in nude mice. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 124: 98–104.
22. Bianchini D et al. (2014) Antitumour activity of enzalutamide (MDV3100) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC) pre-treated with docetaxel and abiraterone. *Eur J Cancer* 50: 78–84.
23. Bussemakers M et al. (1999) DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 59: 5975–5979.
24. Calcagno D et al. (2016) Identification of IL11RA and MELK amplification in gastric cancer by comprehensive genomic profiling of gastric cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 22: 9506–9514.
25. Campbell C et al. (2001) Increased expression of the interleukin-11 receptor and evidence of STAT3 activation in prostate carcinoma. *Am J Pathol* 158: 25–32.
26. Cardullo R et al. (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8790–8794.
27. Castro E et al. (2013) Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J Clin Oncol* 31: 1748–1757.
28. Catalona W et al. (2011) A multicenter study of [-2] pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J Urol* 185: 1650–1655.
29. Chen T et al. (2000) Interleukin 6 Activates Androgen Receptor-mediated Gene Expression through a Signal Transducer and Activator of Transcription 3-dependent Pathway in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 60: 2132–2135.
30. Chen Y et al. (1997) Ratio-based decisions and the quantitative analysis of cDNA microarray images. *J Biomed Optics* 2: 364–374.
31. Chen Y et al. (2011) Aldehyde dehydrogenase 1B1 (ALDH1B1) is a potential biomarker for human colon cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405: 173–179.
32. Cho W (2010) MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 1273–1281.

33. Clark J et al. (2003) Genome-wide screening for complete genetic loss in prostate cancer by comparative hybridization onto cDNA microArrays. *Oncogene* 22: 1247-1252.
34. Collins F et al. (2003) A vision for the future of genomics research. *Nature* 422: 835–847.
35. Curtis D et al. (1997) Recombinant Soluble Interleukin-11 (IL-11) Receptor α -Chain Can Act as an IL-11 Antagonist. *Blood* 90: 4403-4412.
36. Davies J et al. (2005) Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Res.* 13: 237-248.
37. de Bono J et al. (2011) Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* 364: 1995-2005.
38. Dean F et al. (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci* 99: 5261-5266.
39. Draisma G et al. (2003) Lead times and overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 868–878.
40. Dunning A et al. (1988) Errors in the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 16: 10393.
41. Edwards J, Bartlett J (2005) The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor Androgen-receptor cofactors and bypass pathways. *BJU Int* 95: 1320–1326.
42. Eeles R et al. (2014) The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol* 11: 18–31.
43. Enenkel C (ed) (2005) Nukleärer Import und Biogenese des 26S Proteasoms in Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Habilitation, Berlin, S. 5.
44. Ewing C et al. (2012) Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med* 366: 141–149.
45. Ferrís-i-Tortajada J et al. (2011) Non-dietary environmental risk factors in prostate cancer *Actas Urol Esp* 35: 289–295.
46. Filella X, Foj L (2016) Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. *Int J Mol Sci* 17: 1784.
47. Forment J et al. (2012) Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat Rev Cancer* 12: 663-670.
48. Förster V (1948) Zwischenmolekulare Energie-Wanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics (Leipzig)* 2: 55-75.
49. Freedman M et al. (2011) Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. *Nat Genet* 43: 513–518.
50. Furuya Y et al. (2005) Serum interleukin-11 in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Int Urol Nephrol* 37: 69-71.

51. Gao L et al. (2005) Down-regulation of signal transducer and activator of transcription 3 expression using vector-based small interfering RNAs suppresses growth of human prostate tumor in vivo. *Clin Cancer Res* 11: 6333–6341.
52. Gentleman R et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5: R80.
53. Gleason D (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50: 125-128.
54. Gleason D, Mellinger G (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 11: 58-64.
55. Goffeau A et al. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563–567.
56. Gudmundsson J et al. (2010) Genetic correction of PSA values using sequence variants associated with PSA levels. *Sci Transl Med* 2: 62ra92.
57. Haffner M et al. (2010) Androgen-induced TOP2B mediated double strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nat Genet* 42: 668–675.
58. Hanavadi S et al. (2006) Expression of interleukin 11 and its receptor and their prognostic value in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* 13:802-808.
59. Hartmann A et al. (2014) Prognostische und prädiktive molekulare Marker urologischer Tumoren. *Urologe* 53: 491–500.
60. Heinrich P et al. (1998) Review article: Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334: 297-314.
61. Hendriks J et al. (2016) Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 00: 1–8.
62. Hermans K et al. (2004) Loss of a small region around the PTEN locus is a major chromosome 10 alteration in prostate cancer xenografts and cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 171–184.
63. Herr A (ed) (2005) Hochauflösende CGH mit Hilfe von DNS-Mikrorastern, Dissertation, Berlin, S. 19.
64. Higuchi R et al. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10: 413-417.
65. Higuchi R et al. (1993) Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11: 1026-1030.
66. Horoszewicz J et al. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research* 43: 1809-1818.
67. Hosono S et al. (2003) Unbiased Whole-Genome Amplification Directly from Clinical Samples. *Genome Research* 13: 954-964.
68. Hsu L, Chang W (1991) Cloning and Characterization of a New Functional Human Aldehyde Dehydrogenase Gene. *J Biol Chem* 266: 12267-12265.

69. Human Genome Project: Nationales Genomforschungsnetz http://www.ngfn.de/de/verstehen_der_menschlichen_erbsubstanz.html.
70. Hupé P et al. (2004). Analysis of Array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions. *Bioinformatics* 20: 3413–3422.
71. Hyman E (1988) A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* 174: 423-436.
72. Irawan C et al. (2016) Expression of Biomarkers CXCR4, IL11-RA, TFF1, MLF1P in Advanced Breast Cancer Patients with Bone Metastatic: a Diagnostic Study. *Acta Med Indones* 48: 261-268.
73. Ishak M, Giri V (2011) A systematic review of replication studies of prostate cancer susceptibility genetic variants in high-risk men originally identified from genome-wide association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 1599-1610.
74. Jenkins J et al. (1992) Isolation of cDNA clones encoding the isozyme of human DNA topoisomerase 11 and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res* 20: 5587-5592.
75. Johns L, Houlston R (2003) A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int* 91: 789–794.
76. Jones C et al. (2011) Radiotherapy and short-term androgen deprivation for localized prostate cancer. *N Engl J Med* 365: 107–118.
77. Kaighn M et al. (1979) Establishment of a human prostate cancer cell line (PC-3). *Invest Urol* 17: 16-23.
78. Kallioniemi A et al. (1992) Comparative Genomic Hybridization for molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science* 258: 818-821.
79. Kallioniemi O et al. (1994) Optimizing Comparative Genomic Hybridization for Analysis of DNA Sequence Copy Number Changes in Solid Tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 10: 231-243.
80. Kamradt J (ed) (2011) *Microarray-basierte, molekularbiologische Untersuchungen solider Tumoren unter besonderer Berücksichtigung des Prostatakarzinoms*, Habilitationsschrift, Homburg, S. 6.
81. Kamradt J et al. (2007) Detection of novel amplicons in prostate cancer by comprehensive genomic profiling of prostate cancer cell lines using oligonucleotide-based ArrayCGH. *PLoS ONE* 2: e769.
82. Kantoff P et al. for the IMPACT Study Investigators (2010) Sipuleucel-T Immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363: 411–422.
83. Karjalainen K et al. (2015) Targeting IL11 Receptor in Leukemia and Lymphoma: A Functional Ligand-Directed Study and Hematopathology Analysis of Patient-Derived Specimens. *Clin Cancer Res* 21: 3041-3051.
84. Karki S et al. (1998) Characterization of the p22 subunit of dynactin reveals the localization of cytoplasmic dynein and dynactin to the midbody of dividing cells. *J Cell Biol* 142: 1023-1034.

85. Karow J et al. (1996) Mediation of interleukin-11-dependent biological responses by a soluble form of the interleukin-11 receptor. *Biochem J* 318: 489-495.
86. Karube K et al. (2006) Gene expression profile of cytokines and chemokines in microdissected primary Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells: high expression of interleukin-11 receptor alpha. *Ann Oncol* 17: 110-116.
87. Kenfield S et al. (2011) Smoking and Prostate Cancer Survival and Recurrence. *JAMA* 305: 2548–2555.
88. Kim T-M et al. (2013) Functional Genomic Analysis of Chromosomal Aberrations in a Compendium of 8000 Cancer Genomes. *Genome Res* 23: 217-227.
89. Kindich R et al. (2005) Application of a modified Real-Time PCR technique for relative gene copy number quantification to the determination of the relationship between NKX3.1 loss and MYC gain in prostate cancer. *Clin Chem* 51: 649-652.
90. Kishimoto T et al. (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86: 1243–1254.
91. Kleine A (ed) (2005) Analyse genetischer Aberrationen in testikulären Keimzelltumoren mit Hilfe der Comparativen genomischen Hybridisierung (CGH), Dissertation, Münster, S. 36.
92. Kolar Z et al. (2014) Relation of ETS transcription factor family member ERG, androgen receptor and topoisomerase 2 β expression to TMPRSS2-ERG fusion status in prostate cancer. *Neoplasma* 61: 9-16.
93. Lavecchia A et al. (2011) STAT-3 Inhibitors: State of the Art and New Horizons for Cancer Treatment. *Curr Med Chem* 18: 2359-2375.
94. Lee L et al. (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids Res* 21: 3761-3766.
95. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Konsultationsfassung: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 4.0, 2016, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://leitlinienprogrammmonkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html> (Zugriff am: 31.07.2017)
96. Lensch R et al. (2002) Comprehensive genotypic analysis of human prostate cancer cell lines and sublines derived from metastases after orthotopic implantation in nude mice. *Int J Oncol* 21: 695–706.
97. Lewis V et al. (2009) The interleukin-11 receptor alpha as a candidate ligand-directed target in osteosarcoma: consistent data from cell lines, orthotopic models, and human tumor samples. *Cancer Res* 69: 1995-1999.
98. Lewis V et al. (2014) IL-11R α : a novel target for the treatment of osteosarcoma. *Adv Exp Med Biol* 804: 285-289.

99. Li S et al. (2008) Novel centrosome protein, TCC52, is a cancer-testis antigen. *Cancer Sci* 99: 2274-2279.
100. Lin B et al. (1999) Prostate-localized and Androgen-regulated Expression of the Membrane-bound Serine Protease TMPRSS2. *Cancer Research* 59: 4180–4184.
101. Liu T et al. (2015) Interleukin-11 receptor α is overexpressed in human osteosarcoma, and near-infrared-labeled IL-11R α imaging agent could detect osteosarcoma in mouse tumor xenografts. *Tumour Biol* 36: 2369-2375.
102. Liu W et al. (2013) Genetic markers associated with early cancer-specific mortality following prostatectomy. *Cancer* 119: 2405-2412.
103. Livak K, Schmittgen T (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402–408.
104. Loeb S, Catalona WJ (2014) The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. *Ther Adv Urol* 6: 74–77.
105. Logothetis C, Lin S (2005) Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5:21-28.
106. Loria Y et al. (2013) Antitumour activity of abiraterone acetate against metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel and enzalutamide (MDV3100). *Ann Oncol* 24: 1807–1812.
107. Lou W et al. (2000) Interleukin-6 Induces Prostate Cancer Cell Growth Accompanied by Activation of Stat3 Signaling Pathway. *The Prostate* 42: 239-242.
108. Lu H et al. (2016) Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 14(5): 265-279.
109. Macgregor P, Squire J (2002) Application of MicroArrays to the Analysis of Gene Expression in Cancer. *Clinical Chemistry* 48: 1170-1177.
110. Mackiewicz A et al. (1992) Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J Immunol* 149: 2021-2027.
111. Magi A et al. (2017) Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. *Brief Bioinform*, doi: 10.1093/bib/bbx062.
112. Maxam A, Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560–564.
113. Metzker M (2005) Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Research* 15: 1767–1776.
114. Mills D, Jackson C (2001) Assignment of p22 dynactin light chain (DCTN3) to human chromosome region 9p13 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 92: 166.
115. MinION® (2014, Oxford Nanopore Technologies), <http://newatlas.com/minion-disposable-dna-sequencer/21513> (Zugriff am: 10.08.2017).

116. Mitra A et al. for the IMPACT and EMBRACE Collaborators (2008) Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. *Br J Cancer* 98: 502–507.
117. Mora L et al. (2002) Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 62: 6659-6666.
118. Morozova O, Marra M (2008) Review: Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 92: 255–264.
119. Mühlhardt C (ed) (2006) *Der Experimentator, Molekularbiologie/ Genomics*, 5. Auflage, Elsevier-Verlag.
120. Mullis K, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
121. Nakagawa H (2013) Prostate cancer genomics by high-throughput technologies: genome-wide association study and sequencing analysis. *Endocr Relat Cancer* 20: R171-181.
122. Neddermann P et al. (1996) Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130. *J Biol Chem* 271: 30986-30991.
123. Negri C et al. (1992) Monoclonal antibodies to human DNA topoisomerase I and the two isoforms of DNA topoisomerase II: 170- and 180-kDa isozymes. *Exp Cell Res* 200: 452-459.
124. Nelson J et al. (2002) TempliPhi, ϕ 29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *Biotechniques Supplemental*: 44-47.
125. Ni Z et al. (2000) Inhibition of Constitutively Activated Stat3 Signaling Pathway Suppresses Growth of Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 60: 1225-1228.
126. Noonan K et al. (2013) Clinical activity of abiraterone acetate in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after enzalutamide. *Ann Oncol* 24: 1802–1807.
127. Nupponen N et al. (1998) Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 101: 53-57.
128. Ohl F (ed) (2006) Identifikation und Validierung von endogenen Referenzgenen für Genexpressionsanalysen des Prostata- und Harnblasenkarzinoms mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-RT-PCR, Dissertation, Berlin, S. 34f und S. 38.
129. Onnis B et al. (2013) Autocrine production of IL-11 mediates tumorigenicity in hypoxic cancer cells. *J Clin Invest* 123: 1615–1629.
130. Palmer J et al. (2005) Constitutive activation of gp130 leads to neuroendocrine differentiation in vitro and in vivo. *Prostate* 62: 282-289.

131. Paris P et al. (2003) Highresolution analysis of paraffin-embedded and formalin-fixed prostate tumors using comparative genomic hybridization to genomic microArrays. *Am J Pathol* 162: 763–770.
132. Paris P et al. (2006) Genomic Profiling of Hormone-Naïve Lymph Node Metastases in Patients with Prostate Cancer. *Neoplasia* 8: 1083-1089.
133. Paris P et al. (2007) High Resolution Oligonucleotide CGH Using DNA From Archived Prostate Tissue. *Prostate* 67: 1447-1455.
134. Park P (2008) Experimental design and data analysis for Array comparative genomic hybridization. *Cancer Invest* 26: 923-928.
135. Pasqualini R et al. (2015) Targeting the interleukin-11 receptor α in metastatic prostate cancer: A first-in-man study. *Cancer* 121: 2411-2421.
136. Perez-Cornago A et al. (2017) Tall height and obesity are associated with an increased risk of aggressive prostate cancer: results from the EPIC cohort study. *BMC Medicine* 15: 115.
137. Petrovics G et al. (2005) Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 24: 3847-3852.
138. Pezaro C et al. (2014) Activity of cabazitaxel in castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel and next-generation endocrine agents. *Eur Urol* 66: 459–465.
139. Pfaffl M (2004) Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1/04: 92-95.
140. Pilia I (ed) (2007) Evaluation der Lebensqualität bei Patienten nach Primärtherapie eines klinisch lokal begrenzten Prostatakarzinoms, Dissertation, Tübingen.
141. Pillai S et al. (2017) Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 116: 58–67.
142. Pinkel D et al. (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microArrays. *Nat Genet* 20: 207-211.
143. Pinkel D, Albertson D (2005) Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 37 Suppl: 11-17.
144. Pollack J et al. (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microArrays. *Nature Genetics* 23: 41-46.
145. Poniah P et al. (2017) Genome-wide copy number analysis reveals candidate gene loci that confer susceptibility to high-grade prostate cancer. *Urol Oncol S1078-1439*: 30189, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.04.017. [Epub ahead of print].
146. Pretlow T et al. (1993) Xenografts of Primary Human Prostatic Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 85: 394-398.
147. Prober J et al. (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chainterminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336–341.

148. Produktbeschreibung Human Cot-1 DNA® von InvitrogenTM: www.lifetechnologies.com.
149. Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, W de Gruyter-Verlag.
150. Rahnenfuehrer J et al. (2005) Estimating cancer survival and clinical outcome based on genetic tumor progression scores. *Bioinformatics* 21: 2438–2446.
151. Rawer D (ed) (2005) Real-Time PCR: Optimierung und Evaluation, Etablierung von Housekeeping-Genen und die Expressionsanalyse bei Fallotscher Tetralogie, Dissertation, Gießen, S. 94-96.
152. Recker F (2006) Prostate specific antigen in individual cancer checkups and in therapeutic treatment. *Ther Umsch* 63: 135-141.
153. Reddy E et al. (1987) The erg gene: a human gene related to the ets oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6131–6135.
154. Rembrink K et al (1997) Orthotopic implantation of human prostate cancer cell lines: a clinically relevant animal model for metastatic prostate cancer. *Prostate* 31: 168–174.
155. Rodrigues L et al. (2015) Coordinate loss of MAP3K7 and CHD1 promotes aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 75: 1021-1034.
156. Ronaghi M et al. (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242: 84-89.
157. Ronaghi M et al. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281: 363-365.
158. Rubin M et al. (2011) Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol* 29: 3659-3668.
159. Saiki R et al. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
160. Saito M et al. (1992) Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* 148: 4066-4071.
161. Sanger F et al (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* Band 74: 5463–5467.
162. Santarpia L et al. (2012) Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin Ther Targets* 16: 103–119.
163. Saramäki O et al. (2006) Genetic aberrations in prostate cancer by microArray analysis. *Int J Cancer* 119: 1322–1329.
164. Sattler H et al. (1999) Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *Prostate* 39: 79–86.
165. Schena M et al. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.

166. Scher H et al. (2012) Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *N Engl J Med* 367: 1187-1197.
167. Schild T: Einführung in die Real-Time TaqMan® PCR-Technologie, Version 2.1. Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt. <http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>.
168. Schock G et al. (2005) Unbegrenzte DNA-Analysen durch Multiple Displacement Amplification. *BIOspektrum* 6/2005: 781-782.
169. Schröder F et al. (2009) Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study. *N Engl J Med* 360: 1320-1328.
170. Schröder F et al. (2012) Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* 366: 981–990.
171. Schubert M et al. (2016) Prognostic and predictive miRNA biomarkers in bladder, kidney and prostate cancer: Where do we stand in biomarker development? *J Cancer Res Clin Oncol* 142: 1673-1695.
172. Schwertschlag U et al. (1999) Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia* 13: 1307-1315.
173. Semplici F et al. (2002) CK2-dependent phosphorylation of the E2 ubiquitin conjugating enzyme UBC3B induces its interaction with β -TrCP and enhances β -catenin degradation. *Oncogene* 21: 3978-3987.
174. Sequenzierungskosten: <https://en.wikipedia.org/wiki/Genomics>, File: Number of prokaryotic genomes and sequencing costs.svg (Zugriff am: 12.07.2017).
175. Shen M (2013) Chromoplexy: a new category of complex rearrangements in the cancer genome. *Cancer Cell* 23: 567-569.
176. Smith L et al. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674–679.
177. Smits M et al. (2017) Molecular biomarkers to guide precision medicine in localized prostate cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 17: 791-804.
178. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C (eds) (2009) *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, New York.
179. Software Bioconductor: <http://www.bioconductor.org>, Software zur Analyse und zum Verständnis großer Mengen genomischer Daten
180. Software R: <http://www.r-project.org>, Software für statistische Berechnungen und graphische Darstellung
181. Sramkoski R et al. (1999) A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35: 403–409.
182. Stenman U et al. (2005) Prognostic value of serum markers for prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 216: 64-81.

183. Stephens P et al. (2011) Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* 144: 27-40.
184. Stone K et al. (1977) Isolation of a human Prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21: 274-281.
185. Suzuki N et al. (2005) Quantitative Analysis of Multi-Species Oral Biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clinical Medicine & Research* 3: 176-185.
186. Taga T et al. (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58: 573-581.
187. Tam L et al. (2007) Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer* 97: 378-383.
188. Teramura M et al. (1996) Effect of interleukin 11 on normal and pathological thrombopoiesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 38 Suppl: S99-S102.
189. The Genome Sequencing Consortium (2001): Beschreibung von *ALU*-Sequenzen sowie der Restriktionsendonuclease *ALU I*
190. Thompson D, Easton D and the Breast Cancer Linkage Consortium (2001) Variation in cancer risks, by mutation position, in *BRCA2* mutation carriers. *Am J Hum Genet* 68: 410-419.
191. Thompson I et al. (2004) Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level ≤ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 350: 2239-2246.
192. Tomlins S et al. (2005) Recurrent Fusion of *TMPRSS2* and *ETS* Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science* 310: 644-648.
193. Tomlins S et al. (2008 a) Role of the *TMPRSS2-ERG* gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*. 10: 177-188.
194. Tomlins S et al. (2008 b) The role of *SPINK1* in *ETS* rearrangement-negative prostate cancers. *Cancer Cell* 13: 519-528.
195. Tse C, Capeau J (2003) Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel (revue générale). *Ann Biol Clin* 61: 279-293.
196. Turkson J (2004) *STAT* proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 8: 409-422.
197. Turkson J, Jove R (2000) *STAT* proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*. 19: 6613-6626.
198. Ucar D et al. (2009) Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer. *Chemico-Biological Interactions* 178: 48-55.
199. User Bulletin #2: *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*, 1997, Applied Biosystems, S. 11-14.
200. Van Dekken H et al. (2004) Evaluation of Genetic Patterns in Different Tumor Areas of Intermediate-Grade Prostatic Adenocarcinomas by High-Resolution Genomic Array Analysis. *Genes, Chromosomes and Cancer* 39: 249-256.

201. Wainstein M et al. (1994) CWR22: Androgen-dependent Xenograft Model Derived from a Primary Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Research* 54: 6049-6052.
202. Walker J et al. (2003) Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 315: 122-128.
203. Wang J (1985) DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry* 54: 665-697.
204. Wang M et al. (1979) Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.* 17: 159-163.
205. Watson J, Crick F (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18: 123-131.
206. Weiss M et al. (1999) Demystified...Comparative genomic hybridization. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 52: 243-251.
207. Whitman D, Dunbar S (2008) Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection Methods. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2: 20-26.
208. Wolf M et al. (2004) High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microArrays: impact of copy number on gene expression. *Neoplasia* 6: 240-247.
209. Wong M, Medrano J (2005) Real-Time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75-85.
210. Yamazumi K et al. (2006) Expression of interleukin-11 and interleukin-11 receptor alpha in human colorectal adenocarcinoma; immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors. *World J Gastroenterol* 12: 317-321.
211. Yano S et al. (2004) Accuracy of an Array comparative genomic hybridization (CGH) technique in detecting DNA copy number aberrations: comparison with conventional CGH and loss of heterozygosity analysis in prostate cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 150: 122-127.
212. Zhao H et al. (2005) Genome-wide characterization of gene expression variations and DNA copy number changes in prostate cancer cell lines. *Prostate* 63: 187-197.
213. Zini N et al. (1992) The 180-kDa isoform of topoisomerase II is localized in the nucleolus and belongs to the structural elements of the nucleolar remnant. *Exp Cell Res* 200: 460-466.
214. Zipper H et al. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32: e103.
215. Zurita A et al. (2004) Combinatorial Screenings in patients: the interleukin-11 receptor alpha as a candidate target in the progression of human prostate cancer. *Cancer Res* 64: 435-439.

12 Danksagung

Ich danke herzlich

- Herrn Prof. Bernd Wullich für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, die Ergebnisse der Arbeit auf der EXPU 2008 (18. Symposium Experimentelle Urologie) zu präsentieren. Zur Fertigstellung der Arbeit übertrug er die Betreuung im Jahr 2017 an Herrn PD Dr. Jörn Kamradt.
- Herrn PD Dr. Jörn Kamradt für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Dank seines Engagements und seiner Ermunterung fand ich so viele Jahre nach Beginn der Arbeiten doch noch den Mut, diese Arbeit fertigzustellen und einzureichen.
- den technischen Assistentinnen Eva Schmitt und Helga Angeli für die Hilfe bei den experimentellen Arbeiten, ihre Geduld mit mir und die nette gemeinsame Zeit.
- Dr. Laura Tolosi vom Institut für Biomathematik und angewandte Algorithmik am Max-Planck-Institut für Informatik in Saarbrücken für die statistische Auswertung der *ArrayCGH*-Daten.
- Dr. Jörg Rahnenführer vom Institut für Statistische Methoden in der Genetik und Chemometrie an der Universität Dortmund für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.
- meiner Schwester Dr. Judith Wahrheit für mehrfaches Korrekturlesen, zahlreiche fachliche Hinweise und ihre Hilfe bei der Formatierung.
- meinen Eltern und meinem Mann für die emotionale Unterstützung während der letzten Zeit kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit.

13 Publikation

Kamradt J, Jung V, Wahrheit K, Tolosi L, Rahnenführer J, et al (2007) Detection of Novel Amplicons in Prostate Cancer by Comprehensive Genomic Profiling of Prostate Cancer Cell Lines Using Oligonucleotide-Based *ArrayCGH*. *PLoS ONE* 2(8): e769. doi: 10.1371/journal.pone.0000769

14 Lebenslauf

Kerstin Wahrheit-Ganter

Im Talgarten 32, 66459 Kirkel

Tel.: (06849) 9929871, Mobil: (0160) 99143393

Email: kerstinwahrheitganter@yahoo.de

Geburtstag, Geburtsort	9. November 1982 in St. Ingbert/Saar
Familienstand	verheiratet seit 2010 2 Kinder, geboren 2010 und 2013
Konfession	evangelisch

Werdegang

August 1989 bis Juli 1993	Grundschule Kirkel-Neuhäusel
August 1993 bis Juni 2002	Gymnasium Johanneum in Homburg, Abitur
Mai bis August 2002	Ausbildung zur Rettungssanitäterin
WS 2002 bis WS 2008	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes, Abschluss mit Staatsexamen
September 2004 bis Juli 2005	Studienaufenthalt in Rennes/Frankreich im Rahmen des ERASMUS-Austauschprogrammes
Januar 2009 bis August 2017	Assistenzärztin in Weiterbildung an der Universitätsklinik des Saarlandes, Abteilung Pneumologie und Beatmungsmedizin
September 2017 bis aktuell	Assistenzärztin in Weiterbildung am Diakonieklinikum Neunkirchen, Abteilung Innere Medizin