

# **Identifizierung differentiell exprimierter Gene in Tumoren der Prostata und Harnblase**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

eingereicht von  
Christoph Wissmann  
aus Hamburg  
April 2002

Erster Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. André Rosenthal

Disputationstermin 19.12.2002

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Epidemiologie und Diagnostik des Prostatakarzinoms</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Molekulare Grundlagen des Prostatakarzinoms .....	3
1.1.2 Histopathologische Klassifizierung und Behandlung von Prostatatumoren .....	6
<b>1.2 Überblick über das Harnblasenkarzinom</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Wnt- und Ras-Signaltransduktionswege</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4 Auswahl von Methoden zur Bestimmung der differentiellen mRNA-Expression</b> .....	<b>11</b>
1.4.1 Northern Hybridisierungen.....	11
1.4.2 Quantitative-PCR.....	12
1.4.3 Hoch-Durchsatz Expressionsuntersuchungen durch Affymetrix Oligonukleotidchips .....	13
1.4.4 <i>In silico</i> Methoden .....	15
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>17</b>
3.1.1 Zelllinien.....	18
<b>3.2 Plasmidisolierung</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 DNA und RNA Quantifizierung mit PicoGreen bzw. RiboGreen</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Sequenzierung</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5 Isolierung von spezifischen BAC-Klonen</b> .....	<b>21</b>
<b>3.6 Northern Hybridisierung</b> .....	<b>22</b>
3.6.1 Sondenherstellung .....	22
3.6.2 Konzentrationsreihe von DNAs auf Membranen .....	23
3.6.3 Sondenmarkierung und Aufreinigung .....	23
3.6.4 Hybridisierung der Membranen.....	24
3.6.5 Waschen der Membranen .....	24
<b>3.7 Mikrodissektion</b> .....	<b>25</b>
3.7.1 Auswahl des Patientenkollektivs zur Expressionsuntersuchung von Prostatatumoren.....	25
3.7.2 Durchführung der manuellen Mikrodissektion .....	25
<b>3.8 Poly-A<sup>+</sup>-RNA Präparation</b> .....	<b>26</b>
3.8.1 RNA Präparation aus Gewebeproben .....	26
3.8.2 RNA Präparation aus Zellkultur .....	27

<b>3.9</b>	<b>cDNA Synthese</b> .....	<b>27</b>
3.9.1	Erststrangsynthese aus isolierter Poly-A <sup>+</sup> -RNA .....	27
3.9.2	cDNA Synthese für Taqman Untersuchungen.....	28
3.9.3	cDNA Synthese aus cRNA.....	28
3.9.4	Zweitstrangsynthese .....	30
3.9.5	Reinigung von cDNA .....	30
3.9.6	Lineare Amplifikation von cDNA durch <i>in vitro</i> Transkription (IVT).....	30
3.9.7	Aufreinigung der cRNA .....	31
<b>3.10</b>	<b>Affymetrix Chipexperimente</b> .....	<b>32</b>
3.10.1	Lösungen für Affymetrix Chipexperimente.....	34
<b>3.11</b>	<b>Quantitative „TaqMan<sup>TM</sup>“ PCR</b> .....	<b>35</b>
3.11.1	Vergleichende C <sub>T</sub> -Methode .....	36
<b>3.12</b>	<b>LOH-Untersuchung</b> .....	<b>37</b>
3.12.1	Extraktion genomischer DNA aus den Überständen der RNA-Extraktion.....	37
3.12.2	LOH-PCR.....	38
3.12.3	Post-PCR-Markierung und Produktaufreinigung.....	39
3.12.4	LOH Auswertung .....	40
<b>3.13</b>	<b><i>In silico</i> Analysen</b> .....	<b>41</b>
3.13.1	BLAST Programme.....	41
3.13.2	Automatische Verlängerung von Sequenzen (Autex).....	41
3.13.3	e-Northern.....	42
<b>3.14</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>43</b>
3.14.1	Expression der klonierten Ponsinfragmente .....	43
3.14.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	43
3.14.3	Peptidantikörper.....	44
3.14.4	Beladung von Membranen mit unterschiedlichen Protein-konzentrationen.....	45
3.14.5	Western-Hybridisierung .....	45
3.14.6	Immunzytochemie .....	46
3.14.7	Immunhistochemie .....	47
<b>4.</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Affymetrix Chipauswertung von 54 Patienten mit Prostatatumoren und Prostatazelllinien</b> .....	<b>48</b>
4.1.1	Auswahl von Kandidatengen mit einer Herunterregulation in Prostatatumoren.....	52
4.1.2	Vergleich der Genexpression in Patientenmaterial und Zelllinien von Prostatatumoren.....	53
<b>4.2</b>	<b>Analyse an Hand des Expressionsprofils ähnlich gruppierter Versuche und Gene</b> .....	<b>56</b>
4.2.1	Genanalyse der Gruppierungen .....	61

---

<b>4.3 Kandidatengene aus dem Wnt-Signalweg.....</b>	<b>63</b>
4.3.1 Wnt Inhibitory Factor 1 (WIF-1).....	63
4.3.2 Secreted frizzled related protein 1 (sFRP1).....	69
<b>4.4 Chimerin-1, ein Kandidatengene aus dem Ras-Signalweg.....</b>	<b>75</b>
4.4.1 Expression von Chimerin-1 in der Prostata.....	76
4.4.2 Elektronischer Northern von Chimerin-1.....	77
4.4.3 Expression von Chimerin-1 in verschiedenen Normalgeweben und Zelllinien.....	78
<b>4.5 Kandidatengene Ponsin.....</b>	<b>79</b>
4.5.1 Expression von Ponsin in der Prostata.....	80
4.5.2 Elektronischer Northern und Expressionsvalidierung in der Harnblase.....	82
4.5.3 Expression von Ponsin in verschiedenen Normal- und Tumorgeweben.....	83
4.5.4 LOH auf Chromosom 10q in Prostatatumoren.....	85
4.5.5 Untersuchung der Region zwischen den Markern D10S1723 und D10S212.....	89
4.5.6 Proteinchemische Untersuchungen.....	90
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>93</b>
<b>5.1 Methodische Aspekte der Expressionsuntersuchung von Prostatageweben.....</b>	<b>93</b>
<b>5.2 Clusteranalyse der Expressionsprofile von Prostatanormal- und tumorgewebe.....</b>	<b>96</b>
<b>5.3 Auswahl von herunterregulierten Genen in Tumoren der Prostata.....</b>	<b>100</b>
5.3.1 Mögliche tumorsupprimierende Rolle der Regulatoren WIF-1 und sFRP1 des Wnt-Signalweges ..	
.....	101
5.3.2 Chimerin-1, funktionelles Homolog des NF-1, zeigt eine deutliche Herunterregulation in	
Prostatatumoren.....	106
5.3.3 Ursachen der differentiellen Expression von Ponsin in Chiphybridisierungen von manuell	
mikrodisseziertem Gewebe.....	108
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>111</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>113</b>
<b>8. Literatur.....</b>	<b>115</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>127</b>
<b>9.1 Histologie der 54 untersuchten Prostatagewebebeipare.....</b>	<b>127</b>
<b>9.2 Danksagung.....</b>	<b>129</b>
<b>9.3 Lebenslauf.....</b>	<b>130</b>
<b>9.4 Erklärung.....</b>	<b>131</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Aminotriazol
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galactosidase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CEN	Centromer
cDNA	complementary DNA
cRNA	complementary RNA
CDS	Coding DNA Strang
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	2',3'-Dideoxy-nukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol (1,4-Dithiol-2,3-dihydroxybutan)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTE	1,4-Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O	Wasser
h	Stunde
HAc	Essigsäure
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LOH	Loss of Heterozygosity
Mg	Magnesium
Min.	Minute
mM	Millimolar
MM	Mismatch (Affymetix: umgekehrt komplementäres Oligo mit einem Mismatch in der Mittelposition)

---

MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	1(3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optische Dichte
Oligo d(T)	Oligo Desoxythymidin
PBS	Phosphate-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PM	Perfect Match (Affymetix: umgekehrt komplementäres Oligo)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly A <sup>+</sup> -RNA	Polyadenylierte RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	„round per minute“, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natruimdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde
SH2-Domäne	Src-Homolog-2 Domäne
SSC	Saline Sodium Chloride
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCC	Transitional Cell Carcinoma
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylglycin
Triton X-100	t-Oktylphenoxypolyethanol
U	Einheit (enzymatische Aktivität)
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid