

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Affymetrix Chipauswertung von 54 Patienten mit Prostatatumoren und Prostatazelllinien

Der nach Sequenzangaben von metaGen Pharmaceuticals GmbH von der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) hergestellte Oligonukleotidchip trägt 6.117 Probensätze, die von 3.943 verschiedenen Sequenzen abgeleitet wurden. Jeder Probensatz umfasst 20 verschiedene Oligonukleotidsequenzen von 25 Basenpaaren, die genau umgekehrt komplementär (Perfect Match), sowie 20 weitere Oligonukleotidsequenzen, die in der Mitte identisch zur Zielsequenz sind (Mismatch). Diese Sequenzen waren bekannte oder neu identifizierte Gene, Konsensussequenzen von EST-Clustern oder auch STS-Markersequenzen. Von unbekanntem Sequenzen, für die die Orientierung der Transkriptionsrichtung zum Zeitpunkt des Designs des Chips Ende 1998 noch nicht bekannt war, wurden jeweils Probensätze für beide möglichen Transkriptionsrichtungen auf den Chip synthetisiert. Für eine Anzahl von Genen wurde zusätzlich zu dem üblicherweise aus der 3'-untranslatierten Region (Untranslated Region, UTR) kommenden Probensatz noch zusätzlich ein Probensatz aus der kodierenden DNA Sequenz (Coding DNA Sequence, CDS) auf den Chip synthetisiert.

So liegen 1.066 Sequenzen als Sense und Antisense Sequenzen vor und von 588 Genen ist ein Probensatz aus dem CDS und einer aus dem 3'-UTR vorhanden.

Die 3.943 Sequenzen setzten sich folgendermaßen zusammen:

48 % *in silico* als differentiell exprimiert identifiziert

24 % bekannte tumorassoziierte Gene (z. B. Ras, PTEN)

21 % STS Marker von den Chromosomen 8, 13 und 18

7,5 % von Proteinmotiven abgeleitete Sequenzen

0,5 % Standard Affymetrix Kontrollen

Die Chips wurden nach einem bei der metaGen Pharmaceuticals GmbH entwickelten Algorithmus ausgewertet. Die statistische Analyse auf An- oder Abwesenheit eines Transkripts in der untersuchten Probe wurde durch den Wilcoxon Paar Test durchgeführt (Sachs et al., 1997). Dieser nichtparametrische Test beurteilt, ob die Intensität der Hybridisierung der perfekten Sequenz (Perfect Match, PM) höher als die Intensität der

fehlerhaften Sequenz (Mismatch, MM) ist. Aus den Intensitäten von PM und MM wurde die Differenz gebildet und die Differenzen der 20 Probenpaare eines Probensatzes wurden der Größe nach sortiert. Der resultierende p-Wert bezieht sich auf folgende Frage: Wenn der Median der Differenzen der gesamten Messwerte gleich Null ist, wie groß ist die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachtete Median auf eine zufällige Verteilung zurückzuführen ist? Ein kleiner p-Wert bedeutet also, dass die beobachtete Verteilung nicht zufällig ist. Je kleiner der p-Wert des Wilcoxon Tests ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das betrachtete Gen in der Probe exprimiert ist.

Abweichend von der benutzten mittleren Differenz (Average Difference, AD) der Affymetrix-Auswertung, die die Differenzen von PM-MM ermittelt und aus den Differenzen der zwanzig verschiedenen Probenpaare den Mittelwert für einen Probensatz bildet, wurde für diese Auswertung nach Hintergrundkorrektur und Normalisierung die 75 Perzentile des PM benutzt. Umfangreiche bioinformatische Untersuchungen mehrerer Affymetrix Chips, die aus verschiedenen Produktionschargen kamen und alle mit markierter cRNA aus einem Ansatz hybridisiert wurden, zeigten gegenüber der standardisierten Auswertung von Affymetrix ein homogeneres Ergebnisbild (unveröffentlichte Daten, S. Roepcke).

Die Intensitäten der zwanzig PMs wurden der Größe nach, beim Kleinsten beginnend, sortiert und die mittlere Intensität zwischen dem fünfzehnten und sechzehnten Oligonukleotid wurde als Expressionswert für den betreffenden Probensatz verwendet. Von diesen Expressionswerten wurde der Hintergrundwert abgezogen und die Einzelintensitäten wurden auf die Gesamtintensität des Chips normiert.

Zum Vergleich der beiden Gewebeproben eines Patienten wurde der Quotient der normierten Expressionswerte aus Normal- und Tumorgewebe gebildet, sofern der entsprechende Probensatz in beiden Chipexperimenten eindeutig nachgewiesen wurde. Dieser Faktor  $F = \frac{Normal}{Tumor}$  gab für jeden Probensatz ein Maß, wie stark sich die Expression der Sequenz in den beiden Gewebetypen unterschied. Wiederholte Hybridisierungen der Blasenzelllinie RT4 und Vergleiche mit einem Referenzexperiment zeigten für den überwiegenden Großteil der Probensätze eine Streuung um den Wert von 1 (s. Abb. 7).

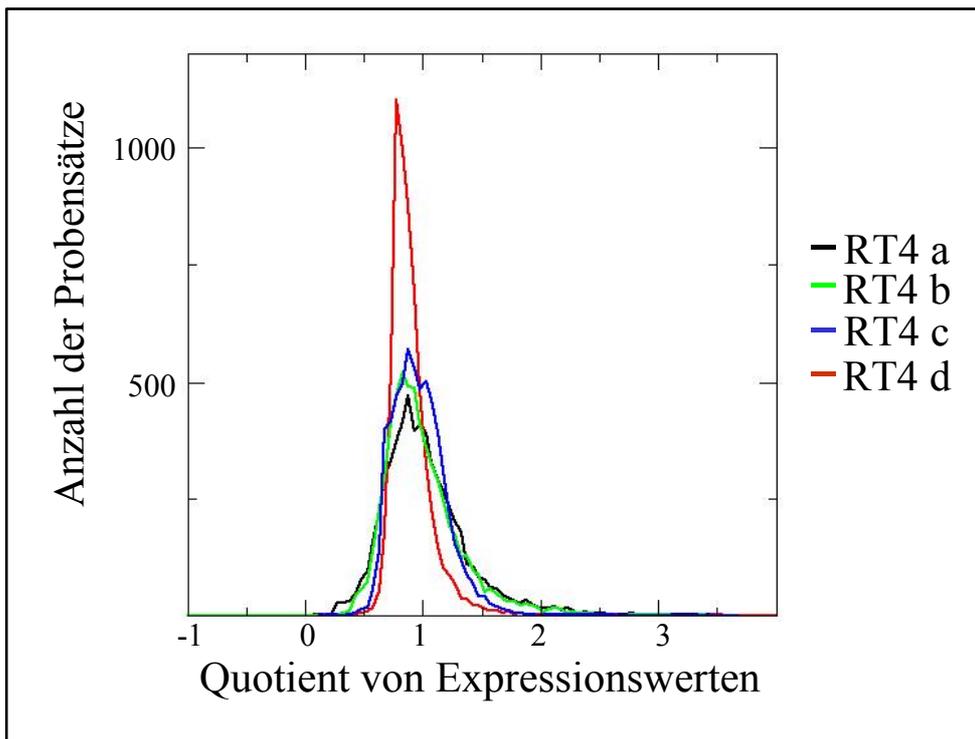


Abb. 7: Streuung der Expressionswerte in identischen Wiederholungen. RNA der Blasenzelllinie aus einem Markierungsansatz wurde auf vier verschiedene Chips hybridisiert und jeweils mit einem Referenzexperiment verglichen (S. Roepcke).

Auf Grund der in den Messungen enthaltenen Streuungen der Faktoren  $F(N/T)$  um den Wert von 1 wurden für die Chipauswertung die berechneten Faktoren der Probensätze folgendermaßen interpretiert:

$F < 0,5$	Überexpression im Tumorgewebe
$0,5 < F < 2$	keine signifikanten Unterschiede im Expressionsverhalten
$F > 2$	Herunterregulation im Tumorgewebe

Probensätze, die im Normal- oder Tumorgewebe nicht detektiert wurden, im dazu korrespondierenden Gewebetyp aber anwesend waren, wurde ebenfalls ein Faktor  $< 0,5$  bzw.  $> 2$  zugeschrieben.

Die Auswertung wurde für die 108 Chipexperimente mit jeweils 54 Normal- und Tumorproben von 54 verschiedenen Patienten berechnet. Nach Aussage des Wilcoxon Tests mit einem Signifikanzniveau von 0,05 waren von den 6.117 Probensätzen des Chips 4.225 Probensätze in mindestens einem der 108 Chipexperimente anwesend. Diese Auswahl von Probensätzen wurde im weiteren für die Auswertung verwendet. Die Berechnung des Faktors

F(N/T) aus den Expressionswerten in den beiden Gewebetypen zeigte bei Betrachtung der 4225 Probensätze, dass kein einziger Probensatz in allen 54 Prostatapatienten gleichmäßig herauf- oder herunterreguliert war.

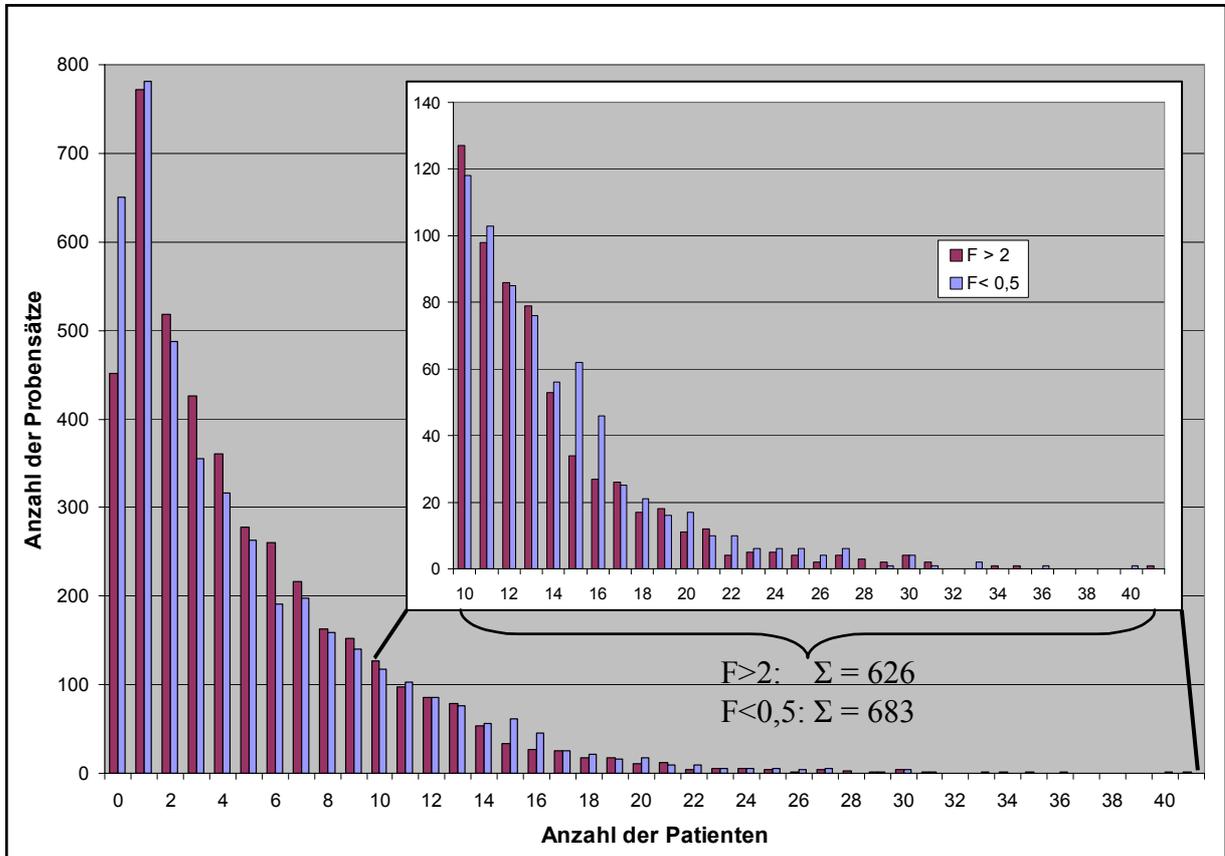


Abb. 8: Häufigkeitsverteilung des Faktors  $F=N/T$  in den 54 Prostatapatienten für die mindestens einmal anwesend detektierten 4.225 Probensätze. Abzulesen ist die Anzahl von Probensätzen, die z. B. in 10 Patienten herauf- ( $F > 2$ ; blau) oder herunterreguliert ( $F < 0,5$ ; rot) sind. Die Verteilung der Probensätze, die in mindestens 10 Patienten reguliert sind, ist vergrößert dargestellt; die Gesamtzahlen der regulierten Probensätze sind aufsummiert.

Abb. 8 verdeutlicht, dass jeweils nur neun Probensätze in mehr als 30 Prostatapatienten im Tumor herauf- oder herunterreguliert sind. Von den insgesamt 6.117 Probensätzen sind also nur etwa 0,15% in mehr als 55% der Patienten gleichmäßig herunter- oder herauf reguliert. 3.726 Probensätze sind in weniger als 10 Patienten in Prostatatumoren hochreguliert und 3.660 Probensätze sind herunterreguliert. Diese Verteilung zeigt deutlich die molekulare Heterogenität des Tumormaterials und macht eine weitere Subklassifizierung der Tumore notwendig. Diese weitere Klassifizierung kann zum einen durch die histopathologischen Befunde erfolgen, zum anderen aber auch durch eine Klassifizierung nach dem zu beobachtenden Expressionsmuster einzelner Gene oder aber auch Gruppen von Genen (s. Kap. 4.2).

#### 4.1.1 Auswahl von Kandidatengenem mit einer Herunterregulation in Prostatatumoren

Das Augenmerk der Untersuchung richtet sich auf Gene, die in den Prostatatumoren im Vergleich zu ihren korrespondierenden Normalgeweben herunterreguliert sind und dadurch möglicherweise eine tumorsupprimierende Rolle spielen (Zhang et al., 1998). Die Faktoren  $F$  der interessierenden Gene müssen also in den verschiedenen Prostatapatienten einen Wert von  $F=N/T > 2$  haben.

Zur weiteren Validierung der Chipexperimente auf der Basis von Versuchen mit einzelnen Genen war es wichtig, die Auswahl der Sequenzen zu beschränken.

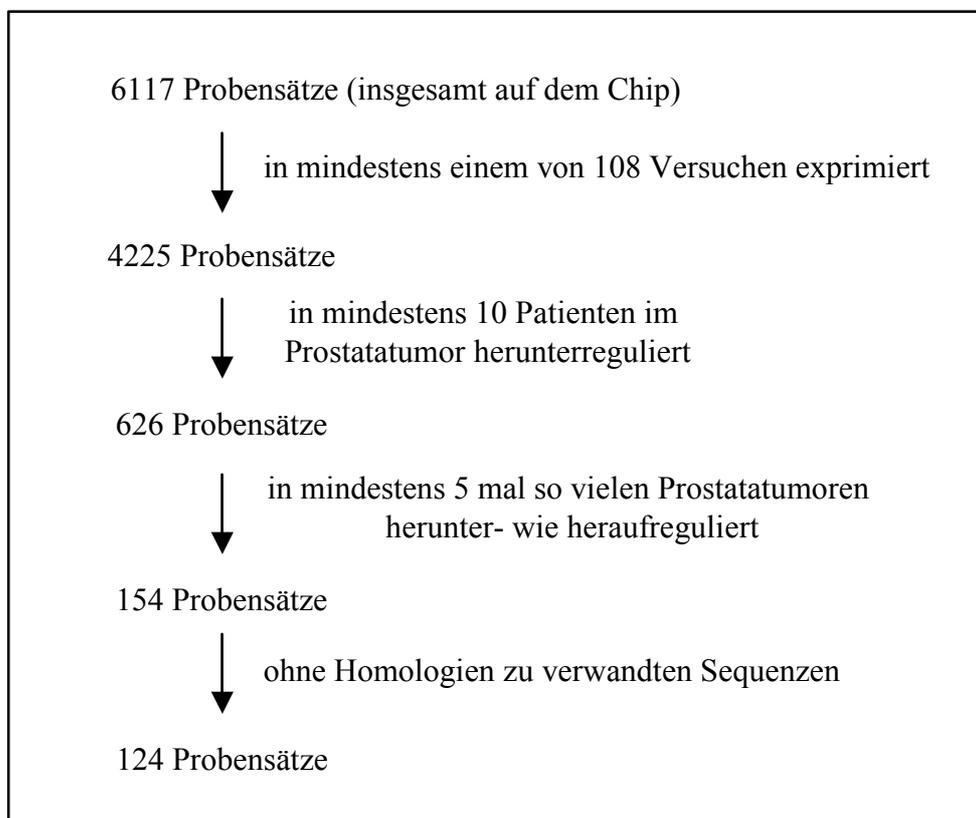


Abb. 9: Auswahl der Probensätze mit der häufigsten Herunterregulation in Prostatatumoren von 54 Patienten.

Das Flussdiagramm in Abb. 9 verdeutlicht die Reduktion der ursprünglich auf dem Chip vorhandenen 6117 verschiedenen Probensätze in einem ersten Schritt auf 4.225 Probensätze, die in zumindest einem der 108 verschiedenen Versuche als in mindestens einem Gewebe exprimiert beurteilt wurden. Um Gene zu identifizieren, die in einer möglichst großen Anzahl von Patienten ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen, wurden nur Probensätze betrachtet,

die in mindestens 10 Patienten einen Faktor von  $> 2$  hatten und damit in knapp 20% der untersuchten Fälle gleichmäßig exprimiert wurden. Damit reduzierte sich die Zahl der Probensätze auf 626, von denen aber einige in einer größeren Anzahl von Patienten eine Hoch- als eine Herunterregulation im Tumor zeigten. Als weiteres Kriterium zur Einschränkung wurden Probensätze ausgegrenzt, deren Herunterregulation im Tumorgewebe nicht mindestens fünfmal so häufig war wie die Heraufregulation des Probensatzes in anderen Patientenproben. Die daraus resultierenden 154 Probensätze wurden noch um 30 Probensätze reduziert, die nicht absolut spezifisch zu einer Sequenz waren, sondern zusätzlich noch homologe Sequenzen detektierten.

Die aus dieser Auswertung hervorgegangene Liste enthielt noch Sequenzen von 124 Probensätzen. Die ausgewählten Probensätze wurden für die Clusteranalyse (s. Kap. 4.2) verwendet. Da auch diese Anzahl von Sequenzen noch zu groß ist für eine genauere Einzelgenanalyse mussten einzelne Gene ausgewählt werden, die in den Kapiteln 4.3 bis 4.5 näher besprochen werden.

#### 4.1.2 Vergleich der Genexpression in Patientenmaterial und Zelllinien von Prostatatumoren

Neben den zuvor beschriebenen 54 Gewebepaaren von Prostatatumorpatienten wurde ebenfalls die Poly-A<sup>+</sup>-RNA von vier Prostatazelllinien präpariert und auf den Chip hybridisiert. Bei den drei Prostatazelllinien PC3, LNCaP und DU145, die aus Prostatatumormetastasen hervorgegangen sind, handelt es sich um seit langem etablierte Zelllinien, die in der Wissenschaft vielfach genutzt werden. Die primäre Epithelzelllinie (Primary Epithelial Cells, PrEC) wurde von normalen Epithelzellen der Prostata abgeleitet und wird als Modellsystem für normales Prostatagewebe betrachtet.

	Detektierte Probensätze	Standardabweichung
Von den insgesamt 6117 Probensätzen auf dem Chip	4341	
Mittelwert der 4 Zelllinien	2090,3	161,57
Mittelwert der 108 Patientengewebe	2082,9	315,24
Mittelwert der 54 Normalgewebe	2093,2	315,63
Mittelwert der 54 Tumorgewebe	2072,8	317,49

Tab. 6: Mittelwerte der detektierten Probensätze in etablierten Prostatazelllinien im Vergleich zu Normal- und Tumorgeweben humaner Prostatatumore.

Bei dem Vergleich der Zelllinien mit den Prostatatumorpatienten wurden die Zahlen der in den einzelnen Versuchen detektierten Probensätze verglichen. Von den 6.117 Probensätzen auf dem metaGen metg001A Affymetrix Genechip wurden 4341 Probensätze in mindestens einem der 108 Patientengewebe und 4 Zelllinien detektiert, während fast 1.800 Probensätze in keinem Versuch ein Signal zeigen. Ein Vergleich der vier Zelllinien mit den 54 Prostatapatienten verdeutlicht zum Teil erhebliche Unterschiede der exprimierten Sequenzen, wenn auch die Anzahl der als exprimiert detektierten Gene sehr ähnlich ist (s. Tab. 6). Die Standardabweichung des Mittelwerts der Patientengewebe gegenüber den Zelllinien war jedoch etwa doppelt so groß und zeigte ein deutlich größere Streuung.

Eine weitere große Zahl von Probensätzen wurde nur in wenigen einzelnen Geweben detektiert. So wurden jeweils etwa 1.000 Probensätze in weniger als sechs von jeweils 54 Normal- oder Tumorpatienten detektiert (s. Tab. 7).

	Detektierte Probensätze
in mindestens einem Normalgewebe	3914
in mehr als fünf Normalgeweben	2927
in mindestens einem Tumorgewebe	3975
in mehr als fünf Tumorgeweben	2951
nur in Primärepithelzelllinie PrEC	30
nur in Tumorzelllinien PC3, LNCaP und DU145	70
in PrEC + Tumorzelllinien	22
Gesamt in Zelllinien und nicht in Patientengeweben	122
nur in Patientengeweben, in keiner Zelllinie	1400
in mehr als 10 Patientengeweben, in keiner Zelllinie	497

Tab. 7: Anzahl der detektierten Probensätze in 4 Zelllinien, 54 Prostatanormal- und tumorgeweben.

Trotz der vergleichbaren Gesamtzahlen der in den einzelnen Versuchen detektierten Probensätze unterscheiden sich die exprimierten Gene zum Teil deutlich. So wurden 122 Probensätze nur in den Zelllinien exprimiert und in keiner der 108 Gewebeprobe. Von diesen Probensätzen waren 30 Probensätze nur in der PrEC Zelllinie mit zum Teil recht deutlicher Expression detektiert worden und eine nähere Analyse der Gene zeigte, dass es sich vielfach um membranständige Glykoproteine handelt, wie z. B. das Rh Type C Glycoprotein. Dieses epithelial exprimierte Transmembranprotein fungiert vermutlich als Transporter und ist an der Regulation des Ammoniumhaushalts beteiligt (Huang and Liu, 2001). Weitere stark hoch regulierte transmembrane Gene sind die Metalloproteinase ADAM15 und das Integrin 4 $\beta$ . Bei den beiden Genen handelt es sich um Rezeptoren für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion. Eine Bindung von Mitgliedern der beiden Familien an Mitglieder der jeweiligen anderen Familie konnte in mehreren Fällen gezeigt werden (Eto et al., 2000; Bridges et al.,

2001). Eine direkte Bindung der beiden Proteine in einer Zell-Zell-Interaktion konnte bisher noch nicht beobachtet werden, jedoch zeigten Überexpressionsstudien mit ADAM15 in NIH3T3 Zellen eine verstärkte Zell-Zell-Interaktion (Herren et al., 2001). Ein weiteres Protein, das verstärkt in der Zell-Zell-Interaktion eine Rolle spielt und ebenfalls nur in der PrEC Zelllinie exprimiert wird, ist das Cadherin 13.

Die Analyse dieser Gene zeigt deutlich eine Hochregulation von Genen in der Prostata-„Normal“-Zelllinie, die in keinem der untersuchten 54 Patienten zu beobachten ist. Diese Tatsache lässt vermuten, dass diese Gene eine essentielle Rolle für das Wachstum der Zelllinien unter Kulturbedingungen, jedoch nicht für Epithelzellen von Prostatagewebe haben. Die Analyse der drei tumorigenen Prostatazelllinien PC3, LNCaP und DU145 zeigte eine Expression von 70 Probensätzen, die nur in einer oder mehreren Tumor-Zelllinien, jedoch in keinem Patienten oder der PrEC Zelllinie beobachtet wurde (s. Tab. 7). Besonders auffällig in der Gruppe der Gene war das zahlreiche Auftreten von Genen mit Funktionen im Zellzyklus. So zeigte z. B. CDC20, das eine essentielle Rolle im Zellzyklus spielt und in vielen exponentiell wachsenden Zelllinien detektiert wurde (Weinstein et al., 1994), eine extrem starke Expression in den drei Zelllinien. Ebenfalls in dieser Liste der nur in den Zelllinien exprimierten Gene waren die beiden Cycline A1 und A2, die als Regulatoren für CDK2 und CDC2 gelten, und somit an zwei unterschiedlichen Funktionen des Zellzyklus auf den G1/S- und den G2/M-Übergang regulierend wirken (Yang et al., 1999; Murphy et al., 1997). Weitere Gene mit eindeutig proliferativer Funktion waren CDC25 A und C, CDC2 und „Protein Translation Initiation Factor 2C2“ (EIF2C2). Die aufgeführten Beispiele der in den Zelllinien regulierten Gene geben einen Eindruck von der Stärke des proliferativen Einflusses der Zellen auf die Genexpression. Hierbei sind nur die direkt an der Proliferation der Zellen beteiligten Gene, die nicht in den Patienten exprimiert wurden, hervorgehoben worden. Bei der Deutlichkeit des Einflusses der Proliferation auf das Expressionsprofil ist mit Sicherheit noch eine Anzahl von Genen zu identifizieren, die vielleicht eine geringe Expression in einigen Patientengewebe, jedoch eine hohe Expression in den Zelllinien zeigen.

Der Vergleich der 54 Prostatapatienten mit den Zelllinien führte zur Identifikation von 1400 Probensätzen, die in mindestens einem der 108 Patientengewebe, aber in keiner Zelllinie exprimiert wurden. Um mögliche Ungenauigkeiten in der Versuchsmessung und der daran anschließenden statistischen Auswertung auszuschließen, wurden die Probensätze auf eine Anzahl von 497 zusammengefasst, die in mehr als 10 Patientengewebe (Normal- und/oder Tumorgewebe), aber in keiner Zelllinie exprimiert wurden (s. Tab. 7). Diese knapp 500

Probensätze bilden also einen Satz von Genen, die in mindestens 10% der Patientengewebe, jedoch in keiner Zelllinien exprimiert werden. So ist z. B. IGFBP5 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5) in allen 108 Prostatageweben exprimiert, aber in keiner Zelllinie. TIMP4 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4), das ebenfalls in keiner Zelllinie exprimiert ist, zeigt eine Herunterregulation in 26% der Prostatatumore und wurde als Inhibitor des Tumorwachstums in Mäusen, nach Überexpression in Brustkrebszelllinien, identifiziert (Wang et al., 1997).

## **4.2 Analyse an Hand des Expressionsprofils ähnlich gruppierter Versuche und Gene**

Zur Erkennung von Gemeinsamkeiten in der Expression einzelner Gene wird vielfach die Methode des Gruppierens (Clustern) von Expressionsdaten verwendet. Hierzu werden in einem ganzheitlichen Ansatz aus der Gesamtheit der Gene diejenigen mit einem ähnlichen Expressionsmuster zusammen gruppiert. Die Verwendung mathematischer Algorithmen ermöglicht die Beurteilung von Ähnlichkeiten (Eisen et al., 1998). Berechnet wurden die Clusteranalysen mit der Software GeneMath 1.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien). Der Datensatz der 6.117 Probensätze wurde zur Berechnung der Cluster auf 230 Probensätze reduziert. Diese 230 Probensätze setzten sich aus den 124 Probensätzen aus Kap. 4.1.1, die im Tumor herunterreguliert sind, und weiteren 106 Probensätzen, die im Tumor heraufreguliert sind, zusammen. Die im Tumor heraufregulierten Sequenzen wurden durch ähnliche Entscheidungskriterien wie in Kap. 4.1.1 für die herunterregulierten Probensätze ausgewählt. Es handelt sich hierbei also um Probensätze, deren Sequenz spezifisch für ein Gen ist, die in mindestens zehn Tumoren heraufreguliert sind ( $F(N/T) < 0,5$ ) und in nicht mehr als 20% der Patienten eine Herunterregulation im Tumor zeigen.

Die Zusammensetzung der beiden Gruppen der in Prostatatumoren herunter- und heraufregulierten Probensätze sind in Abb. 10 dargestellt. Auffällig an der Gruppe von hochregulierten Probensätzen ist der Anteil von 57% von Sequenzen, die entweder unbekannt sind oder sich von ihrer Funktion nicht in eine andere Gruppe einteilen lassen. In der Gruppe der herunterregulierten Sequenzen wurde ein deutlich größerer Anteil von Sequenzen identifiziert, die eine Rolle in der Signaltransduktion oder am Aufbau des Zytoskeletts spielen.

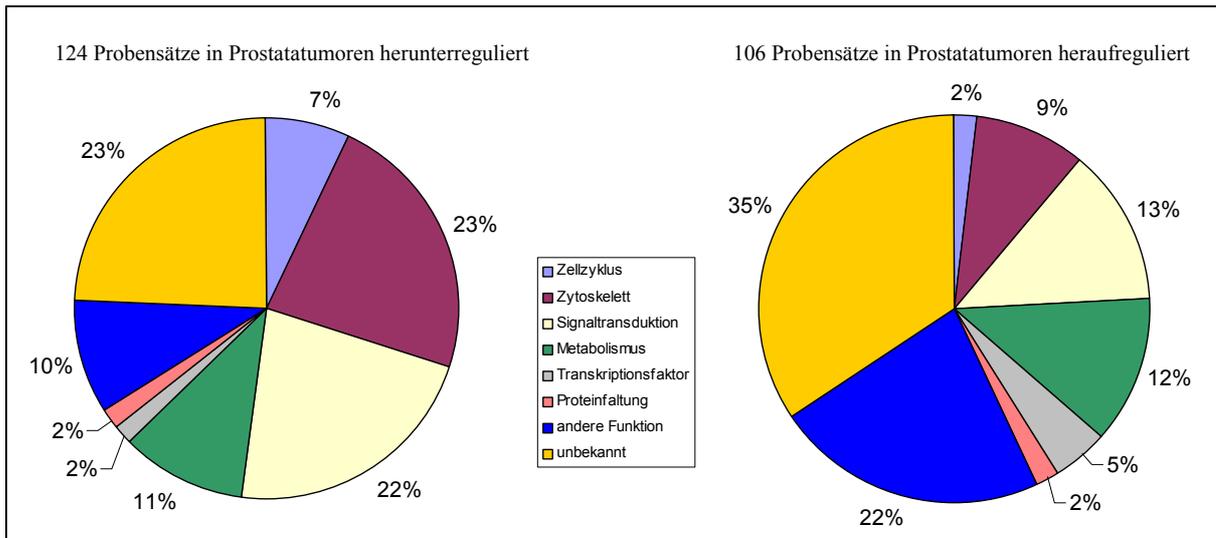


Abb. 10: Zusammensetzung der beiden Gruppen von differenziell exprimierten Genen in Prostata Tumoren. Als unbekannt wurden Sequenzen bezeichnet, für die kein Protein oder keine Funktion bekannt ist. Gene, die in keine der übrigen Klassen eingruppiert werden konnten, wurden unter „andere Funktion“ erfasst.

Zusätzlich zu den 108 Chipexperimenten der 54 Prostata Tumoren Patienten wurden die Chipexperimente von vier Prostatazelllinien berücksichtigt. Bei den Zelllinien handelt es sich um PC3, LNCaP, DU145 und PrEC, eine Prostata-Primärzelllinie.

Für die Berechnung der Gruppen wurden die Datensätze zuvor reduziert, um ein mögliches Hintergrundrauschen zu reduzieren. Als nächster Schritt war die zur Berechnung der Gruppen zu verwendende Datenform zu bestimmen. So wurden häufig nicht die direkt gemessenen Fluoreszenzwerte für die einzelnen Gene benutzt, sondern Verhältniszahlen (Skena et al., 1996). Abweichend von der von Eisen et al. (1998) zur Auswertung von Chipexperimenten etablierten häufig verwendeten Gruppierungsmethode, wurden noch vielfältige weitere Methoden eingesetzt, wie z. B. der Einsatz von parametrischen Verteilungen (Stamey et al., 2001) oder deterministischen Algorithmen (Alon et al., 1999).

Im Gegensatz zu den vielfach in der akademischen Forschung verwendeten cDNA-Arrays können die Affymetrix Chips nur mit einem Farbstoff hybridisiert werden. Um nach der gleichen etablierten Methode gruppieren zu können, wird der Median des entsprechenden Probensatzes von allen Versuchen gebildet und die Fluoreszenzwerte aller Versuche auf diesen Wert zentriert (Welsh et al., 2001; Bhattacharjee et al., 2001). Diese Berechnung ist von Vorteil, wenn keine korrespondierenden Probenpaare zur Verfügung stehen, die direkt miteinander verglichen werden können. Auf Grund des ausdrücklichen Versuchsdesigns zur Untersuchung von paarigen Gewebeproben wurde jedoch diese Methode nicht eingesetzt, um den Vorteil der Berücksichtigung von Patienten-individuellen-Unterschieden nicht zu verlieren.

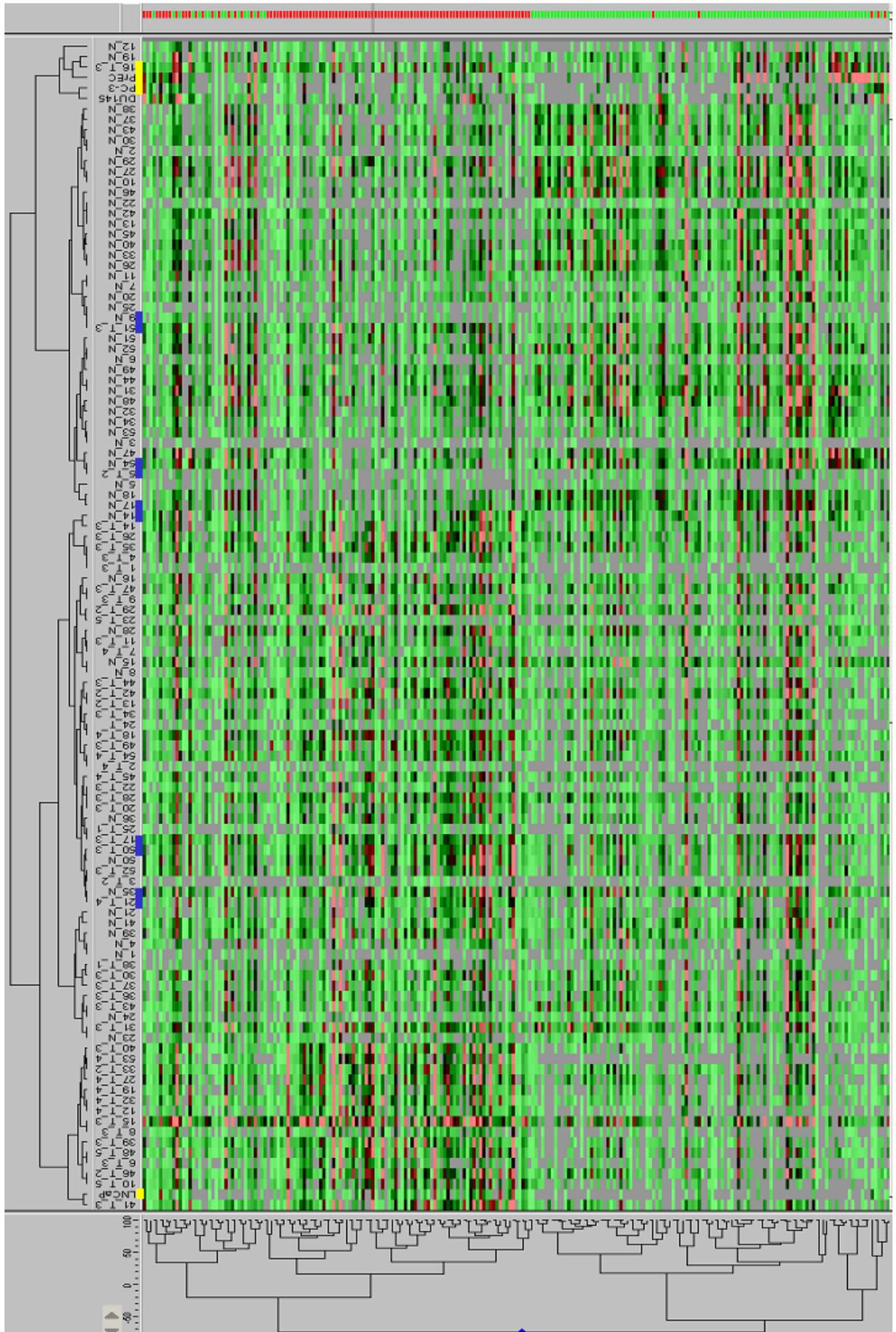


Abb. 11: Clusterdarstellung der 112 verschiedenen Experimente in Spalten und der 230 ausgewählten Gene in den Zeilen. Über den Spalten sind die Namen der Zelllinien und die Nummern der 54 Prostatapatienten mit ihrer Gewebeklassifikation (N=Normal; T=Tumor), sowie bei den Tumoren noch zusätzlich die Gleasonwerte, angegeben. Die Farbverteilung des Clusters von grün (gering) nach rot (hoch) übergehend entspricht der Expressionshöhe des Gens. Gene, die nicht exprimiert sind, wurden durch ein graues Feld dargestellt. An der linken Seite und über den Spalten sind die Dendogramme dargestellt.

In Abb. 11 ist die Clusteranalyse der 230 Probensätze für die 108 Chipexperimente der 54 Prostata Normal- und Tumorproben sowie für 4 Prostatazelllinien dargestellt.

Zur Analyse der Ähnlichkeit der Expression im ausgewählten Datensatz in den 112 verschiedenen Versuchen wurde für die Spalten und Zeilen als Koeffizient zur Bewertung der Ähnlichkeit der Cosine-Korrelationskoeffizient und als Algorithmus der Ward Clusteralgorithmus ausgewählt. Über den Spalten und an den Zeilen sind jeweils die aus der Berechnung resultierenden Dendogramme angezeigt, die ein Maß für die Ähnlichkeit der Versuche darstellen. Zwei Proben zeigen ein umso ähnlicheres Expressionsprofil, je kürzer im Dendogramm ihre verbindenden Arme zum gemeinsamen Knotenpunkt sind.

In Abb. 12 ist noch einmal die Aufspaltung des Dendogramms in zwei Arme für die 112 Versuche hervorgehoben. Der linke Arm umfasst im wesentlichen die Tumore, während der rechte Arm die Normalgewebe beinhaltet. Eine eindeutige Auftrennung der 54 Normal- und Tumorgewebe war nicht möglich, da im „Tumorarm“ auch Normalgewebe vorkommen und umgekehrt im „Normalarm“ Tumorgewebe. Drei der untersuchten Zelllinien (PC3, DU145 und PrEC; in Abb. 12 durch eine gelbe Markierung hervorgehoben) wurden auf Grund ihres Expressionsprofils in den Arm mit den Normalgeweben gruppiert, obwohl PC3 und DU145 Zelllinien sind, die aus Metastasen von Prostatatumoren hervorgegangen sind. Die ebenfalls aus einer Metastase etablierte Zelllinie LNCaP hingegen ordnet sich in den Arm mit den Tumorgeweben ein.

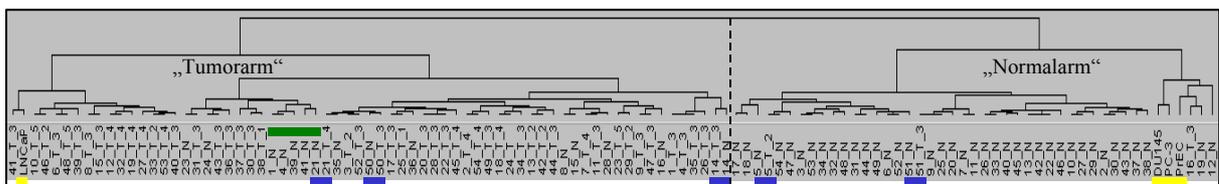


Abb. 12: Übersicht über das Dendrogramm der Gruppierung der Versuche aus Abb. 11. Die Zelllinien sind gelb und Probenpaare eines Patienten mit einem stark ähnlichen Expressionsprofil sind blau hervorgehoben. Eine homogene Gruppe von fünf Normalgeweben im Tumorarm ist grün gekennzeichnet. Die einzelnen Patientenproben sind mit der Patientenummer (s. Anhang), einem T (Tumor) oder einem N (Normal), sowie im Falle eines Tumors noch zusätzlich mit dem Gleasonwert bezeichnet. Das Dendrogramm ist in die beiden Arme unterteilt, die sich hauptsächlich aus Tumor- oder Normalproben zusammensetzen.

Bei Betrachtung des Arms mit den Prostatatumoren ist eine Gruppe von fünf Normalgeweben besonders auffällig, die eine relativ deutliche Untergruppe in dem „Tumorarm“ bildet und sich von den Tumorgeweben abgrenzt (grün gekennzeichnet).

Die Gewebeproben des Patienten Nummer 14 und 50 (in Abb. 12 durch eine blaue Markierung hervorgehoben) gruppieren sich beide in den Tumorarm, zeigen aber untereinander eine größere Ähnlichkeit als zu einer Probe eines anderen Patienten. Auch die beiden Gewebeproben der Patienten 5, 21 und 51 (ebenfalls blau hervorgehoben) liegen jeweils beide auf einem Arm des Clusters relativ dicht beieinander und weisen eine recht hohe Ähnlichkeit der Expression auf. Trotz des histologisch normalen Erscheinungsbildes sämtlicher mikrodissierter Proben zeigen doch einige Normalgewebe eine ähnliche Expression wie ihr dazugehöriges Tumorgewebe.

Insgesamt sind von den 54 Patienten für 53 Patienten die Gleasonwerte der mikrodissierten malignen Läsion bekannt (s. Anhang). Von den 53 Tumoren sind 13 Tumore schlecht differenziert mit einem Gleasonwert von 4-5, 40 Tumore haben einen Gleasonwert von 1-3. Die drei Tumore, die in den Arm des Clusters mit den Normalgeweben gruppiert wurden, haben alle drei einen Gleasonwert von  $<4$  und sind demnach gut differenzierte Tumore. Trotz der deutlichen histologischen Unterscheidung der hochgradigen von den niedergradigen Tumoren ist in der Clusteranalyse keine signifikante Gruppierung der Tumore zu beobachten. Die Verteilung der Tumore in dem Cluster scheint von dem Gleasongrad völlig unabhängig zu sein, da z. B. hochgradige direkt zusammen mit niedergradigen gruppiert wurden (Patient 23 Gleasonwert 5 befindet sich in einer Gruppe mit Patient 29 Gleasonwert 2).

	Tumor	Benigne
Test POSITIV -> KRANK	51	15
Test NEGATIV -> GESUND	3	39
Patienten Proben insgesamt	54	54
Sensitivität:	0,94	
Spezifität:	0,72	
Vorhersagewert f. pos. Test (PPV):	0,77	
Vorhersagewert f. neg. Test (PNV):	0,93	
Genauigkeit:	0,83	
Kranke:	54	
Gesunde:	54	
1-Spezifität:	0,28	
PPV*100:	77,27	

Tab. 8: Berechnung von Sensitivität und Spezifität der Gruppierung der 54 Tumor- und –Normalgewebe von Prostatakrebs Patienten.

Werden alle 54 korrespondierenden Gewebepaare berücksichtigt, ergibt sich für eine Aufteilung in die zwei Arme des Clusters eine Spezifität von 72% und eine Sensitivität der Zuordnung von 94% (s. Tab. 8). Die hohe Sensitivität zeigt eine richtige Erkennung von 94% der Tumore als wirklich zur Tumorgruppe zugehörig, während von den Normalgeweben nur 72% der Normalgruppe zugeordnet werden konnten. Die Zusammensetzung der Gruppe mit den Tumorgeweben besteht aber nur zu 77% aus histologisch identifizierten Tumoren (positiver prädiktiver Wert), während die Gruppe der Normalgewebe sich zu 93% aus Normalgeweben zusammensetzt (negativer prädiktiver Wert).

#### 4.2.1 Genanalyse der Gruppierungen

Die Sequenzen des metaGen metg001A Affymetrix Genechips gehen, wie schon in Kap. 4.1 angesprochen, auf eine Analyse aus dem Jahre 1998 zurück. Eine neuerliche Analyse der Sequenzen durch Sequenzvergleich mit dem Programm Blastn (Altschul et al., 1990) mit der Datenbank UniGene (Version 141, Oktober 2001) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)) ergab für 3391 der insgesamt 3947 Sequenzen einen Datenbankeintrag, der mit einem e-Wert von  $<10^{-100}$  als identisch zu bezeichnen war. UniGene ist eine Datenbank, die GenBank Einträge (mRNA, CDS und EST-Sequenzen) in nicht redundante Sequenzgruppen einsortiert.

Von den zuvor beschriebenen 230 Sequenzen konnten 206 eindeutig identifiziert werden, während die anderen Sequenzen nur zum Teil homolog zu UniGene Einträgen waren. Trotz Identifizierung der Sequenzen in der Datenbank ist vielen Sequenzen noch keine Funktion zugewiesen, da es sich z. B. um genomische BAC- oder cDNA-Sequenzen handelt.

Werden die ausgewählten Gene für die 112 Versuche gruppiert, bilden sich zwei deutliche Arme in dem Dendogramm (s. Abb. 13). Der obere Arm des Dendogramms setzt sich aus 120 Sequenzen zusammen, von denen 103 aus der Gruppe der im Tumor hochregulierten Probensätze kommen und 17 aus der Gruppe der im Tumor herunterregulierten Sequenzen. Der zweite Arm sieht deutlich homogener aus, da von den 110 Probensätzen 105 aus der Gruppe der im Tumor herunterregulierten Sequenzen stammen.

Von den ausgewählten Probensätzen sind 8 Probensätze in der Auswahl, von denen jeweils ein Probensatz aus dem 3'-UTR und einer aus dem CDS der entsprechenden Sequenz abgeleitet wurden. Diese vier Pärchen von Probensätzen, die jeweils unterschiedliche Bereiche einer Sequenz repräsentieren, gruppieren sich in der Clusteranalyse in unmittelbarer

Nähe. Diese relativ große Nähe zueinander zeigt sich auch bei Verwendung anderer Clustermethoden, auch wenn die Positionen zueinander durch die verschiedenen Algorithmen sich leicht verschieben.

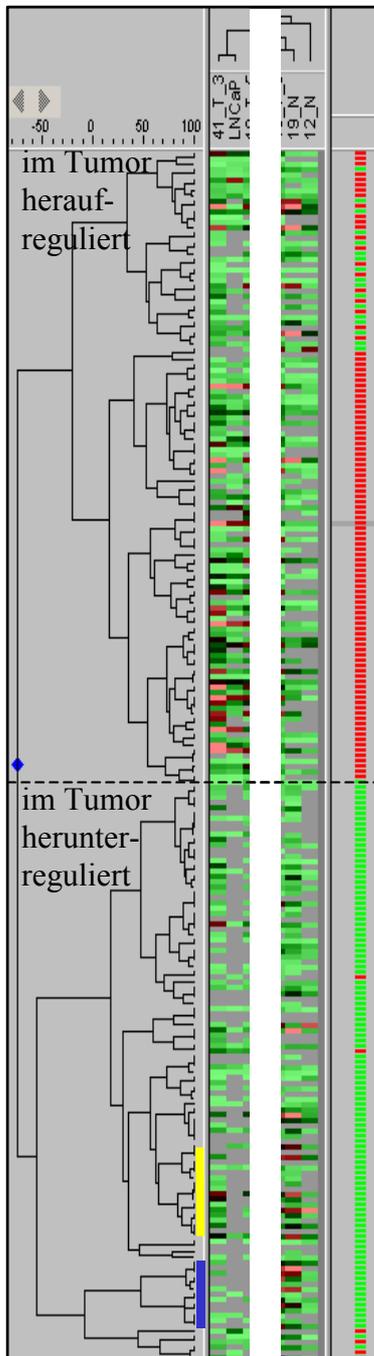


Abb. 13: Dendrogramm der Gruppierung der 230 Proben aus Abb. 11. Die Unterteilung in die beiden Äste ist durch eine Trennlinie hervorgehoben. Die am rechten Rand dargestellten Farbmarkierung entspricht dem Ursprung des jeweiligen Probenmaterials. Im Prostata-Tumor herunterregulierte Proben sind grün, während die hochregulierten rot markiert sind. Zwei einzelne Gruppen von Genen mit ähnlichen Funktionen sind gelb und blau hervorgehoben.

Bei näherer Betrachtung der Gruppierung der Gene sticht eine Gruppe aus 13 Genen hervor, von denen die Funktion von drei Genen unbekannt ist und 5 Gene zu der Zytokeratin-Familie gehören (in Abb. 13 blau markiert). Zytokeratine sind Proteine, die eine Klasse von Intermediärfilamenten bilden. So formt Zytokeratin 14 mit dem Zytokeratin 5 ein Heterotetramer und bildet eine Komponente des Zytoskeletts von Epithelzellen. Von den untersuchten 54 benignen Prostatagewebe waren 23 als hyperplastisch eingestuft worden (s. Anhang) und die Expression des Zytokeratin 14 war in diesen proliferativ aktiven Gewebe am stärksten (Hudson et al., 2001). Zytokeratin 17 wird als Marker benutzt, um benigne von malignen Formen des Brustkrebs zu unterscheiden (Guelstein et al., 1988). Die Gene dieser Gruppe lassen vermuten, dass sie proliferierendes, nicht malignes Gewebe charakterisieren.

Eine weitere Gruppe von Genen umfasst 18 verschiedene Sequenzen, die vielfach eine antiapoptotische Funktion besitzen (in Abb. 13 gelb markiert). So konnte gezeigt werden, dass das „Heat Shock 27 kDa Protein 1“ nach p53 Transfektion in Prostatazelllinien induziert wird (Gao et al., 2000). Weitere Gene in dieser Gruppe sind das BTG3, das den Zellzyklus inhibiert (Guehenneux et al., 1997), LOH11CR2A ein potentieller Tumorsuppressor (Monaco et al., 1997) und TU3A ein in Nierenzellen herunterreguliertes Gen (Wang et al., 2000).

### 4.3 Kandidatengene aus dem Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist ein entwicklungsbiologisch essentieller Signalweg. Durch Bindung von Liganden der Wnt-Familie an die 7-Transmembranrezeptoren der Frizzled-Familie wird in der Zelle eine Signalkaskade aktiviert und über mehrere Stufen in den Zellkern geleitet. Im Zellkern wird die Transkription von wachstumsregulierenden Genen initiiert (Peifer and Polakis, 2000).

Die Rolle des Wnt-Signalweges in verschiedensten Tumoren ließ eine intensivere Betrachtung der Mitglieder dieses Signalweges, die durch Sequenzen auf dem Chip vertreten waren, interessant erscheinen. Die Analyse der Sequenzen auf dem Chip führte zur Identifikation von 49 Probensätzen, die 34 verschiedene Gene des Wnt-Signalweges repräsentieren, von denen der Großteil jedoch keine detektierbare Expression oder aber keine signifikante Herunterregulation in den Prostata Tumoren zeigte. Die Analyse der differentiell exprimierten Gene, nach Auswertung der Chiphybridisierungen, führte zu weiterführenden Untersuchung von zwei Mitgliedern des Wnt-Signalweges.

Die Liganden der Wnt-Familie haben neben den Frizzled Rezeptoren noch weitere Bindungspartner. Zur Initiierung der Kaskade binden die Wnt-Proteine an die extrazelluläre Cystein-reiche Domäne (Cystein Rich Domain, CRD) der Frizzled Rezeptor Proteine. Die Familie der sezernierten Frizzled-ähnlichen Gene (secreted frizzled related protein, sFRP) setzt sich aus fünf bisher bekannten Genen zusammen, besitzt ebenfalls eine Cystein-reiche Domäne, bindet an Wnt-Proteine und fungiert als kompetitiver Inhibitor der Wnt-Signalweiterleitung (Rattner et al., 1997). Wnt bindet zusätzlich noch an weitere Proteine, die keine CRD besitzen wie z. B. Dickkopf, Cerberus und „Wnt Inhibitory Factor-1“ (WIF-1) und ebenso modulierend auf die Signalweiterleitung wirken (Arias et al., 1999).

#### 4.3.1 Wnt Inhibitory Factor 1 (WIF-1)

Als ein Gen des Wnt-Signalweges mit besonders auffälliger Herunterregulation in den Prostata Tumoren erwies sich der „Wnt Inhibitory Factor 1“ (WIF-1). Wie im vorhergehenden Kapitel schon angesprochen, wird die Aktivität des Wnt-Signalweges durch die Bindung der Wnt-Liganden an den Frizzled-Rezeptor gesteuert. WIF-1 ist als Regulator der Aktivität des Wnt-Signalweges durch kompetitive Bindung an den Wnt-Liganden identifiziert worden (Hsieh et al., 1999). Bei dem Protein handelt es sich um ein sezerniertes Protein, das an Wnt-Proteine bindet und ihre Aktivität inhibiert. Von WIF-1 wurden hoch homologe Orthologe in Fisch, Amphibien und Säugern identifiziert.

Die Lokalisation auf dem Chromosom 12q, einer Region, die in 53% der untersuchten Magenadenome (Kim et al., 2001) und in über 50% der untersuchten Gallenblasenkarzinome (Wistuba et al., 2001) ein Verlust der Heterozygosität aufweist, ist in der Prostata bisher nicht durch signifikanten Allelverlust auffällig geworden.

Die cDNA Sequenz von WIF-1 aus der Datenbank GenBank (NM\_007191) hat eine Länge von 2014 bp, die am 3'-Ende noch um weitere 220 bp erweitert werden konnte, wie eine Anzahl von EST-Sequenzen belegen. Diese insgesamt etwa 2200 bp setzen sich auf der genomischen Ebene aus 10 Exons zusammen (s. Abb. 14), überspannen eine Länge von etwa 200 kb auf Chromosom 12q14.3 und acht von zehn Exons liegen auf dem BAC AC016726, während die ersten beiden Exons auf dem BAC AC026124 wiederzufinden sind. Die Sequenz kodiert für ein Protein mit 379 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 41,5 kDa. Das Protein besteht aus einer N-terminalen WIF-Domäne, die noch zusätzlich in den RYK-Tyrosinkinaserzeptoren gefunden wird, und wird gefolgt von fünf EGF-ähnlichen Domänen.

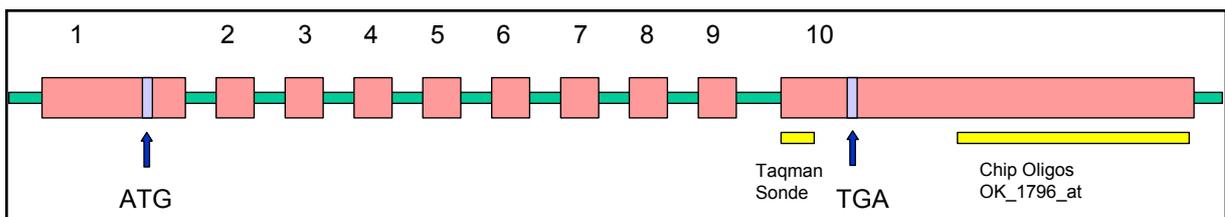


Abb. 14: Exon-Intron Struktur von Wif-1 (nicht skaliert). Position der Taqman Sonde und Chip Oligonukleotide in der Sequenz sind angegeben.

#### 4.3.1.1 Expression von WIF-1 in der Prostata

Die Expression des Gens WIF-1 unterschied sich deutlich für die untersuchten 54 Prostatapatienten in ihren Expressionshöhen zwischen Normal- und Tumorgewebe. Das Gen konnte in den Affymetrix-Genechip-Experimenten in 51 Normalgeweben und nur in 33 der dazu korrespondierenden Tumorgeweben als anwesend detektiert werden.

In neun der Pärchen mit einer detektierten WIF-1 Expression war die Expression in den Tumoren deutlich herunterreguliert (s. Abb. 15). Werden die 18 Patienten mit einer fehlenden Expression im Tumor hinzugerechnet, zeigt WIF-1 eine Herunterregulation in 27 von 54 Patienten (50%) mit Prostatakrebs.

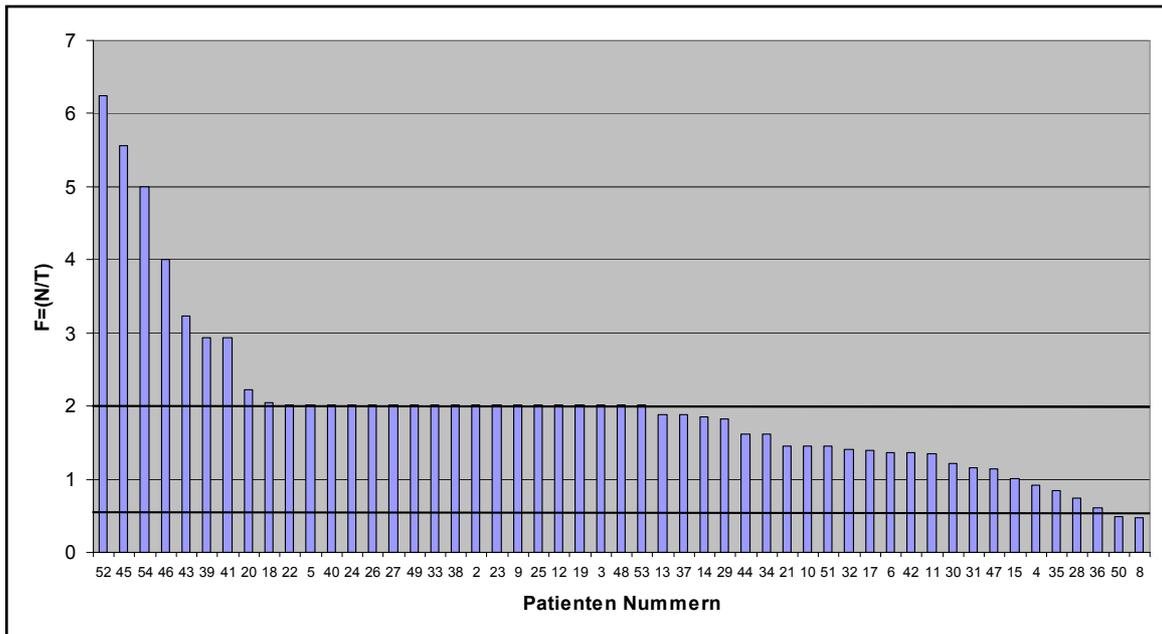


Abb. 15: Affymetrix Chipauswertung und Berechnung der Faktoren  $F(N/T)$  des Gens WIF-1 in 51 von 54 als anwesend detektierten Prostatageweben. Für die Prostatapatienten sind die entsprechenden Patienten Nummern angegeben (s. Anhang). Für 14 Prostatatumore mit fehlender Expression wurde ein Faktor von  $F=2,01$  eingesetzt. Die Grenzlinien  $F=2$  und  $F=0,5$  sind hervorgehoben.

Die deutliche Herunterregulation von WIF-1 in Prostatatumoren in Affymetrix-Genechip-Experimenten konnte zusätzlich durch Expressionsuntersuchungen in Taqman Analysen bestätigt werden. In den 14 untersuchten Patienten konnte in neun Patienten eine Herunterregulation der Expression in den Tumoren um ein Vielfaches beobachtet werden (s. Abb. 16). Die Rate der Herunterregulation ist in der Taqman Analyse deutlich höher als die

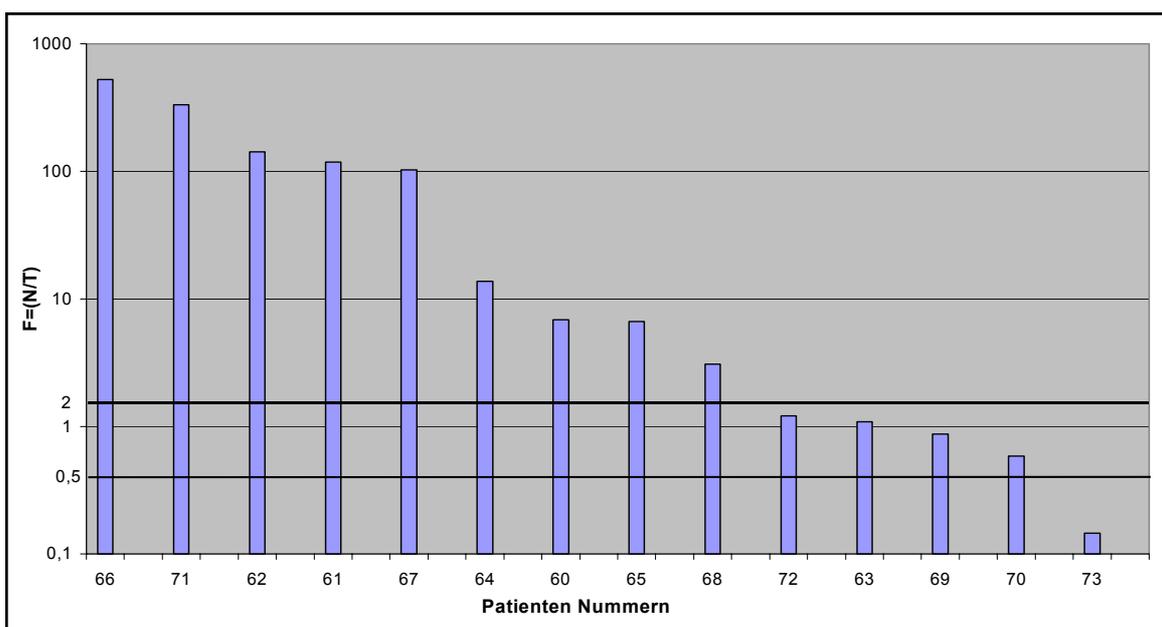


Abb. 16: Logarithmische Darstellung der differentiellen Expression in der Taqman Analyse von WIF-1 in 14 Prostatatumor-Patienten. Die beiden Schwellenwerte  $F(N/T)=2$  bzw.  $F(N/T)=0,5$  sind verstärkt hervorgehoben.

zuvor durch Affymetrix Genechip Experimente ermittelte Herunterregulation in 50% der Tumoren. Lediglich bei einem der untersuchten Patienten war eine Heraufregulation der WIF-1 Expression beobachtet worden.

#### 4.3.1.2 Expression von WIF-1 in verschiedenen Normal- und Tumorgeweben

Die Analyse von WIF-1 im elektronischen Northern ergab keine Signifikanz für eine Expressionsregulierung, da WIF-1 auf Grund seiner geringen Expressionshöhe nur durch sehr wenige EST-Sequenzen in den Datenbanken repräsentiert wurde.

Zur weiteren Untersuchung der Expression des WIF-1 wurden Northernblots von 16 verschiedenen Normalgeweben der Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg) mit einer Sonde des WIF-1 Genes hybridisiert („Multiple Tissue Northern Blot“ I und II). Die Northern Sonde wurde durch eine PCR auf der cDNA aus Prostata Normalgewebe hergestellt und umfasst den Sequenzbereich von 330 bis 2240 bp.

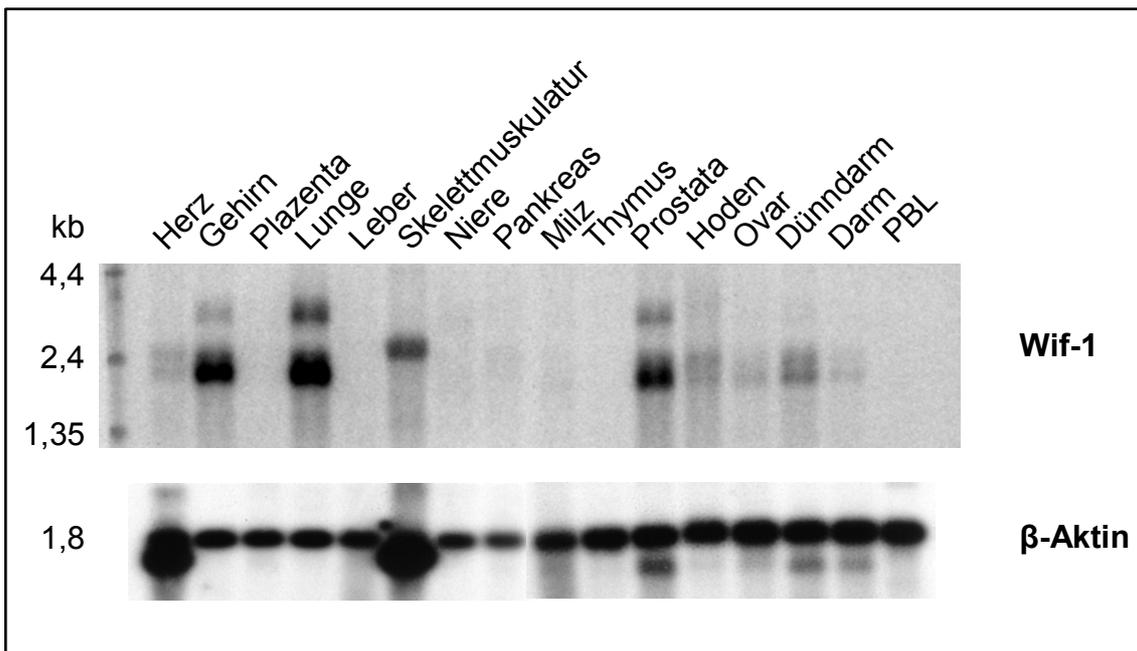


Abb. 17: Hybridisierung der „Multiple Tissue Northern (MTN™) Blots“ I und II (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) mit einer WIF-1 und  $\beta$ -Aktin Sonde. Die Markierung des Größenstandards sind am rechten Rand in Kilobasen (kb) angegeben.

Wie Abb. 17 zeigt, ist die Expression von WIF-1 gewebespezifisch mit einer erhöhten Expression in Gehirn, Lunge, Skelettmuskel und Prostata sowie einer geringen Expression in Hoden, Ovar und Dünndarm. Zusätzlich zu den unterschiedlichen Expressionshöhen wurden

auch noch verschiedene Transkripte in den einzelnen Geweben beobachtet. In Gehirn, Lunge und Prostata wurden zusätzlich zu dem erwarteten 2,2 kb Transkript noch ein Transkript von ungefähr 3 kb beobachtet, das in den anderen Geweben nicht zu beobachten ist. In der Skelettmuskulatur ist sogar ausschließlich ein Transkript von etwa 2,5 kb zu beobachten. Diese unterschiedlichen Transkripte konnten durch Hsieh et al. (1999) in Northern Hybridisierungen für das Maus Ortholog WIF-1 nicht beobachtet werden, da sie ein einzelnes Transkript, mit einer Expression verstärkt in Herz und Lunge und reduziert in Gehirn und Auge, beobachteten.

Die Analyse des WIF-1 in anderen Geweben zeigt darüber hinaus auch eine Herunterregulation der Expression in Tumoren von Brustkrebs Patientinnen. Die Sonde wurde auf einen „Matched Tumor/Normal Expression Array“ der Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg) hybridisiert, der punktförmig die cDNAs von Normal- und Tumorgewebe verschiedener Gewebetypen von 68 individuellen Patienten trug. Wie Abb. 18 zeigt, war die Expression von WIF-1 in sechs von neun Brustpatienten im Normalgewebe detektierbar, jedoch in keinem der dazu korrespondierenden Tumorgewebe. In den drei vorhandenen Lungentumorpatienten war eine Expression von WIF-1 nur in den drei Normalgeweben, aber nicht in den korrespondierenden Tumorgewebe möglich. Der Vergleich mit der Hybridisierung von  $\beta$ -Aktin zeigt eine in etwa gleichmäßige Beladung der einzelnen Punkte mit cDNAs der Normal- und Tumorgewebe. Für die anderen Gewebe auf der Membran waren entweder keine oder nur vereinzelte Signale zu erkennen.

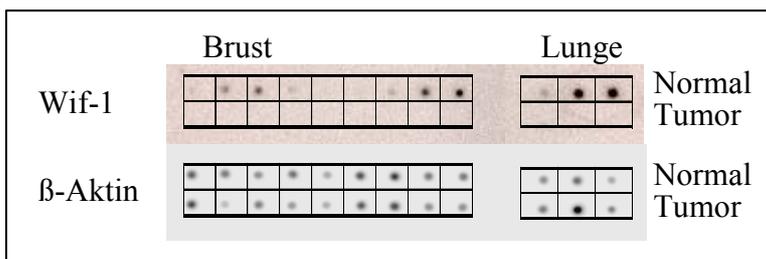


Abb. 18: Hybridisierungsergebnisse der Sonden von WIF-1 und  $\beta$ -Aktin auf einen „Matched Tumor/Normal Expression Array“ (Invitrogen, Karlsruhe) für die Brust- und Lungentumor Patienten. In der oberen Reihe sind jeweils die Normalgewebe und in der unteren Reihe die korrespondierenden Tumorgewebe eines Patienten aufgetragen.

Für Patientinnen mit Brustkrebs konnte diese differentielle Expression durch Affymetrix-Genchip-Experimente und bei sieben von acht untersuchten Tumor-/Normalgewebe Paaren in der Taqman Untersuchung bestätigt werden. Die Tumore zeigten vielfach keine detektierbare oder nur sehr schwache WIF-1 Expression.

#### 4.3.1.3 Immunhistochemie an Gewebeschnitten der Harnblase

Zur immunhistochemischen Färbung von Schnitten der Prostata und Harnblase wurde der bereits validierte Kaninchen Anti-WIF-1-Antikörper eingesetzt (Hsieh et al., 1999). Abb. 19 zeigt für die Prostata ein differenziertes Bild, da eine positive Färbung nicht nur in den Normalepithelien zu beobachten ist, sondern auch in hochgradigen schlecht differenzierten Tumoren. Der Bereich des niedrig gradigen und gut differenzierten Tumors zeigt keine Färbung. Von den 46 verschiedenen Harnblasentumoren konnte in 34 Patienten eine deutliche Expression in den Tumorbereichen und in den zum Teil vorhandenen Normalurothelien gezeigt werden. In 12 Patienten war keine Färbung des Tumors ersichtlich, trotz einer Färbung der ebenfalls zum Teil vorhandenen Normalgewebe. Die Häufigkeit des Verlustes der WIF-1 Proteinexpression war in den Tumoren des pTa-Stadiums deutlich geringer als in weiter fortgeschrittenen Tumoren der Stadien pT1-4.

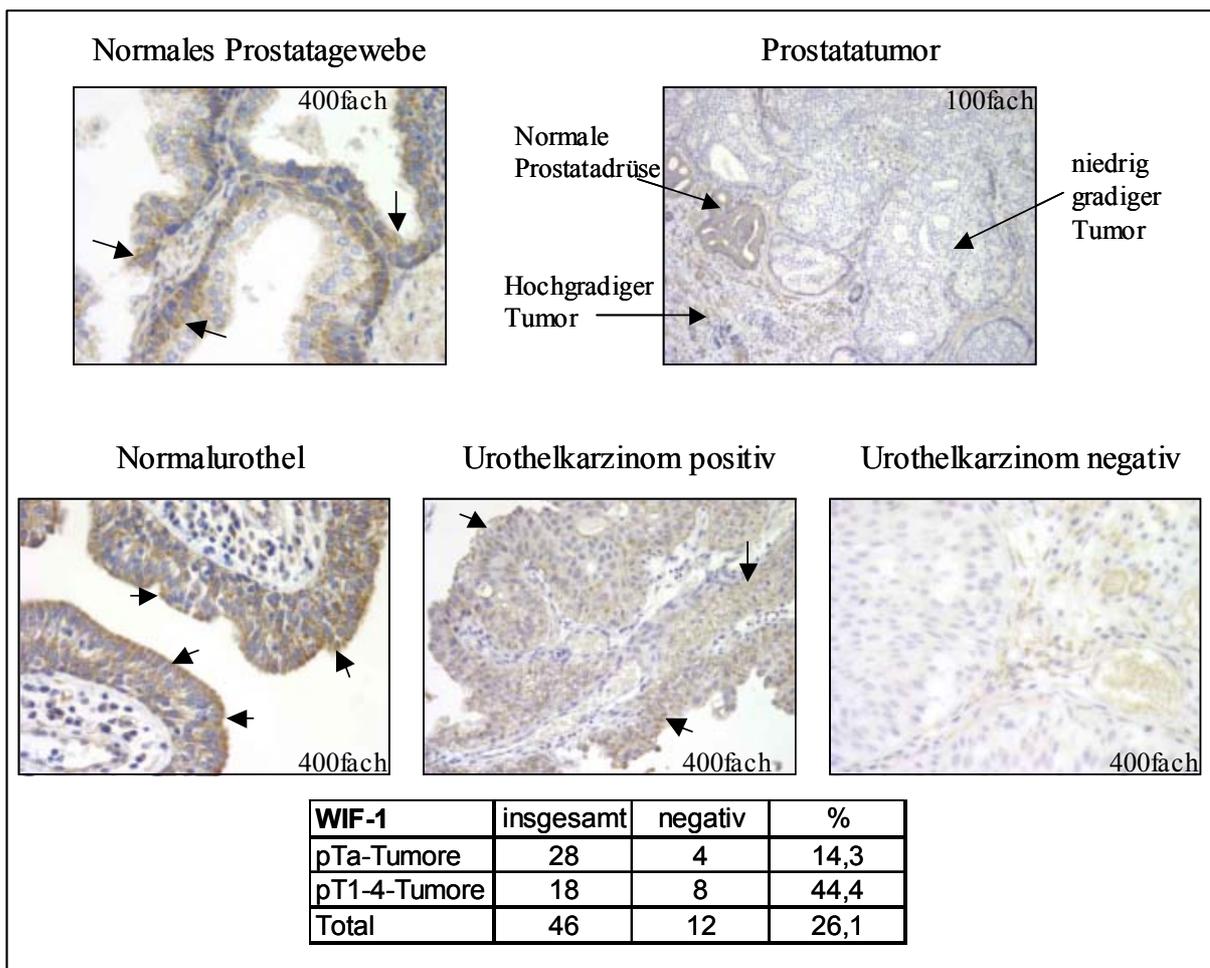


Abb. 19: Immunhistochemische Färbung mit Wif-1 von zwei Prostata und drei Harnblasenschnitten. Gefärbt wurden die Schnitte mit DAB (braun) und die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gefärbt. Beispiele positiver Färbungen sind in den Bildern jeweils durch Pfeile markiert. Die Vergrößerungen sind in den Bildern angegeben. Für die Harnblasentumoren ist die Auswertung 46 untersuchten Patienten angegeben.

### 4.3.2 Secreted frizzled related protein 1 (sFRP1)

Ein weiteres Gen des Wnt-Signalwegs auf dem Affymetrix-Chip, mit einer zu dem WIF-1 ähnlichen Funktion, ist das „secreted Frizzled-Related Protein 1“ (sFRP1). Auch das sFRP1 reguliert durch kompetitive Bindung an den Wnt-Liganden die Aktivität des Signalweges. Seine chromosomale Lokalisation in der Region 8p11.22, einer Region mit vielfachen Verlusten, macht es neben seiner Funktion für die Suche nach einem potentiellen Tumorsuppressor Kandidatengem interessant.

1999 konnten Ugolini et al. sFRP1 in Brusttumoren als ein differentiell exprimiertes Gen identifizieren. Ein Transkript des Gens war in vergleichenden Hybridisierung von totaler RNA aus fünf Paaren von Normal- und Tumorgewebe der Brust auf cDNA-Chips im Tumor nicht detektierbar. Eine eingehende Expressionsanalyse durch Northern-Untersuchungen an 90 malignen Tumoren im Vergleich zu 16 benignen Gewebe der Brust zeigte eine Herunterregulation in 78% der malignen, aber nur in 19% der benignen Gewebe. Weitere Untersuchungen (Ugolini et al., 2001) zeigten eine mRNA Expression des Gens durch *in-situ* Färbung in epithelialen Bereichen der normalen Brust sowie einen Verlust der Expression in 80% der Brusttumore.

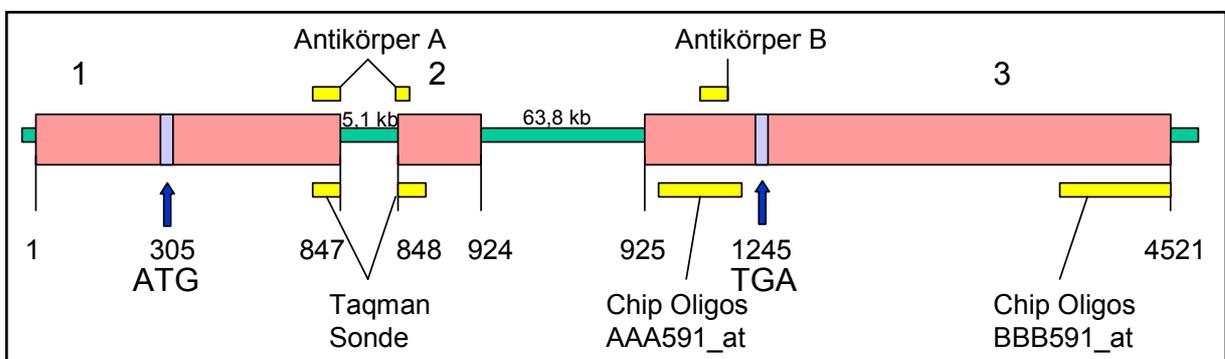


Abb. 20: Exon-Intron Struktur von sFRP1 (nicht skaliert). Die Position der Antigene zur Antikörperimmunisierung, Taqman Sonde, Chip Oligonukleotide und Intron-Exonübergänge in der Sequenz sind angegeben.

sFRP1 wurde durch eine Homologiesuche von mehreren Frizzled Sequenzen in EST-Datenbanken identifiziert und kloniert (Rattner et al., 1997) und ist in der Literatur noch unter den Namen FRP1 (Finch et al., 1997) oder secreted Apoptosis-Related Protein 2 (SARP2) bekannt. SARP2 wurde in etwa zur gleichen Zeit wie sFRP1 durch einen „Differential Display“-Ansatz in einer Suche nach Apoptose beteiligten Genen identifiziert (Melkonyan et al., 1997). Eine stabile Transfektion der Brustadenocarcinom Zelllinie MCF7 mit sFRP1 zeigte eine erhöhte Sensitivität der Zellen auf verschiedene proapoptotische Stimuli.

Die mRNA hat eine Länge von 4469 bp (NM\_003012) und kodiert für ein Protein mit 313 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 35,3 kDa. Die drei Exons des sFRP1 erstrecken sich auf Chromosom 8p11.22 an der physikalischen Position 43,6 Mb über einen Bereich von etwa 73 kb (s. Abb. 20).

#### 4.3.2.1 Expression von sFRP1 in der Prostata und Harnblase

Die Expression von sFRP1 in den 54 untersuchten Prostatatumor-Patienten war nicht signifikant reguliert. In 52 der 54 Patienten wurde das sFRP1 Transkript in beiden Prostataprobe detektiert. Im Gegensatz dazu war eine Expression des sFRP1 in nur drei von 58 Blasenproben zu detektieren. Auf Grund der Schwierigkeit der Mikrodissektion von Epithelgeweben der normalen Blase waren in der Serie der 58 Blasenproben nur vier nicht maligne Proben vorhanden. sFRP1 wurde in einer nicht malignen und in zwei malignen Proben exprimiert. Da die Anzahl der benignen Blasenproben für eine genaue Aussage bei einer nur insgesamt geringen Expressionshöhe zu wenig sind, konnten die Affymetrix Chips keine signifikante Aussage zu einer möglichen differentiellen sFRP1 Expression geben.

Zur Untersuchung der Expression von sFRP1 in Tumoren der Harnblase wurde eine Sonde des sFRP1 Gens auf einen Blasentumorblot hybridisiert. Die verschiedenen von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) angebotenen humanen Tumorblots tragen jeweils 20 µg totale RNA von vier verschiedenen Patienten mit einem Krebstyp.

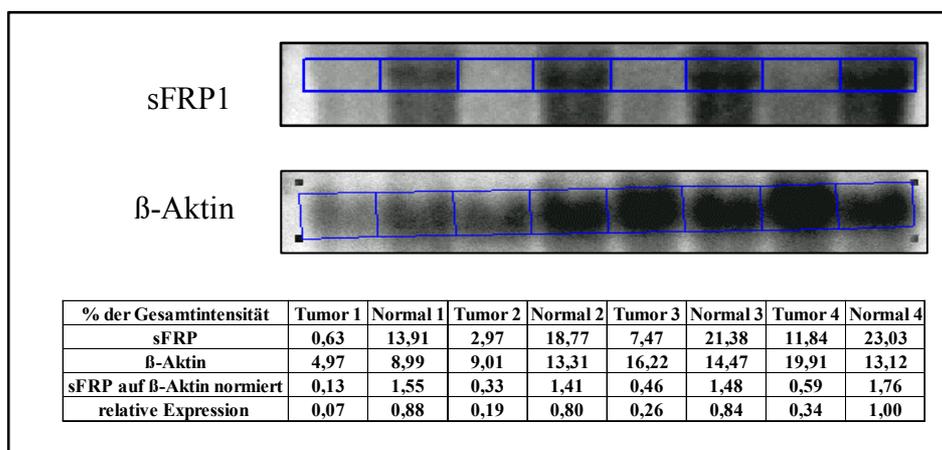


Abb. 21: Northern-Hybridisierung des sFRP1 und  $\beta$ -Aktin auf einen Northernblot mit Blasentumoren der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Die Tabelle gibt die Quantifizierungen der Signalintensitäten durch die ImageQuant Software in den einzelnen Patienten an. Die Expression des sFRP1 wurde auf die Expression des  $\beta$ -Aktin normiert und der höchste Wert wurde als relativer Bezugspunkt =1 gesetzt.

Wie aus Abb. 21 ersichtlich, ist die sFRP1 Expression in den Tumoren gegenüber den korrespondierenden Normalgeweben deutlich erniedrigt. Die Kontrolle mit dem Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin zeigt leichte Variationen in der Beladung der einzelnen Geltaschen, jedoch ist dies nicht die Ursache der unterschiedlich stark ausgeprägten Expressionshöhen von sFRP1. Die Expressionen von sFRP1 wurden auf  $\beta$ -Aktin normiert und zur einfacheren Vergleichbarkeit in relativen Bezug zu dem am stärksten sFRP1 exprimierenden Gewebe gesetzt. Bei allen vier Patienten war die Expression mindestens um den Faktor drei heruntergesetzt und beim Patienten Nr. 1 sogar um den Faktor 12.

#### 4.3.2.2 Elektronischer Northern von sFRP1

Die *in silico* Untersuchung der Expression des sFRP1 durch den elektronischen Northern zeigte für die beiden Gewebe Brust und Blase eine hoch signifikante Herunterregulation der Expression in den Tumoren und eine deutliche Herunterregulation in Tumoren des Uterus und der Niere (s. Tab. 9). So sind z. B. von 25.643 Sequenzen der Blasennormalgewebe-Bibliothek 11 Sequenzen unter den vorgegebenen Parametern als identisch erkannt worden. Da in der deutlich größeren Blasentumorgewebe-Bibliothek nur eine Sequenz identifiziert wurde, ist die Herunterregulation von sFRP1 im Blasentumor, nach statistischer Bewertung mit einem P-Wert von  $P < 0,05$ , als signifikant zu betrachten.

	NORMAL		TUMOR		Wert N/T	P-Wert	SIG
	Treffer	Gesamtanzahl	Treffer	Gesamtanzahl			
B-Lymphome	1	108541	1	7357	0.07	0.123	87.7
Blase	11	25643	1	42553	18.25	0.000167	100
Gehirn	7	184386	9	100222	0.42	0.113	88.7
Brust	72	120725	3	67582	13.44	8.74E-11	100
Darm	2	52193	0	35112	-	0.519	48.1
Endocrines Gewebe	6	62283	2	61769	2.98	0.289	71.1
Herz	4	98508	0	7275	-	1	0
Niere	24	50214	3	20741	3.3	0.0538	94.6
Leber	3	21510	1	15763	2.2	0.643	35.7
Lunge	2	102742	1	54085	1.05	1	0
Skeletalmuskel	5	58318	3	27070	0.77	0.714	28.6
Ovar	0	33687	2	41736	-	0.506	49.4
PBL	0	127720	0	941	-	-	-
Pankreas	0	60513	0	21810	-	-	-
Prostata	4	106099	3	76769	0.96	1	0
Haut	8	27206	0	1180	-	1	0
Dünndarm	5	36435	1	9383	1.29	1	0
Magen/Speiseröhre	0	13800	0	12120	-	-	-
T-Lymphome	0	60721	0	17316	-	-	-
Hoden	5	24903	1	16899	3.39	0.412	58.8
Uterus	17	73176	0	21735	-	0.0188	98.1
Alle Gewebe	176	1449323	31	659418	2.58	1.07E-07	100

Tab. 9: Elektronischer Northern von sFRP1.

#### 4.3.2.3 Differentielle Expression von sFRP1 in Brust-, Niere-, Uterus- und Darmgewebe

Die Expression von sFRP1 ist gewebespezifisch reguliert mit einer besonders starken Expression im Herzen, den Hoden und dem Ovar und einer geringeren Expression in Niere, Prostata, Dünndarm und Darm (Melkonyan et al., 1997). Die bereits durch Ugolini et al. (1999) und im elektronischen Northern beobachtete differentielle Expression des sFRP1 in der Brust konnte durch Hybridisierung einer Sonde des Gens auf einen „Matched Tumor/Normal Expression Array“ bestätigt werden (s. Abb. 22). Zusätzlich war sFRP1 wie im elektronischen Northern auch in Nierentumoren deutlich herunterreguliert, während die Herunterregulation in Uterustumoren nur in zwei von sieben Fällen bei einer gleichzeitigen Hochregulation in mindestens drei Patienten beobachtet werden konnte. Des Weiteren zeigte der Northernblot eine deutliche Herunterregulation des Gens in Darmtumoren, für die der elektronische Northern keine Aussage geben konnte auf Grund einer zu geringen Zahl von ESTs.

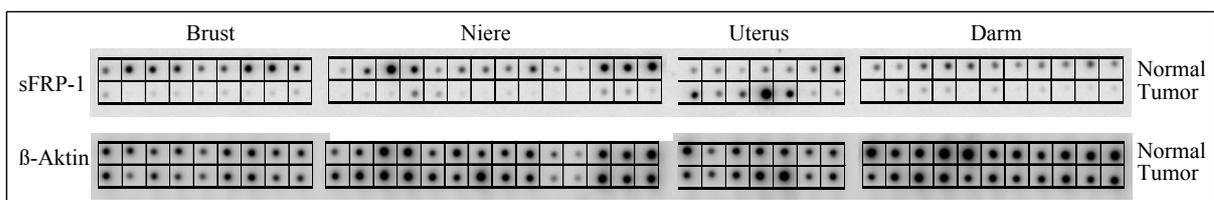


Abb. 22: Hybridisierungsergebnisse der Sonden von sfrp1 und β-Aktin auf einen „Matched Tumor/Normal Expression Array“ (Invitrogen, Karlsruhe) für die Brust-, Nieren-, Uterus- und Darmtumor Patienten. In der oberen Reihe sind jeweils die Normalgewebe und in der unteren Reihe die korrespondierenden Tumorgewebe eines Patienten aufgetragen.

#### 4.3.2.4 LOH auf Chromosom 8p in Blasentumoren

Zur Untersuchung des Verlusts eines Allels in primären Harnblasenkarzinomen wurden 99 Patienten ausgewählt und die Heterozygotität an neun verschiedenen Markern, speziell in den Regionen centromer- und telomerwärts von 8p12 und 8p22, getestet. 24 % der untersuchten mikrodissezierten Tumoren zeigten LOH an mindestens einem Marker aus der Region 8p. Zur Bestätigung der gefundenen LOH Ergebnisse wurden 15 Patienten mit einem Verlust in der Region 8p12 mit einer FISH-Analyse untersucht. Die FISH-Analyse wurde mit dem zuvor für sFRP1 positiv identifizierten BAC 549L18 aus der Bibliothek KN071 von Research Genetics (Huntsville, USA) durchgeführt. Für alle 15 untersuchten Patienten wurden hemizygoten Deletionen bestätigt.

Tumor	n	Deletion auf 8p (allgemein)	Deletion auf 8p, inkl. 8p12	Deletion auf 8p, aber keine Deletion auf 8p12	Deletion auf 8p12 (ausschließlich)	FISH Analyse durchgeführt
pTaG1	13	2	1	1		0/2
pTaG2	14	1		1		1/1
pTaG3	1					
pT1G2	12	4	3	1		3/4
pT1G3	35	13	8	2	3	9/13
pT2aG3	1	1	1			0/1
pT2bG3	1	1			1	0/1
pT2G3	16	2	1		1	2/2
pT3aG3	1					
pT3bG3	1					
pT3G3	1					
pT4aG3	2					
pT4G3	1					
Gesamt	99	24	14	5	5	

Tab. 10: LOH Ergebnisse für 99 Primär Tumore der Harnblase mit Aufgliederung nach den entsprechenden Stadien und Graden, auf Chromosom 8p. In 15 der 24 Tumoren mit LOH wurde mit FISH Analyse der hemizygoten Verlust eines Allels bestätigt (A. Hartmann, Regensburg).

Zur Suche nach Mutationen wurden die Exons und angrenzenden Intronbereiche der Patienten mit einem identifizierten Verlust eines Allels in der Region 8p12 sequenziert (E. Klopocki, metaGen Pharmaceuticals GmbH), ohne jedoch eine Abweichung vom Wildtyp identifizieren zu können.

#### 4.3.2.5 Immunhistochemie an Gewebeschnitten der Harnblase

Zum Test der Proteinexpression wurden polyklonale Antikörper gegen spezifische Peptide des Proteins von sFRP1 durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Die affinitätsgereinigten Antikörperseren wurden auf ihre Spezifität getestet, indem unter anderem die konzentrationsabhängige Bindung des Antikörpers an das bakteriell exprimierte Protein überprüft wurde. Die Antikörper erkannten spezifisch Fragmente des bakteriell exprimierten sFRP1 Proteins, erzeugten in Western Hybridisierungen eine spezifische Bande und ließen sich in Konkurrenzexperimenten inhibieren. Die Antikörper-Tests zeigten für den sFRP1-AKb eine deutlich höhere Sensitivität, so dass für weitere Untersuchungen nur noch dieser Antikörper verwendet wurde.

An einer Serie von 46 Harnblasenkarzinomen konnte die Expression des sFRP1-Proteins in der Immunhistochemie getestet werden. Von den 46 verschiedenen Patienten konnte in 34 Patienten eine deutliche Expression in den Tumorbereichen und in den zum Teil vorhandenen Normalurothelien gezeigt werden. In Abb. 23 ist deutlich die Färbung der mehrschichtigen

entarteten Urothelien des ersten Patienten zu erkennen, während der zweite Patient keine Urothelfärbung zeigte. Bei einer prinzipiell erfolgreichen Färbung des Schnitts, im Fall des zweiten Patienten auf Grund einer geringen Färbung von Blutgefäßen, zeigten 26% der untersuchten Patienten also einen deutlichen Verlust der sFRP1 Proteinexpression in papillären Blasentumoren. Eine Korrelation des Verlustes der sFRP-1 Proteinexpression mit dem Tumorgrad oder Stadium wurden nicht beobachtet.

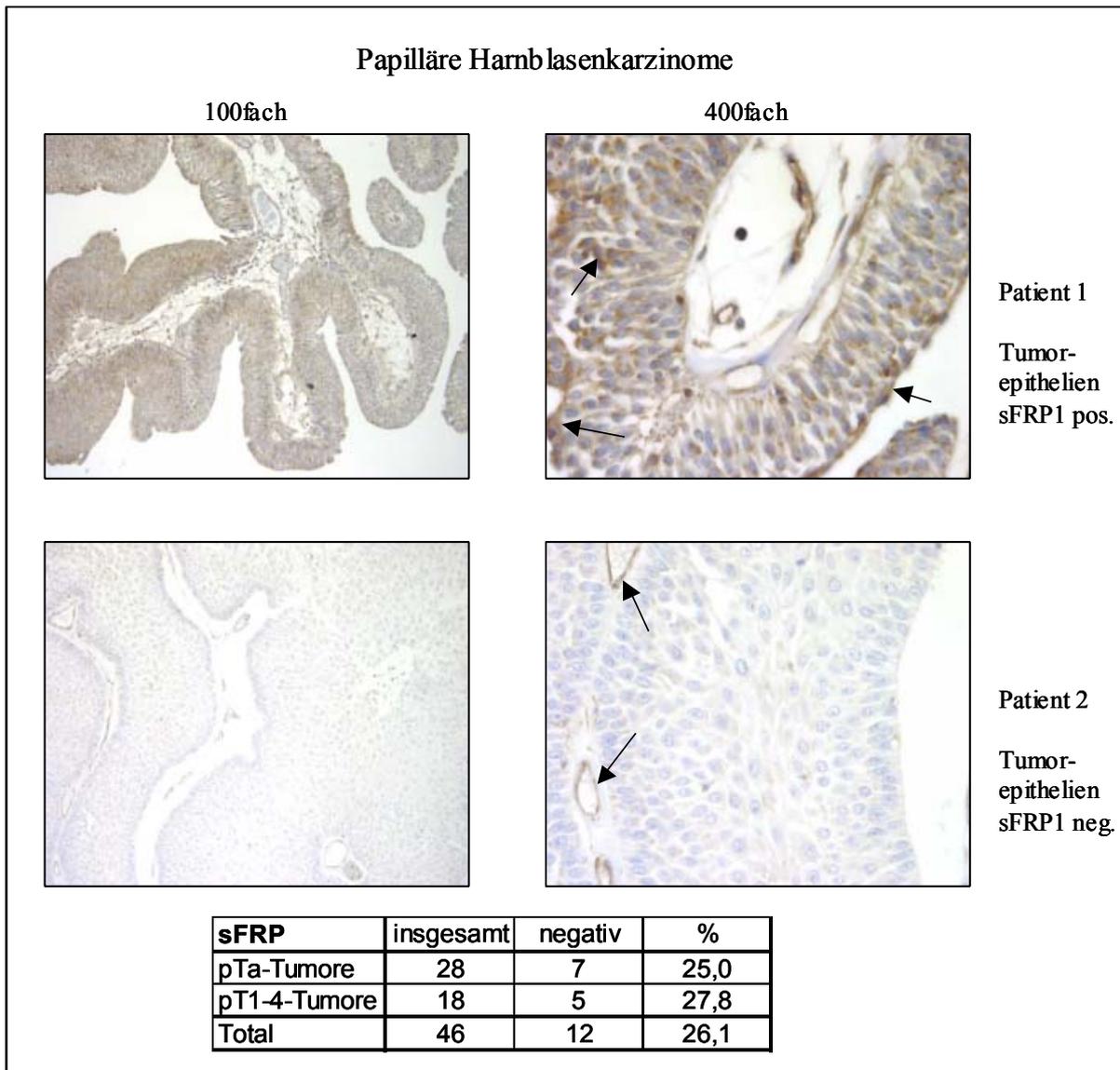


Abb. 23: Immunhistochemie der Expression von sFRP1 in papillären Harnblasentumoren. Gefärbt wurden die Schnitte mit DAB (braun), die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gegengefärbt. Es sind von zwei verschiedenen Patienten jeweils ein Schnitt in 100facher und 400facher Vergrößerung nebeneinander dargestellt. Von den untersuchten 46 Patienten war die Färbung der Harnblasentumoren in 26,1% der Fälle negativ, trotz einer positiven Färbung in umgebenden Normalurothelien. Beispiele für positive Färbungen sind in den Vergrößerungen durch Pfeile markiert.

#### 4.4 Chimerin-1, ein Kandidatengen aus dem Ras-Signalweg

Für weiterführende Untersuchung der in den Chipexperimenten differentiell exprimierten Gene, wurden Gene eines weiteren onkologisch bedeutenden Signalweg ausgewertet. Bei dem Ras-Signaltransduktionsweg handelt es sich um einen in zahlreichen Tumoren auf verschiedenen Ebenen regulierten Signaltransduktionsweg (Pruitt and Der, 2001).

99 Probensätze des metg001A Affymetrix Genechip konnten als Mitglieder oder assoziierte Sequenzen identifiziert werden, die 66 verschiedene Gene repräsentieren. Von diesen Sequenzen zeigte ein Drittel der Sequenzen keine detektierbare Expression. Die überwiegende Zahl der exprimierten Gene zeigte keine signifikante Regulation, während sich aus der Gesamtheit der Gene Chimerin-1 als ein besonders deutlich in Prostatumoren herunterreguliertes Gen herausstellte.

Chimerin-1 ist ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für das Ras-verwandte p21rac. Auf Grund seiner Funktion als GAP für Mitglieder der Rho-Familie wird es auch RhoGAP2, ARHGAP2 oder n-Chimerin bezeichnet. Die mRNA hat eine Länge von 2142 bp (NM\_001822) und kodiert für ein Protein mit 459 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 50,7 kDa. Neben einer RhoGAP Domäne, die für die Aktivierung der GTPase Aktivität der Rho-Proteine verantwortlich ist, besitzt Chimerin-1 eine SH2-Domäne und eine Phorbolster/Diacylglycerol-Bindungsdomäne (C1 Domäne). Die Lokalisation von Chimerin-1 ist in der Region 2q31-q32.1, einer Region, die mit verminderter Häufigkeit auch in Prostatumoren verloren ist (Alers et al., 2000), in Blasen Tumoren jedoch mit einem höheren Tumorgrad assoziiert wurde (Zhao et al., 1999). Das Gen setzt sich in einem Bereich von 208 Kb aus 13 Exons zusammen, das alternative Spleißen der SH2-Domäne ist bekannt (Exons 5 und 6 in Abb. 24) und eine differentielle Expression der Spleißvarianten konnte gezeigt werden (Hall et al., 1993).

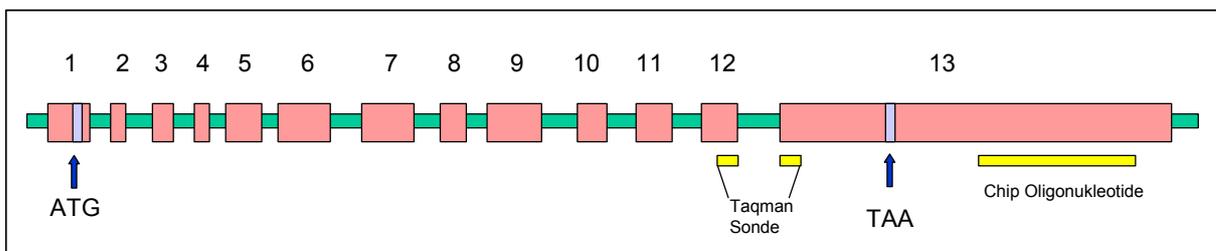


Abb. 24: Exon-Intron Struktur von Chimerin-1 (nicht skaliert). Position der Taqman Sonde und Chip Oligonukleotide in der Sequenz sind angegeben.

#### 4.4.1 Expression von Chimerin-1 in der Prostata

Die Analyse der Chipergebnisse für die 54 Prostataprobeumpaare zeigte eine deutliche Herunterregulation der Chimerin-1 Expression in Prostatatumoren. In 44% der untersuchten Prostatapatienten war die Expression des Chimerin-1 im Tumor herunterreguliert (s. Abb. 25).

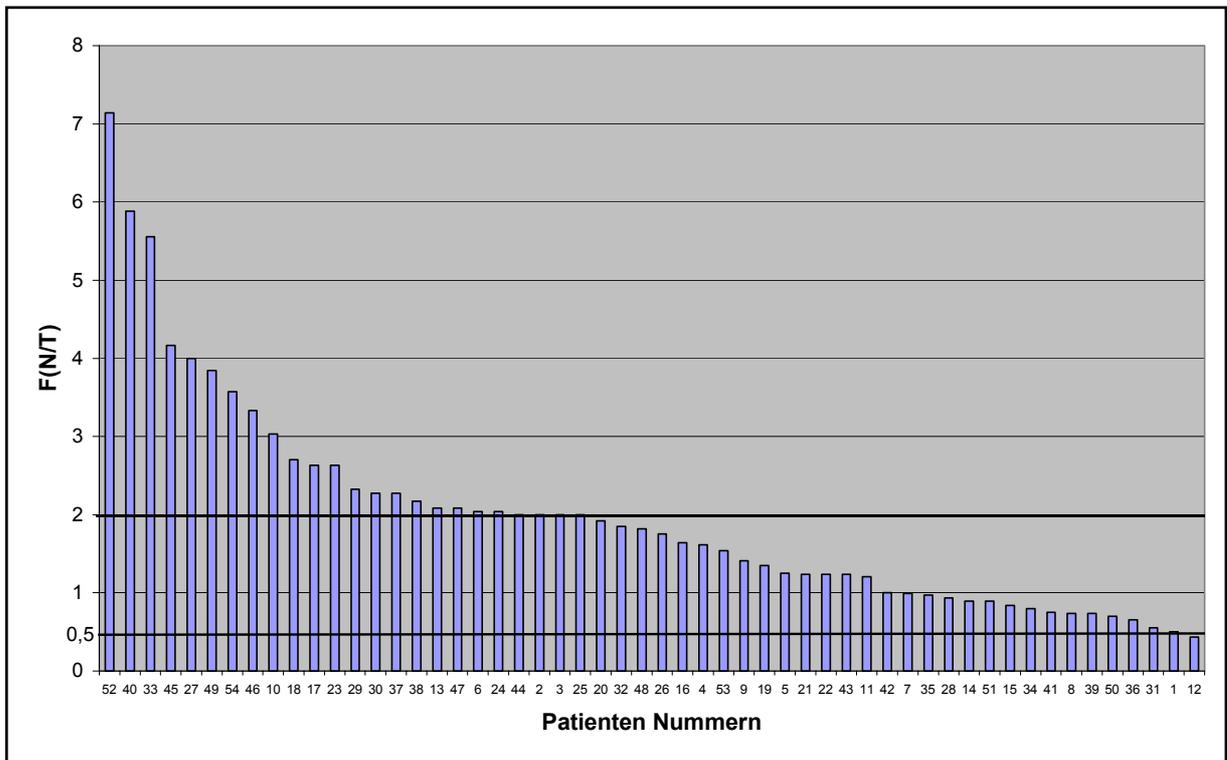


Abb. 25: Affymetrix Chipauswertung und Berechnung der Faktoren  $F(N/T)$  des Gens Chimerin-1 in 54 untersuchten Prostatageweben. Für die Prostatapatienten sind die entsprechenden Patienten Nummern angegeben (s. Anhang). Die Grenzlinien  $F=2$  und  $F=0,5$  sind hervorgehoben.

Mit einer vergleichbaren Deutlichkeit wurde die differentielle Expression durch Untersuchungen in der quantitativen Taqman PCR bestätigt (s. Abb. 26). Von den untersuchten 15 Patientenproben war die Expression in 7 Patienten herunterreguliert und nur in einem Patienten heraufreguliert. Die Höhe der beobachteten Expressionsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe entspricht in etwa den in den Chipexperimenten gemachten Beobachtungen.

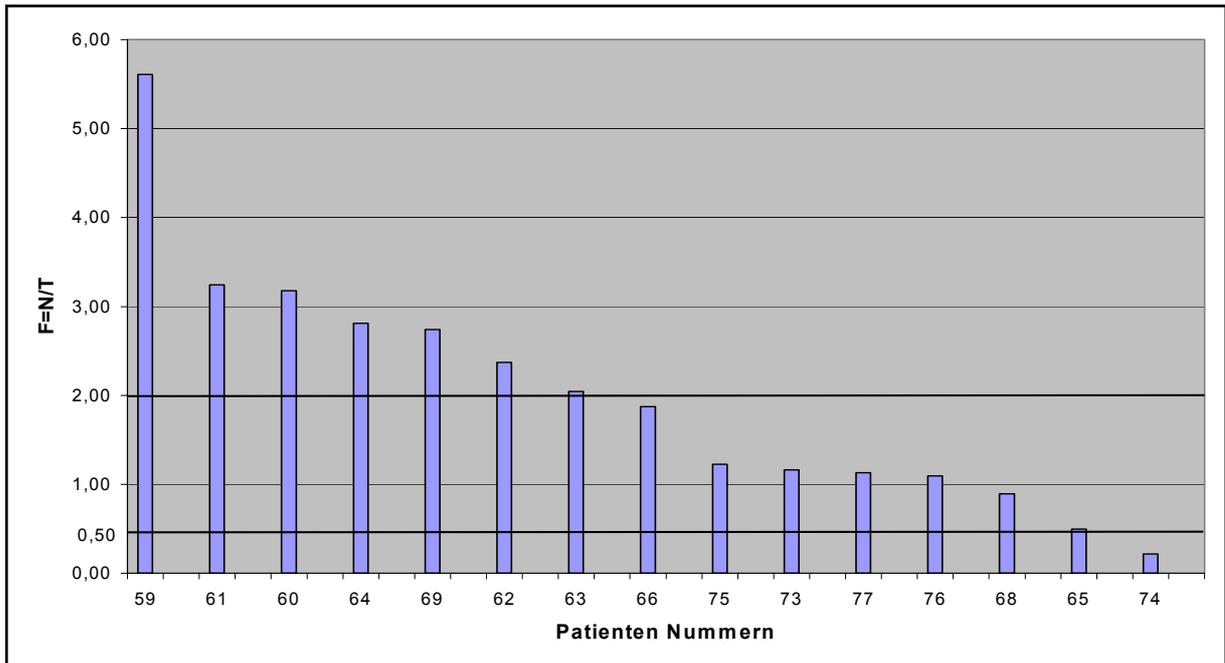


Abb. 26: Darstellung der differentiellen Expression von Chimerin-1 in 15 Prostata-Tumor-Patienten in der Taqman Analyse. Die beiden Grenzwerte  $F(N/T)=2$  bzw.  $F(N/T)=0,5$  sind verstärkt hervorgehoben.

#### 4.4.2 Elektronischer Northern von Chimerin-1

Der elektronische Northern von Chimerin-1 zeigt deutlich eine spezifische Expression des Gens im Gehirn. In den übrigen Geweben ist Chimerin-1 vermutlich gering exprimiert, so dass aus diesen Geweben nur einige sehr wenige ESTs zur Verfügung stehen.

	NORMAL		TUMOR		Wert N/T	P-Wert	SIG
	Treffer	Gesamtanzahl	Treffer	Gesamtanzahl			
B-Lymphome	0	108541	0	7357	-	-	-
Blase	1	25643	0	42553	-	0.376	62.4
Gehirn	121	184386	4	100222	16.44	4.95E-18	100
Brust	0	120725	0	67582	-	-	-
Darm	0	52193	0	35112	-	-	-
Endocrines Gewebe	1	62283	0	61769	-	1	0
Herz	2	98508	0	7275	-	1	0
Niere	0	50214	0	20741	-	-	-
Leber	0	21510	0	15763	-	-	-
Lunge	1	102742	1	54085	0.53	1	0
Skeletalmuskel	0	58318	0	27070	-	-	-
Ovar	0	33687	3	41736	-	0.259	74.1
PBL	1	127720	0	941	-	1	0
Pankreas	1	60513	0	21810	-	1	0
Prostata	1	106099	2	76769	0.36	0.576	42.4
Haut	0	27206	0	1180	-	-	-
Dünndarm	0	36435	0	9383	-	-	-
Magen/Speiseröhre	0	13800	0	12120	-	-	-
T-Lymphome	0	60721	0	17316	-	-	-
Hoden	1	24903	0	16899	-	1	0
Uterus	0	73176	0	21735	-	-	-
Alle Gewebe	130	1449323	10	659418	5.91	6.53E-12	100

Tab. 11: Elektronischer Northern von Chimerin-1.

#### 4.4.3 Expression von Chimerin-1 in verschiedenen Normalgeweben und Zelllinien

Die Expression von Chimerin-1 in verschiedenen Normalgeweben wurde über eine Quantifizierung der exprimierten RNA durchgeführt. Aus der Poly-A<sup>+</sup>-RNA aus 22 Normalgeweben (BD Biosciences Clontech, Heidelberg und Invitrogen, Karlsruhe) und 9 Zelllinien (ATTC, Manassas, USA) wurde cDNA hergestellt und das Chimerin-1 Transkript durch Taqman PCR amplifiziert und quantifiziert. Normiert wurden die gewebespezifischen Expressionswerte mit dem Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin. Als relativer Bezugspunkt der Expressionswerte der verschiedenen Gewebe und Zelllinien wurde die Expression von Ponsin in Prostata Normalgewebe =1 gesetzt. Die im elektronischen Northern beobachtete Gehirnspezifität der Expression von Chimerin-1 wird in Abb. 27 deutlich bestätigt. Bei einer starken Expression von Chimerin-1 im Gehirn und wird das Gen schwach in Prostata, Plazenta, Hirnanhangdrüse, Lunge und in den Prostatazelllinien PC3 und DU145 exprimiert. Auch wenn der Hauptexpressionsort des Chimerin-1 vermutlich im Gehirn liegt, so ist das Gen, wie zuvor in der Analyse der Prostatatumorproben gezeigt, im Gegensatz zur schwachen Expression im Normalgewebe im Tumor noch deutlich herunterreguliert.

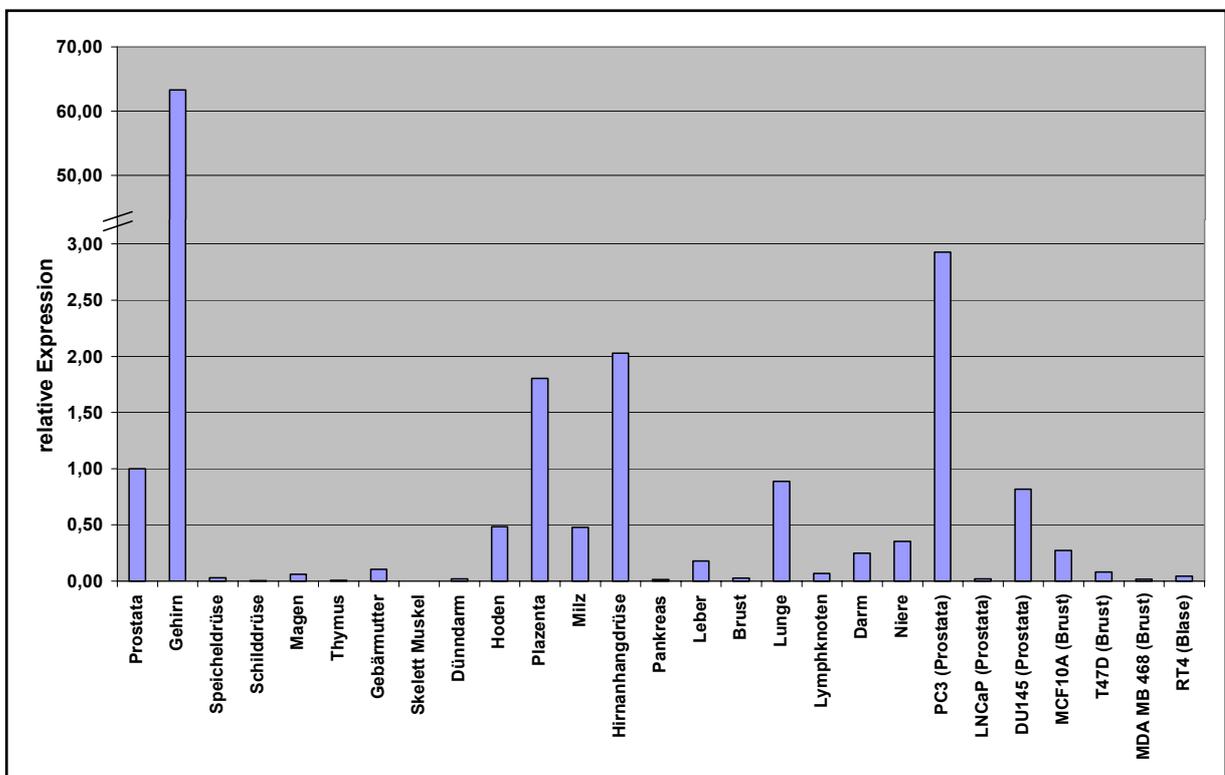


Abb. 27: Relative Expression von Chimerin-1 in 20 Normalgeweben und 7 Zelllinien (Gewebeursprung) in Bezug auf die Expression im Prostatagewebe. Normiert wurde die Expression auf GAPDH.

## 4.5 Kandidatengen Ponsin

Aus der Vielzahl der in den Prostatatumoren herunterregulierten Gene wurde nach Analyse der chromosomalen Lokalisation und der Funktion der Proteine das Gen Ponsin ausgewählt. Die Region 10q und speziell der Bereich 10q23 ist in vielen Tumoren verloren, wie z. B. dem Ovar mit bis zu 40% LOH (Obata and Hoshiai, 2000) und der Prostata mit bis zu 49% (Feilotter et al., 1998). Bei der Suche nach einem Tumorsuppressorgen in dieser Region richtete sich das Interesse hauptsächlich auf das Gen PTEN an der Position 10q23.31. Die Bedeutung von PTEN in der Prostata wird jedoch kontrovers diskutiert, da Cairns et al. (1997) LOH und Mutationen finden konnten, aber weitere Untersuchungen von anderen Gruppen nur einen Verlust des PTEN Genorts in 11,1% der informativen Fälle zeigten und diese auch keine Mutationen aufwiesen (Orikasa et al., 1998). Eine andere Untersuchung konnte trotz der Identifikation des Verlustes der Region 10q23 in 49% der untersuchten Fälle nur in 4% eine Mutation im Gen PTEN identifizieren (Feilotter et al., 1998).

Etwa 8 Mb entfernt von der Position des PTEN liegt der Genort von Ponsin in der zyto-genetischen Bande 10q23.33. Das Gen Ponsin ist in der Literatur unter verschiedenen Namen bekannt wie, z. B. CAP (c-Cbl associated protein), KIAA1296, SH3P12, SH3D5 oder auch DKFZP586P1422, die auf unterschiedliche Identifikationsbedingungen zurückzuführen sind.

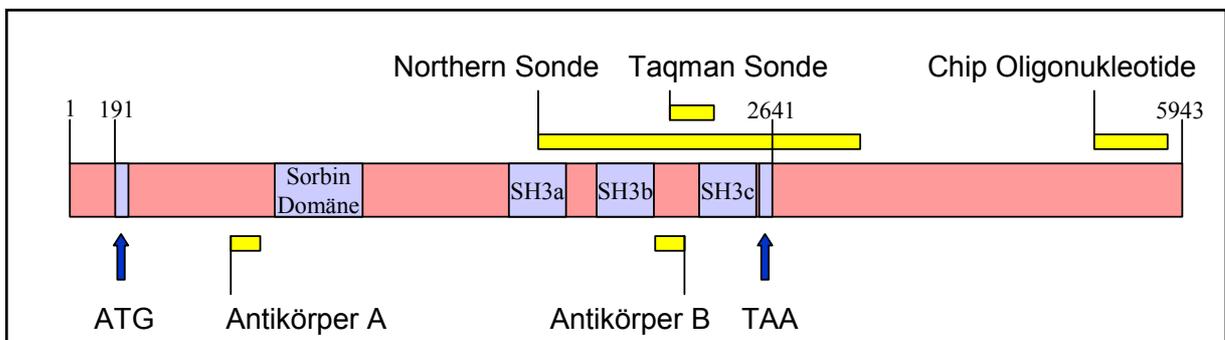


Abb. 28: cDNA Sequenz von Ponsin NM\_015385 und Position der Antigene zur Antikörperimmunsierung, Sonden und Chip Oligonukleotide.

Die genomische Struktur von Ponsin wurde intensiv untersucht und ergab eine Gesamtzahl von 34 Exons, von denen 13 alternativ gespleißt werden können (Lin et al., 2001). Die Sequenz des Gens Ponsin ist bis auf die ersten beiden Exons vollständig auf dem BAC AL158165 wiederzufinden und erstreckt sich dort über eine Länge von 130 kb. Die Sequenz einer Spleißvariante des Gens Ponsin ist unter dem Eintrag NM\_015385 in der Datenbank Genebank des NCBI zu finden und besitzt eine Länge von 5943 bp.

Der kodierende Sequenzbereich beginnt bei Position 191, endet bei 2641 (s. Abb. 28) und kodiert für ein Protein mit 816 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 90,1 kDa. Eine verkürzte Spleißvariante mit der Genebank Nummer NM\_006434 kodiert für ein Protein von 684 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 76,3 kDa.

Zu Ponsin gibt es orthologe Sequenzen mit 95% bzw. 91% Sequenzidentität in der Ratte und Maus, das Ortholog aus dem Zebrafisch zeigt noch 65% Sequenzidentität (NCBI, HomoloGene).

Das Gen besitzt als funktionelle Domänen eine Sorbin-Domäne, die die Bindung an Flotillin vermittelt (Kimura et al., 2001), und drei aufeinander folgende SH3-Domänen, die an prolinreiche Sequenzen verschiedener Zielproteine binden. Über die SH3-Domänen bindet Ponsin unter anderem in kompetitiver Weise an Vinculin und an das Aktin-bindende Protein I-Afadin und ist damit an der Bildung von Zell-Matrix-Kontakten beteiligt (Mandai et al., 1999). Des weiteren bindet Ponsin über seine SH3-Domänen das Protoonkogen c-Cbl und dissoziiert nach Insulin-Stimulation vom Insulinrezeptor.

Ponsin ist als ein Adaptormolekül nicht nur in der Signalweiterleitung durch den Insulinrezeptor, sondern auch an der Bildung notwendiger Zell-Matrix-Kontakte beteiligt und stellt somit ein Protein dar, dass in vielfältigen entscheidenden Prozessen eine Rolle spielt. Die Ursache für die in den Affymetrix Chipexperimenten beobachtete differentielle Expression des Gens in Prostata Tumoren ist noch nicht bekannt, für eine aufwendige funktionelle Genanalyse ist jedoch eine vorherige Validierung der Expressionsdaten nötig.

#### 4.5.1 Expression von Ponsin in der Prostata

Nach Auswertung der Affymetrix Chipexperimente mit 54 Prostata Tumorpatienten zeigte Ponsin in 49 Fällen eine Expression in beiden Geweben. Die Faktoren  $F(N/T)$  der Expression von Normal- zu Tumorgewebe sind Abb. 29 der Größe nach sortiert aufgestellt.

Die Unterschiede der Faktoren reichen von mehr als 9-facher bis zu 0,4-facher Herunterregulation des Gens im Tumorgewebe. In vier weiteren Fällen ist das Gen nur im Normal- und nicht im Tumorgewebe exprimiert. Werden diese Fälle noch zu den 11 Patienten mit einem Faktor von  $F > 2$  hinzugerechnet, so ist in mehr als 27% der untersuchten Fälle die Expression im Tumorgewebe herunterreguliert.

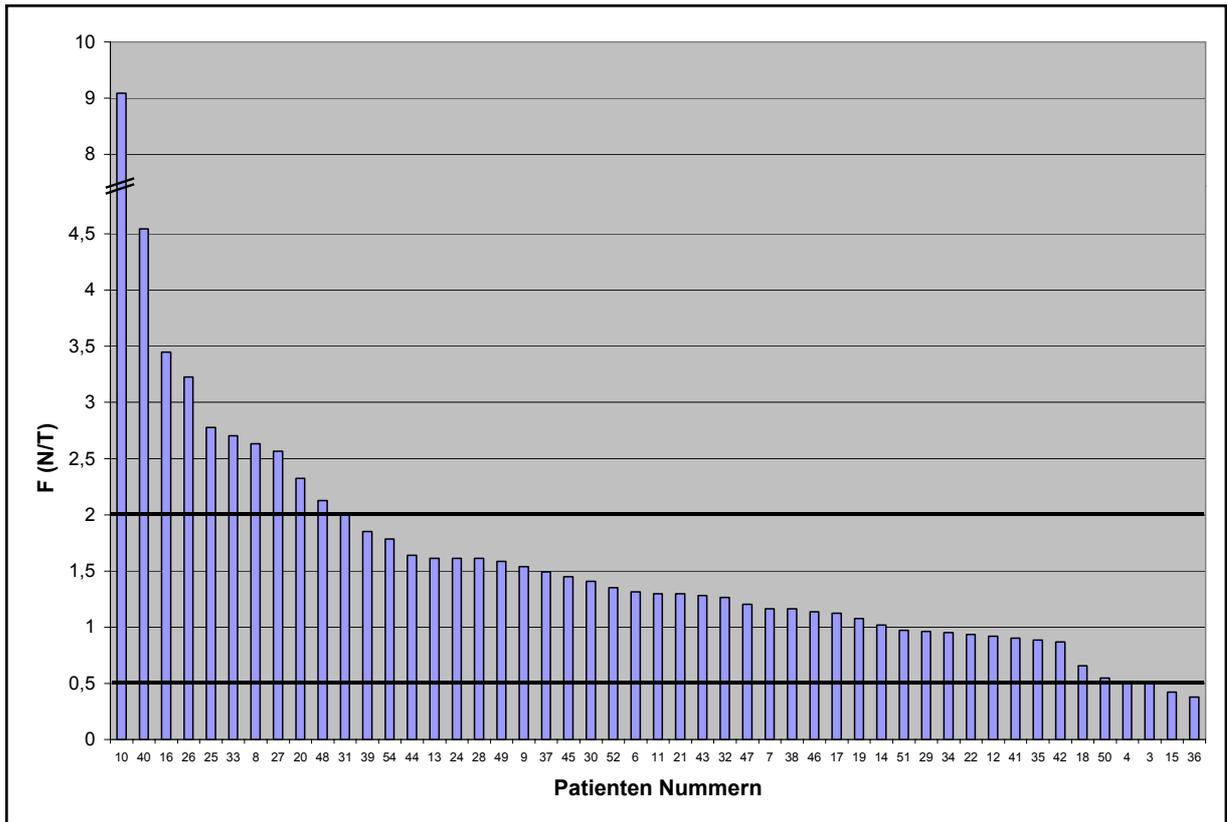


Abb. 29: Affymetrix Chipauswertung und Berechnung der Faktoren  $F(N/T)$  des Gens Ponsin in 49 von 54 als anwesend detektierten Prostatageweben. Für die Prostatapatienten sind die entsprechenden Patienten Nummern angegeben (s. Anhang). Die Grenzl意思  $F=2$  und  $F=0,5$  sind hervorgehoben.

Für die überwiegende Anzahl der Patienten lagen die Expressionsunterschiede im Bereich zwischen 0,5 und 2, nur 2 Patienten zeigten eine signifikante Hochregulation der Expression im Tumorgewebe. Im Vergleich dazu ist das PTEN Gen in 52 der untersuchten 54 Patienten exprimiert, aber nur in zwei Patienten marginal im Tumor herunter- und in zwei weiteren Patienten im Tumor heraufreguliert. Für den potentiellen Tumorsuppressor PTEN konnte also in den Prostatapatienten keine differentielle Expression festgestellt werden.

Eine weitere Untersuchung dieses Befundes in 34 Prostatapatienten durch eine Taqman-Analyse verstärkte die Deutlichkeit der Herunterregulation (s. Abb. 30). In den Taqman Untersuchungen konnten sogar mehr als 60% der untersuchten Fälle als herunterreguliert beobachtet werden. Es stand leider nicht mehr von allen 54 Patienten, deren Gewebeproben für eine Chiphybridisierung verwendet wurden, cDNA zur Verfügung, so dass die beiden Patientensätze sich nur zum Teil überlappen.

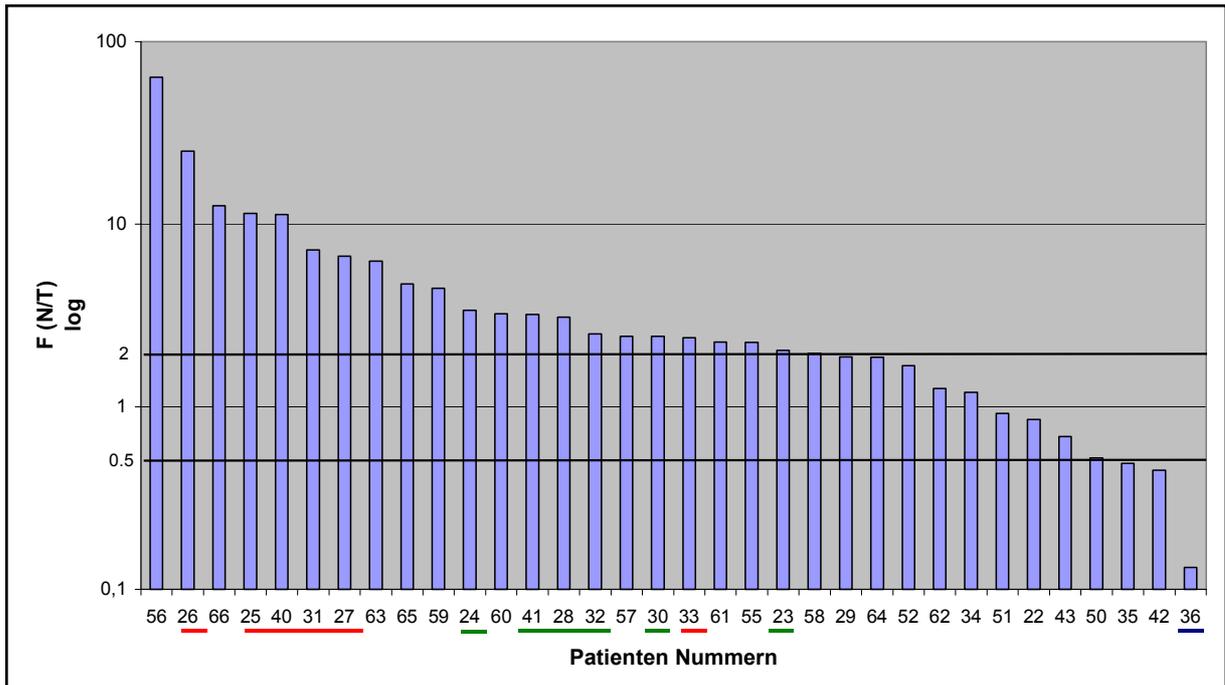


Abb. 30: Logarithmische Darstellung des Faktors  $F(N/T)$  für 34 Prostata-Tumor-Patienten in der Taqman-Analyse. Die beiden Grenzwerte von  $F=2$  und  $F=0.5$  sind zusätzlich hervorgehoben. Die farbige Markierung kennzeichnet Patienten, die ebenfalls durch Chipexperimente untersucht wurden (rot = im Tumor herunterreguliert, grün = nicht signifikant reguliert, blau = im Tumor heraufreguliert).

Für die sechs Patientenproben, die in beiden Versuchsansätzen untersucht und in den Chipexperimenten als herunterreguliert identifiziert wurden, zeigte auch die Taqman-Analyse eine deutliche Herunterregulation (rote Markierung in Abb. 30). Zusätzlich identifizierte die Taqman-Analyse eine Anzahl von Patienten, in denen Ponsin im Prostata-Tumor herunterreguliert war, deren Faktor  $F$  in den Chipexperimenten aber nur zwischen 0,9 und 1,8 variierte (grüne Markierung in Abb. 30). Die Hochregulation der Ponsin-Expression im Tumorgewebe konnte für den Patient Nummer 36 sowohl in der Chipanalyse als auch in der Taqman-Analyse gezeigt werden (blau Markierung in Abb. 30). Für die Untersuchung von geringen Expressionsunterschieden auf zum Teil recht niedrigem Expressionsniveau zeigte sich die Taqman-Analyse als deutlich sensitiver.

#### 4.5.2 Elektronischer Northern und Expressionsvalidierung in der Harnblase

Der elektronische Northern der gesamten Sequenz von Ponsin mit einer Länge von ca. 6 kb in Tab. 12 zeigt eine deutliche Signifikanz der differentiellen Expression von Ponsin in einzelnen Geweben. Die Expression von Ponsin ist in Tumoren der Blase, Brust, Darm und Prostata gegenüber den Normalgeweben deutlich herunterreguliert.

	NORMAL		TUMOR		Wert N/T	P-Wert	SIG
	Treffer	Gesamtanzahl	Treffer	Gesamtanzahl			
Nebenniere	0	25886	1	20230	-	0,439	56,1
B-Lymphome	0	108530	0	7357	-	-	-
Blase	13	25641	3	42550	7,19	0,000465	100
Brust	34	117167	1	71112	20,64	1,78E-06	100
Darm	15	31042	0	35626	-	1,05E-05	100
Endometrium	6	18977	0	6023	-	0,347	65,3
Glialgewebe	8	110439	1	38567	2,79	0,462	53,8
Herz	25	98496	0	7271	-	0,413	58,7
Niere	2	44566	1	40078	1,8	1	0
Lunge	2	96193	2	43114	0,45	0,592	40,8
Skelettmuskel	5	58315	0	27063	-	0,335	66,5
Myometrium	3	35843	0	14713	-	0,561	43,9
Ovar	0	15293	2	32525	-	1	0
PBL	0	130844	0	941	-	-	-
Pankreas	2	65807	0	21808	-	1	0
Prostata	17	88661	5	76762	2,94	0,0313	96,9
Haut	3	27182	0	1180	-	1	0
Dünndarm	5	36432	3	9379	0,43	0,214	78,6
Squamous Zellen	0	33833	1	25706	-	0,432	56,8
Magen/Speiseröhre	1	13799	1	12119	0,88	1	0
T-Lymphome	0	60680	0	17313	-	-	-
Hoden	1	29540	1	16891	0,57	1	0
Alle Gewebe	142	1273166	22	568328	2,88	2,74E-07	100

Tab. 12: Elektronischer Northern des Gens Ponsin.

#### 4.5.3 Expression von Ponsin in verschiedenen Normal- und Tumorgeweben

Die Expression von Ponsin in verschiedenen Normalgeweben wurde durch Hybridisierung auf Northern Blots der Firma BD Biosciences Clontech(Heidelberg) untersucht. Die Abb. 31 zeigt die ubiquitäre Expression von Ponsin in den verschiedenen Geweben. Besonders deutlich ist die Expression in Skelettmuskulatur und Herz und in einzelnen Geweben wie dem Ovar, Dünndarm oder Darm ist deutlich eine weitere Splißvariante zu erkennen.

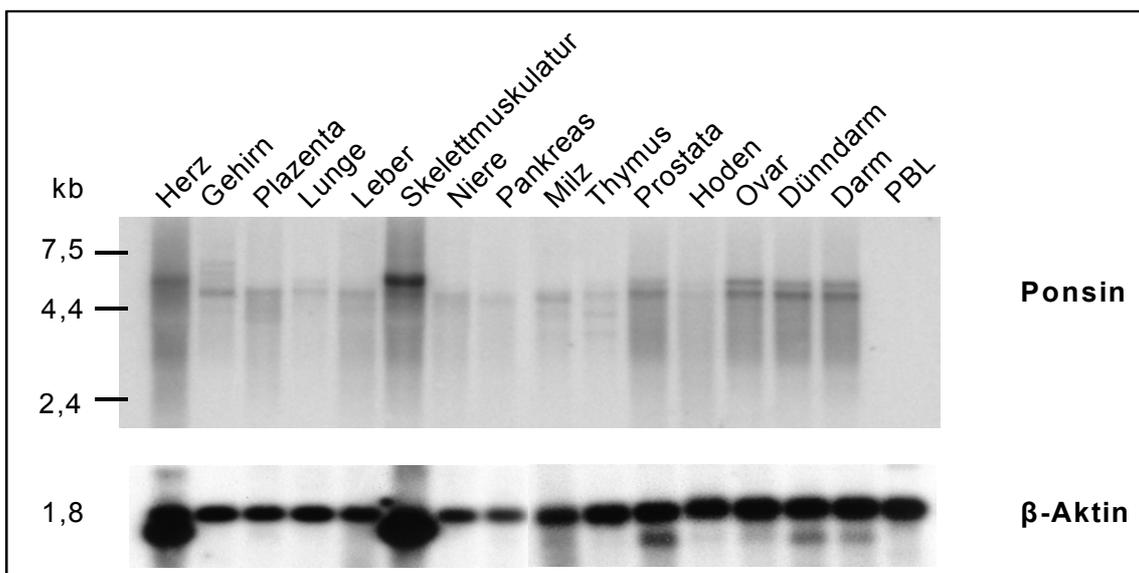


Abb. 31: Hybridisierung der „Multiple Tissue Northern (MTN™) Blots“ I und II (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) mit einer Ponsin und β-Aktin Sonde. Die Markierung des Größenstandards sind am linken Rand in Kilobasen (kb) angegeben.

Die notwendige Validierung der *in silico* erhaltenen Daten konnte für Prostata Tumoren in Chipexperimenten und durch Taqman Untersuchungen gezeigt werden. Des Weiteren wurden kommerziell erhältliche Northernblots benutzt. Hybridisierung der Sonde des Ponsin Gens auf einen „Matched Tumor/Normal Expression Array“ (Invitrogen, Karlsruhe) zeigt keine Herunterregulation der Expression in den drei vorhandenen Prostata Tumoren aber in den Darmtumoren eine deutliche Reduktion der Expression.

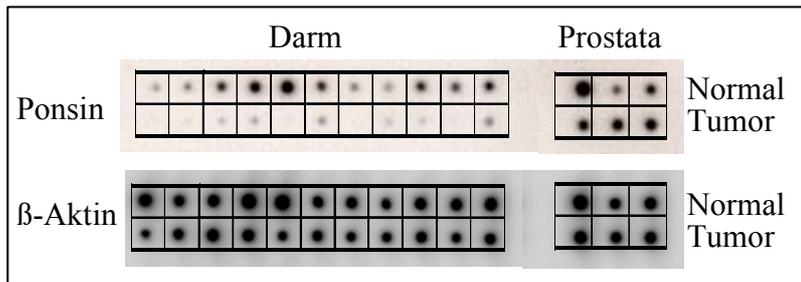


Abb. 32: Northernhybridisierung der Sonden von Ponsin und  $\beta$ -Aktin auf einen „Matched Tumor/Normal Expression Array“ (Invitrogen, Karlsruhe) für die Darm- und Prostata tumor Patienten. In der oberen Reihe sind jeweils die Normalgewebe und in der unteren Reihe die korrespondierenden Tumorgewebe eines Patienten aufgetragen.

Ponsin war im elektronischen Northern neben der Prostata unter anderem auch in der Blase als differentiell exprimiert identifiziert worden (s. Tab. 12). Proben von Blasen tumor Patienten sind auf dem „Matched Tumor/Normal Expression Array“ nicht vorhanden, so dass die Sonde auf eine Blasen tumor blot hybridisiert wurde (s. Abb. 33). Die Hybridisierung zeigte eine deutliche Herunterregulation der Expression von Ponsin in Blasen-Tumorgeweben.

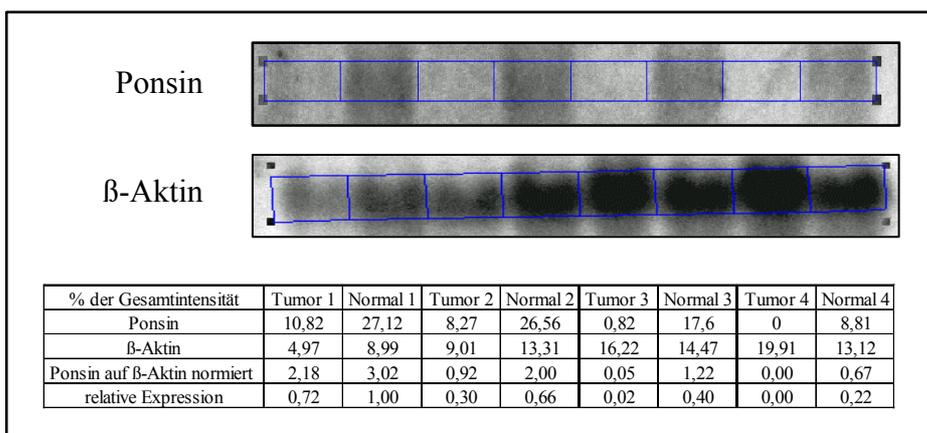


Abb. 33: Northern-Hybridisierungen der Sonden Ponsin und  $\beta$ -Aktin auf einen Blasen tumor blots der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Die Tabelle gibt die Quantifizierungen der Signalintensitäten durch die ImageQuant Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) in den einzelnen Geweben an.

Die ausgewählte Sonde aus dem 3'-Bereich beinhaltet unter anderem die Sequenzen der drei SH3-Domänen und zeigt bei den gewählten Hybridisierungsbedingungen ein spezifisches Bandenmuster. Die Kontrolle mit dem Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin zeigt leichte Variationen in der Beladung der einzelnen Geltaschen, jedoch ist dies nicht die Ursache der unterschiedlich stark ausgeprägten Expressionshöhen von Ponsin.

#### 4.5.4 LOH auf Chromosom 10q in Prostata Tumoren

Ein indirekter Hinweis auf eine somatische Inaktivierung von potentiellen Tumorsuppressorgenen ist der Verlust polymorpher Marker in der Nähe des Gens. Allelverluste in Tumoren können durch die Analyse hoch polymorpher Mikrosatelliten mit Allellängen Polymorphismen untersucht werden. Die dadurch beobachteten Änderungen der Allel-Verhältnisse von Normal- und Tumorgewebe lassen keine Unterscheidung zwischen dem Gewinn und dem Verlust eines Allels zu, auf Grund der Suche in einer Region mit vielfach dokumentierten Allelverlusten, werden jedoch die beobachteten Veränderungen als Verlust eines Allels interpretiert.

Zur Untersuchung der chromosomalen Instabilität als einer möglichen Ursache der verringerten Expression des Ponsins wurde an ausgewählten Prostatapatienten eine Untersuchung auf den Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH) durchgeführt. Von den 11 Patienten, die in den Affymetrix Experimenten eine Herunter-, und den beiden Patienten, die im Tumor eine Heraufregulation im Tumor zeigten (s. Abb. 29), wurde die genomische DNA extrahiert. Zusätzlich zu diesen 13 Patientenproben wurden noch 10 weitere Prostatapatienten ausgewählt, die in den Affymetrix Versuchen keine signifikante differentielle Expression zeigten.

Durch Suche in den Datenbanken des amerikanischen „National Center for Biotechnology Information“ ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und der Datenbank Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) konnte neben der relativen Anordnung die zytogenetische Lokalisation und die physikalische Kartierung bestimmt werden. Nach Angaben von Ensembl hat Chromosom 10 eine Größe von ungefähr 144,8 Mb, von denen ungefähr 100 Mb auf dem langen Chromosomenarm 10q liegen. Abb. 34 zeigt die Lokalisation der verwendeten Mikrosatelliten Marker mit ihrer zytogenetischen Bande und der physikalischen Position (Stand Ensembl v1.1.3, Oktober 2001).

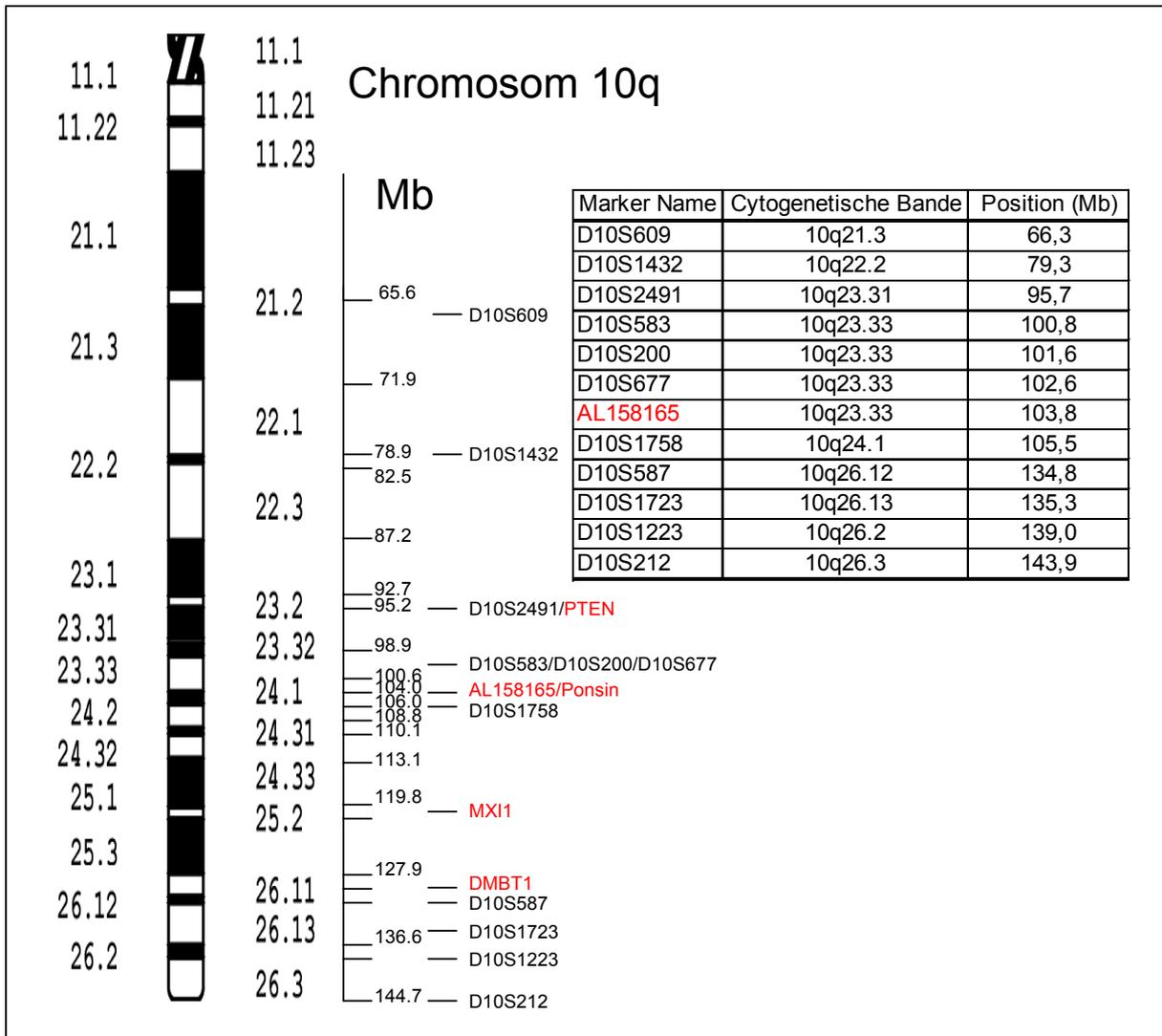


Abb. 34: Kartierung der STS Marker auf Chromosom 10q. Die physikalischen Positionen der zytogenetischen Banden sind mit angegeben und der abgeleitete Marker vom BAC AL158165 ist mit der Lokalisation der Tumorsuppressorgene PTEN, MXI1 und DMBT1 rot hervorgehoben. In der Tabelle sind die zytogenetischen Banden wie auch die physikalische Position der Marker auf Chromosom 10 aufgeführt.

Der intragenische Marker wurde durch das Programm SPUTNIK aus dem GCG Wisconsin Software Packet ([www.accelrys.com](http://www.accelrys.com)) in der Sequenz des BACs AL158165 identifiziert. Bei dem Mikrosatelliten handelt es sich um eine Tetranukleotid-Wiederholung von neuen aufeinanderfolgenden Wiederholungen der Sequenz 5'-TTTA-3'. Die Sequenz liegt im etwa 3 kb großen Intron vor dem letzten Exon, das das Ende der kodierenden Sequenz und die gesamte 3'-UTR kodiert. Der Test des Markers mit genomischer DNA von zehn Probanden zeigte eine Heterogenizität in sieben Fällen. Für die Amplifikation der DNA in der PCR mit den entsprechend ausgewählten Primern wurden mit fluoreszenz markierten Primern gearbeitet, sofern eine Post-PCR Markierung der zuvor unmarkiert getesteten Primer sich nicht als effizient erwies.

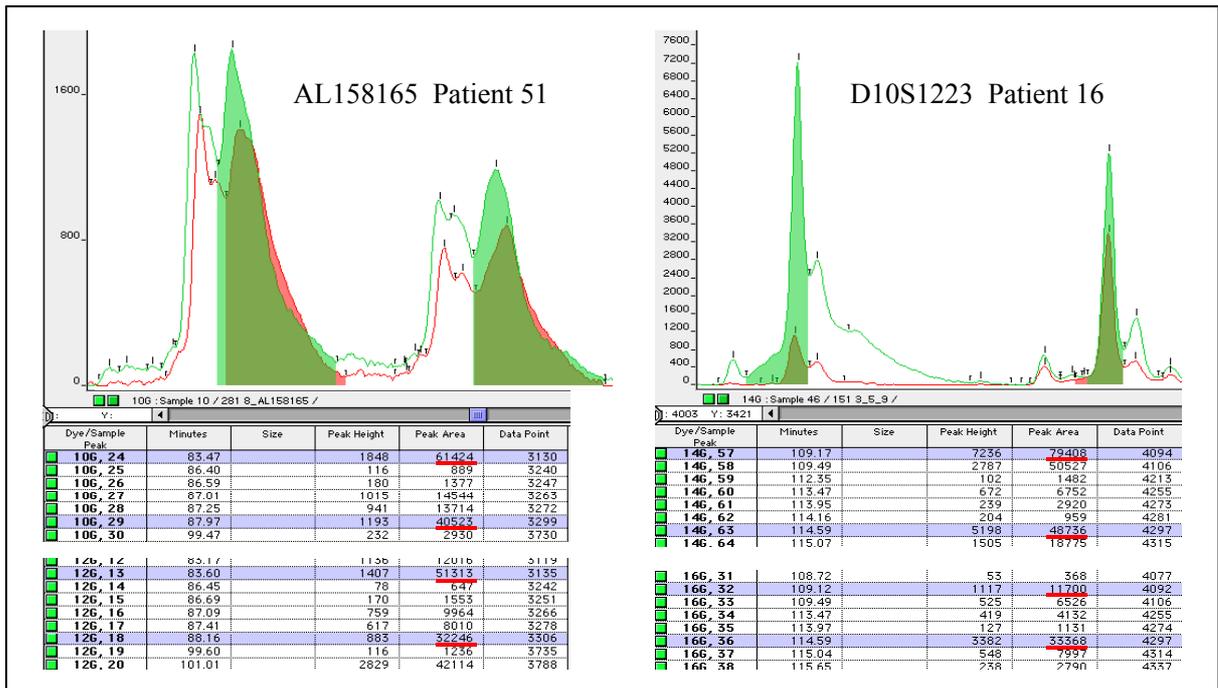


Abb. 35: Auswertungsbeispiel für den Erhalt der Heterozygotität des Markers AL158165 im Patienten 51 und Verlust eines Allels für den Marker D10S1223 in der Patientenproben 16 durch die Software GeneScan (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die grünen Kurven stellen die beiden amplifizierten Allele des Normalgewebes, die roten Kurven die des Tumorgewebes dar. Die grün bzw. rot unterlegten Flächen sind in ihrer Größe in der Tabelle unterhalb der Graphen berechnet.

Die Auswertung wurde durch Gegenüberstellung der Produkte der beiden in der PCR amplifizierten Allele durchgeführt (Niederacher et al., 1997). Ein Quotient  $Q(T/N) < 0,5$  oder  $> 2$  wurde als signifikante Änderung betrachtet. In Abb. 35 ist beispielhaft für zwei Marker an zwei verschiedenen Patienten die Bewertung der PCR-Produkte dargestellt.

Analoge der Formel  $Q(T/N) = \frac{\text{langesAllel}_{Tumor}}{\text{kurzesAllel}_{Tumor}} \cdot \frac{\text{langesAllel}_{Normal}}{\text{kurzesAllel}_{Normal}}$  berechnet sich für:

$$\text{Patient 51 und Marker AL158165 } Q(T/N) = \frac{32246}{51313} \frac{(Tumor)}{40523} \frac{(Normal)}{61424} = 1,05$$

$$\text{Patient 16 und Marker D10S1223 } Q(T/N) = \frac{33368}{11700} \frac{(Tumor)}{48736} \frac{(Normal)}{79408} = 4,65$$

Während für den ersten Patienten nur eine leichte natürliche Schwankung um den Normalwert von eins zu beobachten ist, zeigt der Quotient für den zweiten Patienten ein deutliches Ungleichgewicht der beiden Allele im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe.

Die Auswertung der 12 verschiedenen Marker für die 23 Prostatapatienten ist in Tab. 13 dargestellt. Wie im Beispiel zuvor beschrieben, wurde der Quotient aus den Allelen des Tumors und des Normalgewebes gebildet, sofern der Marker in dem entsprechenden Patienten heterozygot war.

metaGen Nr.	D10S609	D10S1432	D10S583	D10S2491 (PTEN)	D10S200	D10S677	AL158165 (Ponsin)	D10S1758	D10S587	D10S1723	D10S1223	D10S212
6												
7												
8												
9												
10												
15												
16												
20												
22												
25												
26												
27												
29												
31												
32												
33												
35												
36												
40												
48												
49												
51												
53												
Heterozygot %	63,6	61,9	45,0	80,0	55,6	71,4	65,2	75,0	76,2	72,7	86,4	65,2
LOH %	21,4	0,0	0,0	18,8	10,0	13,3	6,7	11,1	11,1	11,8	36,8	6,7

Tab. 13: Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse von 23 Prostatatumor Patienten. Für die Marker ist die jeweilige Heterozygotie und die prozentuale Häufigkeit eines Allelverlustes in den informativen Fällen angegeben. Gelb hervorgehoben ist der intragenische Marker. Die grünen Kreise stellen einen Erhalt der Heterozygotie, die roten einen Verlust und die weißen einen homozygoten Patienten dar.

Die Betrachtung des intragenischen Markers AL158165 zeigte nur in 7% der informativen Fälle ein eindeutiger Verlust eines Allels. Bei zusätzlicher Betrachtung der Patienten die bezüglich dieses Markers nicht informativ waren, die für die benachbarten Marker jedoch LOH zeigten, erhöhte sich die Zahl der Patienten mit möglichem Verlust eines Allels des Ponsins auf 5 von 23 untersuchten Patienten (22%). Für die Patienten 7 und 16 zeigte der direkt benachbarte Marker D10S677 (ungefähr 1 Mb entfernt) LOH. Für den Patienten 31 konnte der zu Ponsin direkt distal liegende Marker D10S1758 nicht amplifiziert werden und der darauf folgende Marker D10S587 (ungefähr 31 Mb entfernt) zeigte den Verlust eines Allels. Die DNA des Patienten 15 war für die beiden benachbarten Marker AL158165 und D10S677 nicht informativ, aber die diesen Bereich eingrenzenden Marker D10S200 und D10S1758 hatten in der Tumorprobe ein Allel verloren.

Der Marker D10S2491 an der Position des Gens PTEN zeigt einen eindeutigen Verlust der Heterozygotität für 19% der informativen Fälle. Der Patient 10, dessen DNA durch den Marker D10S2491 wiederholte Male nicht amplifiziert werden konnte, war für die beiden nächsten centromerwärts gelegenen Marker nicht informativ oder auch nicht zu amplifizieren, aber der Marker D10S609, der in der Region 10q21.3 etwa 30 Mb entfernt liegt, zeigte einen Verlust eines Allels. Unter Hinzunahme dieses Patienten ist die Rate der Verluste der Heterozygotität für PTEN und Ponsin in etwa vergleichbar.

Die größte Häufung von LOH wurde jedoch im telomeren Bereich für den Marker D10S1223 beobachtet, der ein LOH in 37% der informativen Fälle zeigte (s. Kap. 4.5.5).

Für ein weiteres auf dem Chromosom 10q gelegenes potentiell Tumorsuppressorgen „Deleted in Malignant Brain Tumors 1“ (DMBT1) in der Region 10q26.12, etwa 1 Mb proximal zu dem Marker D10S587, konnte in den Chipexperimenten nur in 6 Proben eine Expression detektiert werden. Das Gen liegt außerhalb der in dieser Arbeit identifizierten Region mit erhöhtem LOH und Deletionen oder differentielle Proteinexpressionen konnten in Prostatatumoren nicht beobachtet werden (Ma et al., 2001). Ebenso liegt auch MXI1 als Gen mit beobachtetem Verlust und Mutationen und Prostatatumoren außerhalb der identifizierten Region in 10q24-q25 (Prochownik et al., 1998).

#### 4.5.5 Untersuchung der Region zwischen den Markern D10S1723 und D10S212

Der hohe Anteil der Patienten, die in der Region zwischen den Markern D10S1723 und D10S212, eine Region von etwa 9 Mb, den Verlust eines Allels zeigten wirft die Frage nach weiteren möglichen Tumorsuppressor-Kandidatengenen von Chromosom 10 auf. Für eine mögliche Identifikation wurden aus der Datenbank des Sanger Instituts ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)) die genomischen Sequenzen der dorthin kartierten BAC Sequenzen in einer Datenbank zusammengestellt und mit dem Programm BLAST gegen den Datensatz der Chipsequenzen verglichen. Auf diese Weise konnten auf unserem Chip 27 verschiedene Sequenzen identifiziert werden, die durch 38 Probensätze repräsentiert wurden. Von den 38 Probensätzen wurden 28 mindestens in einer der 54 Prostatanormal oder –tumorproben exprimiert. Eine Betrachtung der berechneten Faktoren  $F(N/T)$  für die 28 Probensätze ergab jedoch für keine der Sequenzen eine signifikante Herunterregulation in den Prostatatumoren. Wenn dieser

Verlust des telomeren Bereiches des Chromosomenarms 10q einen Einfluß auf das Expressionsverhalten einzelner Gene in diesem Bereich hat, ist das endogene Expressionsniveau dieser Gene vielleicht insgesamt zu gering, um mit dem Chip identifiziert zu werden, oder aber die Sequenzen der Gene sind nicht auf dem Chip.

#### 4.5.6 Proteinchemische Untersuchungen

Die Expression des Ponsin-Proteins wurde mit polyklonalen Antikörpern untersucht. Die durch Immunisierung mit Peptiden erzeugten Antikörper wurden auf ihre Spezifität getestet unter anderem durch konzentrationsabhängige Bindung an bakteriell exprimierte sFRP1 Fragmente. Zur weiteren Validierung wurden die Antikörper in der Western-Hybridisierung von Zelllinien getestet. Die beiden Antikörper zeigten eine deutlich unterschiedliche Sensitivität, da der Antikörper Ponsin-AKb zwar vergleichbare Banden wie der AKa zeigte, jedoch deutlich schwächer. Eine Expression des Proteins Ponsin konnte in Gesamtllysaten der Zelllinien in LNCaP, DU145, PC3, ZR75 und MDA453 gezeigt werden, während die Zelllinien MCF10A und T47D negativ waren. Die Westernhybridisierung zeigte eine intensive spezifische Bande in der erwarteten Größe von etwa 80 kDa. Auch nach 15 Min. Filmexposition war für die Zelllinie MCF10A kein Signal zu erkennen.

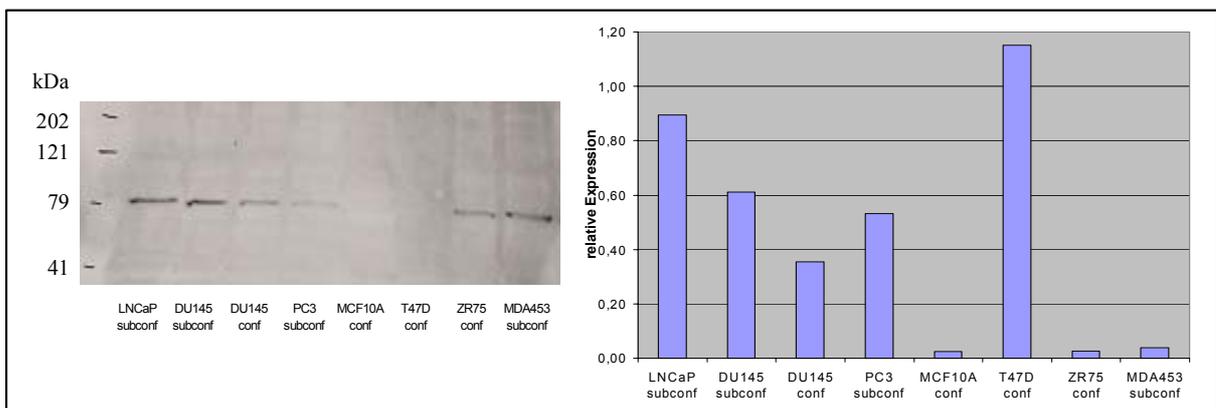


Abb. 36: Vergleich der Proteinexpression in der Western-Hybridisierung durch den Antikörper Ponsin-AKa und der RNA Expression in der Taqman Analyse von Ponsin. Am linken Rand des Westernblots sind die Markierungen des Größenstandards angegeben. Die relativen Expressionswerte der Zelllinien in der Taqman PCR sind auf GAPDH normiert und der höchste Expressionswert wurde =1 gesetzt.

Der Vergleich der Proteinexpression mit der durch Taqman Untersuchungen ermittelten Poly-A<sup>+</sup>-RNA Expression zeigte für die meisten Zelllinien eine Übereinstimmung (s. Abb. 36). Der Proliferationsstatus der Zelllinien hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die Ponsin-

Expression, da die Protein- und RNA-Expression jeweils vergleichbar waren. Für die Zelllinie T47D konnte in der Western-Hybridisierung keine Proteinbande identifiziert werden, obwohl die Taqman Untersuchung eine deutliche Poly-A<sup>+</sup>-RNA Expression zeigte. Die Zelllinie T47D scheint trotz einer RNA Expression des Gens diese nicht in ein Protein zu übersetzen.

Die Spezifität des Antikörpers für das Peptid der Immunisierung konnte im weiteren durch Konkurrenzexperimente in der Immunzytochemie getestet werden. Ansteigende Konzentrationen des Peptids, das zur Antikörperbildung in der Immunisierung der Kaninchen eingesetzt wurde, kompetitierten mit der Bindung des Primärantikörpers an die Epitope der fixierten Zellen und verhinderten eine Antikörperbindung (s. Abb. 37). Eine Konkurrenz mit dem 100fachen molaren Überschuss des Peptides führt zu einer Färbung, die vergleichbar mit der Negativ Kontrolle ist.

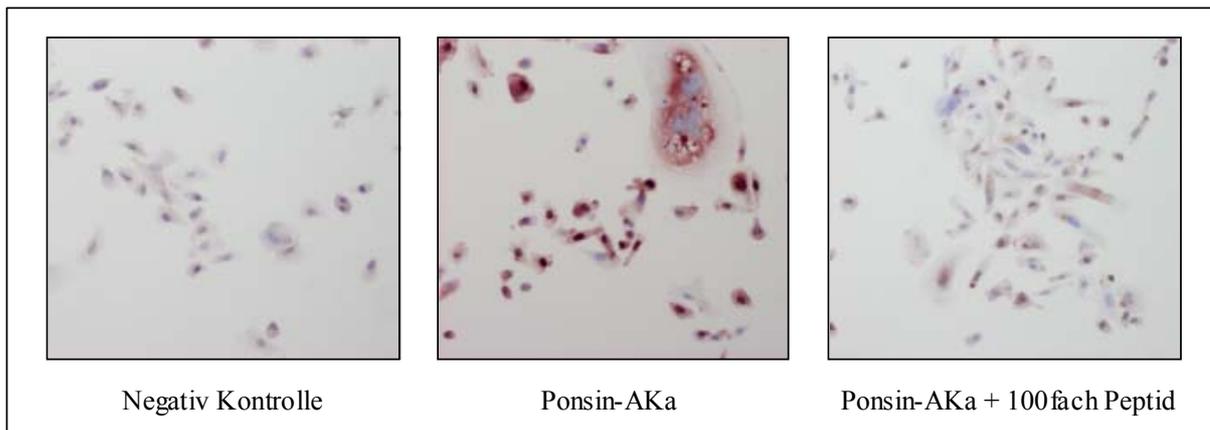


Abb. 37: Immunzytochemie von PC3 Zellen. Die Negativ Kontrolle enthält keinen primären Antikörper, der Ponsin Antikörper AKA wurde in den Konzentrationen 1:100 eingesetzt und das Peptid im 100fachen molaren Überschuss zugegeben.

#### 4.5.6.1 Immunhistochemie an Gewebeschnitten der Prostata

Der verwendete Zytokeratin 34 $\beta$ E12 Antikörper zeigt in Abb. 38 die spezifische Basalzellfärbung. Die Basalzellen umgeben die Epithelzellen der Prostata Drüsen und der Antikörper bildet ein Marker für normales Prostata Gewebe, da Prostatakarzinome für Zytokeratin 34 $\beta$ E12 negativ sind (Remmele, 1997a). Die Inkubation des Antikörpers Ponsin-AKa zeigte auf Prostata Schnitten eine spezifische Färbung von Stromalen und glattmuskulären Bereichen. Die direkt zu den gefärbten Bereichen des Bindegewebes benachbarten Epithelien der Prostata Drüsen im Normalgewebe zeigten eine nur sehr schwache Färbung (s. Vergrößerung des Normalgewebes in Abb. 38). Der Vergleich der Prostata Schnitte von

Normal- und Tumorgewebe zeigt eine deutlich stärkere Färbung im Normalgewebe, da es in seiner Zusammensetzung größere Anteile von Stroma besitzt als das Tumorgewebe.

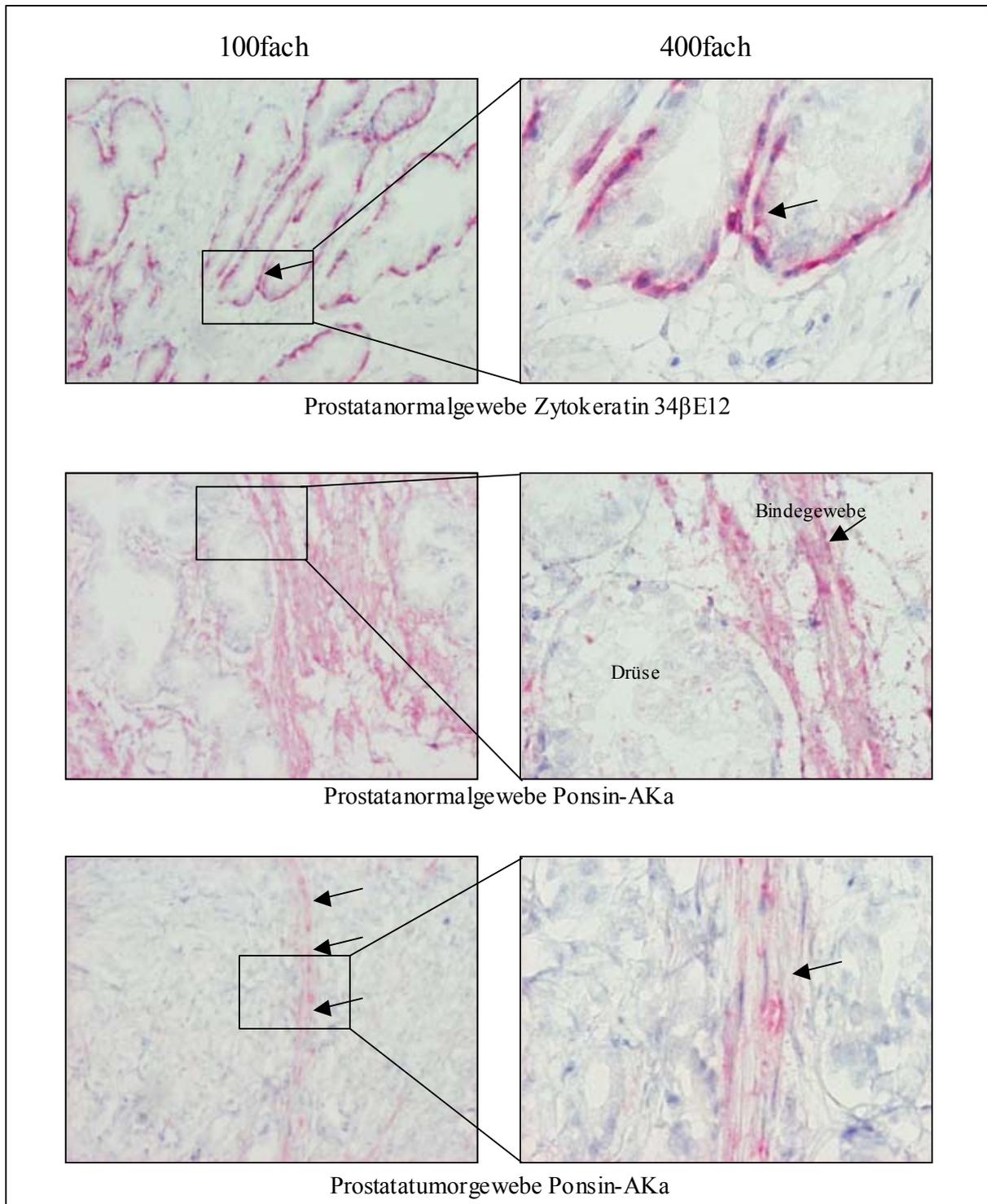


Abb. 38: Immunhistochemie von Zytokeratin 34βE12 in Prostatanormalgewebe und Ponsin in Prostatanormal- und Tumorgewebe. Gefärbt wurden die Schnitte mit AEC und die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gegengefärbt. Die drei Schnitte wurden jeweils mit einer 100fachen Vergrößerung aufgenommen und einzelnen Bereiche wurden zusätzlich noch 400fach vergrößert. Spezifisch gefärbte stromale Zellen wurden mit Pfeilen markiert.