

Medizinische Fakultät
der
Universität-Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pharmakogenetik

Polymorphismen im Promotor des Gens *FNTB* und deren mögliche
Bedeutung bei malignen Neoplasien

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Andrea Lazik
aus Neuss
2010

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. W. Siffert

2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. L. Klein-Hitpaß

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Mai 2011

Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits publiziert oder auf Kongressen vorgestellt:

1. Bachmann, H.S., Lazik, A., Bau, M., Schmid, K.W., Siffert, W. (2008):
Association of *FNTB* promoter polymorphisms and survival in different cancers.
EORTC-NCI-ASCO Annual Meeting on Molecular Markers in Cancer
2. Bachmann, H.S., Lazik, A., Bau, M., Schmid, K.W., Siffert, W. (2009):
FNTB-Promotorpolymorphismen beeinflussen das Überleben bei unterschiedlichen
Tumorerkrankungen.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 379 (Suppl. 1), 93
50. Jahrestagung der DGPT, Mainz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Synthese von Proteinen	6
1.2. Die postrtranslationale Modifikation	7
1.3. Das Enzym Farnesyltransferase	7
1.4. Zielstrukturen der Farnesyltransferase	8
1.5. Bedeutung der Farnesyltransferase bei Tumorerkrankungen	9
1.6. Klinische Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren.....	11
1.7. Das Gen FNTB	13
1.8. Single nucleotide polymorphisms	13
1.9. Pharmakogenetische Aspekte	14
1.10. Zielsetzung der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material.....	16
2.1.1. Geräte.....	16
2.1.2. Chemikalien und Enzyme.....	16
2.1.3. Medien	17
2.1.4. Biologisches Material	17
2.1.5. PCR-Primer	21
2.2. Methoden	23
2.2.1. DNA Präparation aus Blut.....	23
2.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	23
2.2.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	27
2.2.4. Extraktion von DNA aus einem Agarosegel	27
2.2.5. Sequenzierung	28
2.2.6. Restriktionsverdau von DNA	28
2.2.7. Zellkultur	30
2.2.8. Zellkernextraktion	30
2.2.9. Electrophoretic mobility shift assay	31
2.2.10. Klonierung	34
2.2.11. Reporter Assay	35
2.2.12. Gewinnung von cDNA	36
2.2.13. Realtime PCR	37

2.2.14. Statistische Methoden.....	38
3. Ergebnisse	41
3.1. Polymorphismen im FNTB-Promotor	41
3.1.1. Verteilung der Polymorphismen bei gesunden Kaukasiern	41
3.1.2. Verteilung der Polymorphismen bei verschiedenen Ethnien	42
3.2. Funktionelle Bedeutung der Polymorphismen	43
3.2.1. Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren	43
3.2.2. Einfluss der Genotypen auf die Promotoraktivität	50
3.2.3. Genotyp-abhängige Quantifizierung der mRNA-Expression.....	50
3.3. Bedeutung der Polymorphismen bei Krebserkrankungen.....	51
3.3.1. Auswirkungen des Polymorphismus <i>FNTB</i> -609	51
3.3.2. Auswirkungen des Polymorphismus <i>FNTB</i> -173	55
3.4. Kopplungsanalyse.....	60
4. Diskussion.....	64
4.1. SNPs im Promotor von FNTB.....	64
4.2. Funktionelle Auswirkungen des SNPs <i>FNTB</i> -609.....	66
4.3. funktionelle Auswirkungen des SNPs <i>FNTB</i> -173	67
4.4. Interpretation der Ergebnisse im Zusammenhang mit klinischen Studien.....	68
4.5. Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Praxis	69
4.6. Ausblick.....	70
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	73
7. Abkürzungsverzeichnis	79
8. Lebenslauf	81

1. Einleitung

1.1. *Synthese von Proteinen*

Proteine bestehen aus Aminosäuren. Die Reihenfolge dieser Aminosäuren, welche die spezifischen Eigenschaften eines Proteins ausmacht, ist genetisch festgelegt. Sie wird auf chromosomaler Ebene durch eine bestimmte Abfolge der vier Nukleinbasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) festgelegt. Jeweils drei dieser Basen bilden ein so genanntes Codon, welches für genau eine Aminosäure kodiert. Die Gesamtheit der Codons, die die Informationen für ein Protein enthalten, und die dazugehörigen regulierenden Abschnitte werden zusammenfassend als Gen bezeichnet.

Um ein Gen abzulesen und somit ein Protein zu synthetisieren, sind verschiedene Schritte nötig. Zunächst erfolgt die Transkription, bei der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Ribonukleinsäure (RNA) umgeschrieben wird. Dieser Schritt wird durch den Promotor reguliert, ein Abschnitt auf dem abzulesenden Gen, der dessen Aktivität bestimmt. Dieser liegt noch vor den kodierenden Sequenzen und interagiert mit DNA-bindenden Proteinen, welche als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden und sowohl fördernden als auch hemmenden Einfluss auf die Transkription haben können (Knippers R 2006).

Nach der Transkription befinden sich in der synthetisierten RNA jedoch noch viele Gen-Abschnitte, die für die Proteinsynthese nicht benötigt werden, welche man als Introns bezeichnet. Diese werden während der Transkription durch Enzyme herausgeschnitten und die verbleibenden kodierenden Abschnitte, die so genannten Exons, werden als mRNA miteinander verknüpft. Im nächsten Schritt erfolgt die Translation, bei der die mRNA abgelesen wird. Durch die Reihenfolge der Codons ist festgelegt, in welcher Abfolge die Aminosäuren kovalent miteinander verknüpft werden. Einige Codons nehmen hierbei Sonderstellungen ein: So kodiert das Codon mit der Abfolge Adenin – Thymin – Guanin (ATG) nicht nur für die Aminosäure Methionin, sondern bestimmt zugleich auch den Startpunkt der Translation. Die Translation wird abgebrochen, sobald eines der drei Stopp-Codons auftritt. Dies sind die Nukleinsäuretripletts TAG, TAA und TGA.

1.2. Die posttranslationale Modifikation

Der Begriff posttranslationale Modifikation beschreibt eine Reihe von chemischen Veränderungen, die ein Protein erfährt, bevor es seine eigentliche Funktion aufnehmen kann. Hierzu gehören zum Beispiel Modifikationen bestimmter Aminosäure-Reste, wie Glykosylierung oder Phosphorylierung, Reaktionen, die die Proteinfaltung beeinflussen, die Bildung von Komplexen aus mehreren Untereinheiten sowie der Proteintransport und –abbau (Alberts B et al. 2008). Auch die Farnesylierung gehört in den Bereich der posttranslationalen Modifikation.

1.3. Das Enzym Farnesyltransferase

Die Farnesyltransferase ist ein Enzym, das die Farnesylierung bestimmter Proteine katalysiert. Hierbei wird eine Farnesyl-Gruppe kovalent an die Seitenkette der Aminosäure Cystein geknüpft (Abbildung 1). Hierzu ist die Erkennungssequenz C-A-A-X am C-terminalen Ende des Proteins notwendig, wobei C für die Aminosäure Cystein steht. A stellt eine aliphatische Aminosäure dar, und die endständige Aminosäure X ist entweder Serin, Methionin, Alanin oder Glutamin. Unter diesen Bedingungen kann eine Thioether-Bindung zwischen dem C-1 der Farnesyl-Gruppe und der SH-Gruppe des Cysteins katalysiert werden. Durch diese Modifikation gewinnt das Protein lipophile Eigenschaften und kann in die Zellmembran integriert werden.

Die Farnesyltransferase gehört zur Obergruppe der Prenyltransferasen, zu welchen auch die Geranylgeranyltransferasen I und II gezählt werden. Sie katalysieren die gleiche Reaktion, haben jedoch unterschiedliche Protein-Erkennungssequenzen (Sebti SM, 2005).

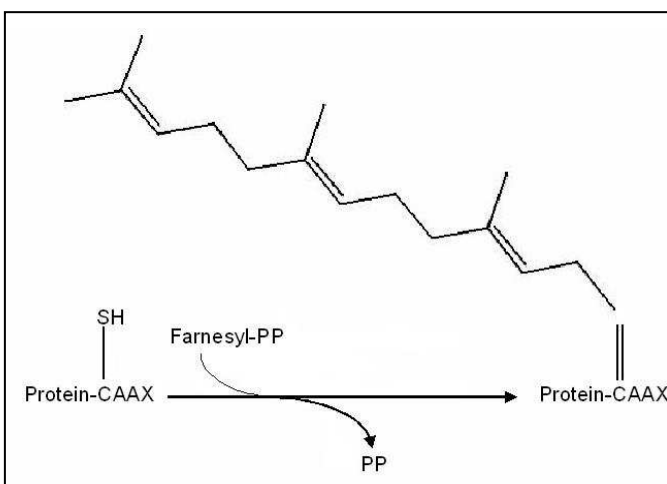


Abbildung 1: Reaktion der Farnesyltransferase

Die Farnesyltransferase ist ein heterodimeres Enzym, bestehend aus einer α -Untereinheit, welche mit Hilfe der Cofaktoren Mg^{2+} oder Mn^{2+} die Übertragung des Farnesylrestes auf das Protein katalysiert, sowie einer β -Untereinheit, welche für die Bindung des Proteins verantwortlich ist und das aktive Zentrum des Enzyms enthält (Andres DA et al., 1993).

Neben dem Vorkommen von Farnesyltransferase in menschlichen Zellen ist ein entsprechendes Enzym auch in anderen Säugetierzellen nachgewiesen worden. Beispielsweise findet sich in Ratten- und Rinderhirn ein Enzym, das zu großen Teilen identisch mit der menschlichen Farnesyltransferase ist und sich vor allem bezüglich des aktiven Zentrums nicht unterscheidet (Omer CA et al., 1993). Auch im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* wurde ein der Farnesyltransferase ähnelndes Enzym gefunden (Chakrabarti D et al., 1998). Außerdem konnte im Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* Farnesyltransferase nachgewiesen werden. Zwar finden sich hier im Vergleich zu Säugetieren große Unterschiede in der Aminosäuresequenz, der Aufbau des katalytischen Zentrums ist jedoch über die verschiedenen Spezies hoch konserviert (Kohl NE et al., 1991).

1.4. Zielstrukturen der Farnesyltransferase

Bisher sind mehr als 100 Proteine bekannt, die eine posttranslationale Prenylierung erfahren (Lane KT, Beese LS, 2006). Zu den Proteinen, die durch die Farnesyltransferase modifiziert werden, gehören vor allem die Signalproteine H-, N- und K-Ras, Kernmembranproteine, Proteine des Kinetochors wie CENP-E und CENP-F, die cGMP Phosphodiesterase α , DnaJ-Hitzeschock-Proteine, die Rhodopsin-Kinase sowie peroxisomale Membranproteine (Mijimolle N et al., 2005).

Die Funktion der Farnesyltransferase ist essentiell für die frühe embryonale Entwicklung. Farnesyltransferase-defiziente Maus-Embryos zeigen ab dem Entwicklungstag E7.5 einen Verlust epiblastischer Zellen. In dieser Phase findet die Implantation statt, bei der sich die Blastocyste in der Gebärmutterschleimhaut einnistet (Sadler TW, 2003). Letztendlich kommt es zu gesteigerter Apoptose und dem Absterben des Embryos spätestens im Stadium E11.5, in dem sich der uteroplazentare Kreislauf ausbildet (Sadler TW, 2003). Nach der Geburt ist die Farnesyltransferase für den Organismus jedoch entbehrlich. In-vivo Versuche an Mäusen, bei denen die Farnesyltransferase auf genetischer Ebene postnatal ausgeschaltet wurde, zeigten lediglich eine um maximal 30 % verzögerte, jedoch

komplette Wundheilung sowie geringgradige Reifungsdefekte bei erythroiden Vorläuferzellen (Mijimolle N et al., 2005).

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass viele Proteine statt durch die Farnesyltransferase auch durch die Geranylgeranyltransferase I prenyliert werden können. Dieses Enzym hat die gleiche α -Untereinheit wie die Farnesyltransferase und eine zu 30 % identische β -Untereinheit. Auch die Erkennungssequenz von Substraten weicht nur in einer Aminosäure von der der Farnesyltransferase ab. Außerdem wurden Reaktionen beobachtet, bei denen selbst Substrate mit der Erkennungssequenz für Farnesyltransferase durch die Geranylgeranyltransferase I prenyliert wurden (Sousa SF et al., 2005).

Dennoch existieren Proteine, welche ausschließlich Substrate der Farnesyltransferase sind und nicht alternativ geranylgeranyliert werden können. Hierzu zählen beispielsweise das Signalmolekül H-Ras, die Zellzyklus-Mediatoren CENP-E und CENP-F sowie das Ko-Chaperon HDJ-2 (Tabelle 1).

Tabelle 1: Wichtige Zielstrukturen der Farnesyltransferase (nach Basso AD et al., 2006)

Protein	alternative Prenylierung?	Funktion
H-Ras	nein	GTPase / Signaltransduktion
CENP E	nein	Kinesin-Motor-Protein
CENP F	nein	Chromosom-Transport-Protein
HDJ-2	nein	Ko-Chaperon
Rheb, Rheb 2	nein	GTPase / Signaltransduktion
Prelamin A	nein	Kernmembranprotein
K-Ras	ja	GTPase / Signaltransduktion
N-Ras	ja	GTPase / Signaltransduktion
RhoB	ja	GTPase / Signaltransduktion
PRL1, PRL2, PRL3	ja (ineffizient)	Tyrosinphosphatase
RhoD, Rho6, Rho7	ja	GTPase
Tc10	ja	GTPase

1.5. Bedeutung der Farnesyltransferase bei Tumorerkrankungen

Somatische Ras-Mutationen sind bei etwa 30 % aller Tumoren nachweisbar. Damit ist dies die am häufigsten auftretende Mutation in Tumorzellen (Sousa SF, 2005). Außerdem finden sich in einer Reihe von Tumoren Mutationen in Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren, welche zu einer erhöhten Aktivierung der Ras-Proteine führen (Downward J, 2003, Tabelle 2).

Mijimolle et al. konnten zeigen, dass die Farnesyltransferase nicht bei der Entstehung von K-Ras mutierten Tumoren involviert ist, jedoch deren Progression beeinflusst (Mijimolle N et al., 2005).

Tabelle 2: Aktivierung von RAS-Signalwegen in verschiedenen Tumoren (nach Downward J, 2003)

Tumor	Häufigkeit der Mutation	mutiertes Molekül
Pankreas	90 %	K-Ras
Colon-Karzinom	45 %	K-Ras
NSCLC	35 %	K-Ras
Seminom	45 %	K-Ras und N-Ras
Melanom	15 %	N-Ras
Harnblasen-Karzinom	10 %	H-Ras
Nieren-Karzinom	10 %	H-Ras
myelodysplastische Syndrome	40 %	N-Ras und K-Ras
AML	30 %	N-Ras
Mamma-Karzinom	30%	ERBB2 / Her2neu
diverse Karzinome	50 %	EGFR

Die Funktion der Farnesylierung von Ras-Proteinen besteht in deren Translokation in die Zellmembran. Durch die Farnesylierung gewinnt das Protein lipophile Eigenschaften und kann so mit in der Zellmembran gelegenen Signalmolekülen interagieren. Hierdurch können Signale von Wachstumsfaktoren in den Zellkern weitergeleitet werden und die Transkription beeinflussen (Abbildung 2).

Während das Molekül H-Ras ausschließlich Substrat der Farnesyltransferase ist, können die verwandten Proteine K-Ras und N-Ras auch auf einem alternativen Weg prenyliert werden. In Abwesenheit von Farnesyltransferase werden diese Proteine durch die Geranylgeranyltransferase I prenyliert.

Auch während der Mitose spielt die Farnesylierung eine wichtige Rolle: Die Moleküle CENP-E und CENP-F sind Mediatoren des G₂-M-Checkpoints im Zellzyklus (Costa RH, 2005). In diesem Schritt wird das Genom auf Schäden überprüft, bevor es in die Mitose eintritt. Die Farnesylierung der Proteine CENP-E und CENP-F ist notwendig für die Interaktion von Mikrotubuli und Centromer und somit für die Trennung der Schwesterchromatiden während der Mitose. Ist die Farnesylierung dieser Proteine gestört, kommt es zu einer Akkumulation von Zellen in diesem Schritt und somit zu einer verminderten Replikation (Ashar et al., 2000).

Weiterhin beeinflusst die Farnesyltransferase die posttranslationale Proteinfaltung: Das Molekül HDJ-2 ist eines der Co-Chaperone der humanen DNA-J homologen Proteine (HDJ-Proteine). Es stimuliert die ATPase-Aktivität des Hitzeschockproteins 70 (Hsp70) und initiiert somit die Proteinfaltung. Diese ist für eine adäquate Funktion von diversen Proteinen nötig. Nur in farnesyliertem Zustand kann es seine Funktion ausüben. HDJ-2 ist

ausschließlich Substrat der Farnesyltransferase und wird nicht alternativ durch die Geranylgeranyltransferase I prenyliert (Basso AD et al., 2006).

HDJ-2 findet sich beim Menschen ubiquitär in peripheren Zellen und kann somit gut als Marker genutzt werden, um den Grad der Farnesylierung von Proteinen zu bestimmen. Als so genanntes Surrogatprotein findet es Anwendung in verschiedenen klinischen Studien zur Evaluierung der Wirksamkeit von Farnesyltransferaseinhibitoren (Lancet JE et al., 2007).

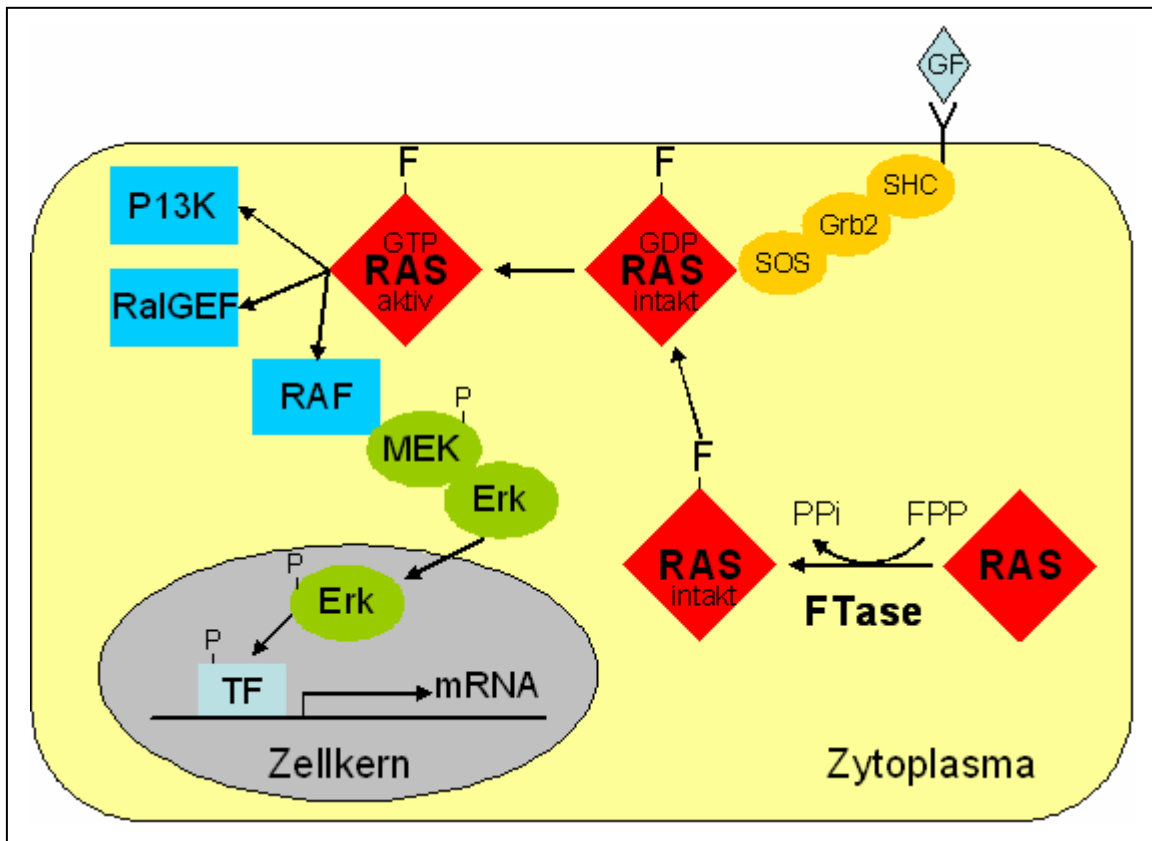


Abbildung 2: Signaltransduktion in Zellen. Die Signale von Wachstumsfaktoren (GF) werden über die Adaptermoleküle SHC, Grb2 und SOS an Ras weitergeleitet. Dieses befindet sich nur nach erfolgter Farnesylierung im Bereich der Zellwand. Effektormoleküle von Ras sind vor allem die Serin-Threonin-Kinase Raf I (RAF), welche über eine weitere Kaskade die Transkription im Zellkern beeinflusst, außerdem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (P13K) und der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor der GTPase Ral (RalGEF). Diese beeinflussen Zellwachstum und Apoptose.

1.6. Klinische Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren

Inhibitoren der Farnesyltransferase wurden ursprünglich entwickelt, um das Signalmolekül Ras in Tumorzellen zu beeinflussen. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass Farnesyltransferaseinhibitoren (FTIs) ein weitaus komplexeres Wirkungsspektrum haben (Caponigro F et al., 2003).

Die ersten Versuche, die Farnesylierung von Signalproteinen zu hemmen, erfolgten mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin (Girgert et al., 1994). Der Nachteil dieser unspezifischen Substanz ist jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen, die durch die gleichzeitig eingeschränkte Synthese von anderen Produkten der Cholesterinbiosynthese entstehen.

Eine Weiterentwicklung von Inhibitoren der Farnesyltransferase ist α -Hydroxyfarnesylpyrophosphat, ein Farnesylpyrophosphatanalogon, das die Übertragung des Farnesylrestes auf Substrate verhindert (Girgert R et al., 1999).

Mittlerweile ist eine Reihe von Peptidomimetika verfügbar, welche die Erkennungssequenz CAAX der Farnesyltransferase enthalten und somit als falsche Substrate der Farnesyltransferase die Farnesylierung der eigentlichen Zielproteine verhindern.

Die bisherigen Erfolge des klinischen Einsatzes von FTIs sind sehr unterschiedlich: Kohl NE et al. konnten bereits 1995 herausragende Erfolge in Tierversuchen beschreiben: Transgene Mäuse mit Mutationen im Ha-ras-Gen, welche spontane Mamma- und Speicheldrüsentumoren entwickelten, sprachen auf eine Therapie mit dem Farnesyltransferaseinhibitor L-744832 an. Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch konnte nach einigen Wochen eine nahezu vollständige Rückbildung der Tumoren beobachtet werden; Nebenwirkungen traten nicht auf (Kohl NE et al., 1995).

Auch in Phase-II-Studien bei Patienten konnten Erfolge verzeichnet werden: Frauen mit fortgeschrittenem Mamma-Karzinom profitierten von einer Behandlung mit einem FTI, und dies, obwohl nur die wenigsten Brusttumoren Mutationen im Ras-Gen zeigen (Johnston SR et al., 2003).

Die größten Erfolge wurden bisher bei der Behandlung von hämatologischen Tumoren erzielt. Beispielsweise profitierten Patienten hohen Alters (> 75 Jahren) mit akuter myeloischer Leukämie (AML), welche unter Chemotherapie zumeist eine sehr schlechte Prognose haben, von der Behandlung mit dem FTI Tipifarnib. In einer Phase-II-Studie sprachen 24% der Patienten auf die Behandlung an, darunter 14% mit einer vollständigen Remission (Lancet JE et al., 2007).

Auch Patienten mit fortgeschrittenem multiplem Myelom konnten aus einer Behandlung mit Tipifarnib Nutzen ziehen: In einer Phase-II-Studie sprachen 64% der Patienten, die zuvor erfolglos chemotherapiert wurden, auf die Behandlung mit dem FTI an (Alsina M et al., 2004).

In anderen Studien jedoch waren die Ergebnisse ernüchternd: Die Behandlung von Patienten mit Pankreastumoren mit einem FTI beispielsweise war erfolglos, obwohl K-Ras Mutationen nahezu universell in diesen Tumoren zu finden sind (Cohen SJ et al., 2003).

Auch die Behandlung von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungentumoren zeigte nicht den erhofften Erfolg. Obwohl diese Tumoren häufig Mutationen des K-Ras-Gens zeigen und nach Therapie mit Tipifarnib eine Blockade der Farnesyltransferase in peripheren Zellen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich klinisch keine Tumorregression (Adjei et al., 2003).

Da der Erfolg einer FTI-Therapie weder vom Ras-Mutationsstatus, noch vom Grad der Farnesyltransferasehemmung abzuhängen scheint, existiert somit zur Zeit kein Marker zur Identifizierung von Patienten, die von einer Therapie mit FTIs profitieren.

Bisher konnte keines der Medikamente eine Zulassung auf dem internationalen Markt erlangen. Ein Versuch von Johnson & Johnson, eine Zulassung für ihr Produkt Zarnestra® (Tipifarnib) für die Behandlung von an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Patienten zu erlangen, scheiterte 2005 vor der US-Gesundheitsbehörde FDA auf Grund von Unklarheiten bei den Studienergebnissen (Mitteilungen des FDA Advisory committee, 2005).

1.7. Das Gen *FNTB*

Das Gen *FNTB* kodiert für die β -Unterheit der Farnesyltransferase. Es liegt auf dem langen Arm des Chromosom 14 an der Position q23-q24 (Andres DA et al., 1993) und besteht aus 12 Exons sowie einem vorgeschalteten Promotor, der 1300 Basenpaare lang ist. Das ATG liegt im Exon 1 an Position 166. Zur Lagebezeichnung von Oligonukleotiden und Polymorphismen wird diese Stelle als +1 bezeichnet und von hier aus in Richtung 5'-Ende des Gens abwärts, und in Richtung 3'-Ende des Gens aufwärts gezählt.

1.8. Single nucleotide polymorphisms

Die Abkürzung SNP steht für „single nucleotide polymorphism“. Dies sind Basenaustausche, die ein einzelnes Nukleinbasenpaar innerhalb des DNA-Stranges betreffen und mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % in einer Population auftreten. Hierbei kann es sich um den Austausch einzelner Basen handeln, oder auch um die Deletion oder Insertion eines Basenpaares. Diese Variationen können in allen Abschnitten

des Genoms auftreten, also in kodierenden Sequenzen, wo sie unter Umständen den Austausch einer Aminosäure zur Folge haben, aber auch in nicht kodierenden Introns oder im Promotor, wo sie beispielsweise Einfluss auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren nehmen können.

Im menschlichen Genom sind über 35.000 SNPs in genregulierenden Regionen bekannt, und vor allem nahe dem Translationsstart finden sich gehäuft SNPs (Guo Y, Jamison DC, 2005). Gerade in Regionen, welche Transkriptionsfaktoren binden, ist das Vorkommen von SNPs von Bedeutung: hier ist durch einen einzelnen Basenaustausch eine vermehrte Expression, oder aber auch eine Repression der Proteinsynthese möglich.

1.9. Pharmakogenetische Aspekte

Auf Grund der sehr divergenten Ergebnisse von Studien zur klinischen Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren stellt sich die Frage, warum einige Patienten ein Ansprechen auf die Therapie zeigen, andere jedoch nicht profitieren.

Neben den teilweise immer noch unbekanntem Zielstrukturen der Farnesyltransferaseinhibitoren ist ein Erklärungsansatz die genetische Heterogenität des Menschen. So ist es denkbar, dass Polymorphismen im Gen der Farnesyltransferase zum einen Einfluss auf die Tumorentstehung, zum anderen aber auch auf die Wirksamkeit von Inhibitoren haben.

Ein bekanntes Beispiel für ersteres Phänomen ist das Tumorsuppressorgen p53. Punktmutationen in diesem Gen haben den Verlust des kodierten Proteins zur Folge, so dass beispielsweise DNA-Reparaturen oder die Induktion der Apoptose nicht mehr stattfinden. So haben Mutationen im Gen p53 maßgeblichen Einfluss auf die Tumorentstehung (Kirsch DG, Kastan MB, 1998).

Auch Mutationen anderer Gene gehen mit einer erhöhten Inzidenz von Tumorerkrankungen einher: Keimbahnmutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* beispielsweise sind ein Risikofaktor für die Entstehung von Brustkrebs (Boulton SJ, 2006).

Ein Beispiel für die Wirksamkeit von Inhibitoren abhängig von Mutationen der Zielstrukturen ist die veränderte Expression des Wachstumsfaktor-Rezeptors Her2/neu im Tumorgewebe der Brust. Dieser ist durch somatische Mutationen im Gewebe in 25% der Fälle überexprimiert, was mit einem verbesserten Ansprechen auf den spezifischen Antikörper Trastuzumab (Herzeptin®) einhergeht und im Sinne einer sogenannten „targeted therapy“ genutzt wird (Viani GA et al., 2007).

Untersuchungen zu den Auswirkungen von Mutationen in den kodierenden Sequenzen von *FNTB* sind bereits durchgeführt worden (Raz T et al., 2007). Zwar fanden sich hierbei verschiedene Exon-Mutationen, die *in Vitro* eine Resistenz gegenüber FTIs zeigten, diese konnten jedoch bei Patienten, welche resistent gegenüber dem FTI Lonafarnib waren, nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der regulierenden Bereiche des Gens *FNTB* jedoch waren bisher nicht Gegenstand der Forschung. Möglicherweise findet sich hier ein Erklärungsansatz für die divergenten Ergebnisse klinischer Studien mit Farnesyltransferase-Inhibitoren.

1.10. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Untersuchungen war die strukturelle und funktionelle Analyse der Promotorregion des Gens *FNTB* sowie die Identifizierung von Polymorphismen in diesem Bereich. Die funktionelle Analyse von Polymorphismen und deren Auswirkung ist ein wichtiger Schritt zum Verständnis der Entstehung von Krankheiten sowie deren Ansprechen auf spezifische Therapien.

Da Farnesyltransferaseinhibitoren *in vitro* herausragende Erfolge erzielt haben, *in vivo* jedoch die hohen Erwartungen teilweise nicht erfüllen konnten, stellt sich der Verdacht, dass genetische Heterogenitäten Grund für dieses Missverhältnis sein könnten. Durch die genetische Analyse der katalytischen Einheit der Farnesyltransferase sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Polymorphismen und Tumorenstehung untersucht werden.

Hierzu wurde zunächst das Vorkommen zweier bereits in Datenbanken eingetragener SNPs validiert. Im Rahmen der Sequenzierungsarbeiten konnte ein weiterer Polymorphismus gefunden werden. Verschiedene Tumorkollektive wurden auf die Verteilung der SNPs untersucht und klinische Parameter sowie das Überleben wurde abhängig vom Genotyp ausgewertet.

Mit Hilfe von Kopplungsanalysen war es möglich, die Haplotypen des *FNTB*-Promotors zu bestimmen.

Außerdem wurden funktionelle Analysen der Polymorphismen durchgeführt: das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren, die Promotoraktivität sowie die Expression von mRNA abhängig von Geno- und Haplotyp wurde mit verschiedenen molekulargenetischen Methoden untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. *Material*

2.1.1. Geräte

Analysenwaage	Denver Instrument
Autoklav	Fedegari
Brutschrank	Memmert
Geldokumentation	Intas
Heizblock	Eppendorf
Inkubationsschüttler	IKA-Labortechnik
Kühlschleife	LKB Bromma
Magnetrührer	Heidolph
Mikrowelle	Lunik
Netzgeräte	Amersham Pharmacia Biotech, Appligene oncor
Photometer	LKB
Pipetten	Thermo
RT-PCR System	Applied Biosystems
Spectrophotometer	Nanodrop Peqlab
Sterilbank	Heraeus
Thermocycler	Biometra
Thermomixer	Eppendorf, New Brunswick Scinetific Co. inc.
UV Stratalinker	Stratagene
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	Köttermann
Zellzähler	Schärfe Systems
Zentrifugen	Eppendorf, Heraeus, Hettich

2.1.2. Chemikalien und Enzyme

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen AppliChem, Boehringer, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Roche Applied Science, Roth, Serva und Sigma und wurden in p.a. Qualität bezogen.

Enzyme

Die verwendeten Enzyme sowie die zugehörigen Reaktionspuffer, welche mit den Nummern 1 – 4 bezeichnet waren, stammten von der Firma New England Biolabs (NEB).

PCR-Primer

Alle verwendeten Primer stammten von MWG Biotech AG (Ebersberg).

2.1.3. Medien

Falls nicht anders angegeben, betrug das Endvolumen jeweils 1 Liter.

Die Sterilfiltration wurde mit einem 0,22 µm Filter durchgeführt.

Bakterienmedium flüssig (LB-Medium)

Das Bakterienmedium wurde in fester Form von der Firma Roth bezogen und in einer Konzentration von 25 g/l in Aqua dest. gelöst. Die Sterilisation im Autoklav erfolgte bei 121° C für 20 Minuten.

Bakterienmedium fest

Um festes Bakterienmedium zu erhalten, wurde dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar-Agar in Pulverform zugegeben. Das sterilisierte Medium wurde auf der Sterilbank blasenfrei in Petrischalen gefüllt und härtete bei Raumtemperatur aus.

Bakterienmedium zur Selektion

Nach dem Autoklavieren wurde dem auf 60° C abgekühlten Medium 0,1 mg/ml Ampicillin und 0,5 mg/ml X-Gal zugegeben.

2.1.4. Biologisches Material

DNA zur Untersuchung der ethnischen Verteilung der SNPs

Kaukasier

Das eingesetzte DNA-Material stammte von gesunden Blutspendern aus Essen.

Chinesen

Es wurde die DNA von männlichen Studenten aus der Wuhan-Provinz (China) untersucht.

Schwarz-Afrikaner

Die untersuchte DNA stammte von Shona aus Harare (Simbabwe), welche gesunde Blutspender waren.

DNA für Überlebensanalysen bei verschiedenen Tumorerkrankungen

Mamma Karzinom

Für die DNA-Untersuchung von an Brustkrebs erkrankten Frauen wurde auf ein Kollektiv zurückgegriffen, welches bereits im Rahmen einer früheren Studie zur Untersuchung von Polymorphismen und deren Einfluss auf das Überleben bei Patientinnen mit Mamma Karzinom gewonnen worden war (Bachmann HS et al., 2007). Es handelte sich um nichtneoplastisches Gewebe von Frauen, die an einem histopathologisch gesicherten einseitigen Mammakarzinom erkrankt waren. Die Daten zu Überleben und Tumorprogression wurden über einen Zeitraum von 80 Monaten gesammelt. Außerdem wurden histologische Informationen wie Klassifikation des Tumors, Tumorstadium, Lymphknotenbefall, Mitoserate und Differenzierungsgrad in die Datenerfassung einbezogen.

Melanom

Das DNA-Material zur Untersuchung von Melanom-Patienten und die zugehörigen klinischen Daten stammten aus der dermatologischen Klinik der Ruhr-Universität Bochum im St. Josef Hospital.

Multiples Myelom

In die Untersuchungen wurden Blutproben von 116 Patienten deutscher Abstammung, die in der Klinik für Hämatologie (Universitätsklinikum Essen) auf Grund eines eindeutig diagnostizierten multiplen Myeloms behandelt worden waren, einbezogen. Klinische und pathologische Daten sowie das 5-Jahres-Überleben waren bereits für frühere Studien aus den Patientenakten sowie aus Daten des Einwohnermeldeamtes bezogen worden. Das durchschnittliche Follow-up betrug 60 Monate.

Nierenzell Karzinom

Es wurde auf ein Kollektiv zurückgegriffen, welches bereits für eine Studie gewonnen worden war, in welcher Polymorphismen sowie deren Einfluss auf das klinische Outcome bei Patienten mit Nierenzellkarzinom untersucht worden waren (Frey UH et al., 2006). Die DNA wurde von 150 Patienten nach Nephrektomie aus dem entnommenen Gewebe oder einer Blutprobe gewonnen, und die Patienten über einen Zeitraum von 10 Jahren

beobachtet. Neben den Daten zu Überleben und Tumorprogression wurden ebenfalls histologische Informationen aufgenommen.

Zellkernextrakte zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion (EMSA)

Die Zellkernextrakte aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) sowie aus den Zellreihen verschiedener B-Zell-Lymphome (KARPAS 422 und SUDH 6) standen bereits zur Verfügung und wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Klonierungsvektoren zur Präparation von Plasmid-DNA

Die Vektoren sowie die Informationen über Aufbau und Gebrauch stammten von den Firmen Promega (pGEM-T Easy) und Clontech (pSEAP2-Basic und pSEAP2-Control).

pGEM-T Easy

Der 3015 bp große Vektor pGEM-T Easy ist ein gebräuchliches Plasmid, in das PCR-Produkte zur Klonierung eingebracht werden können.

Die Multiple cloning site (MCS) wird von den Promotoren SP6 und T7 flankiert; innerhalb der MCS finden sich Schnittstellen für diverse Restriktionsenzyme.

Weiterhin enthält das Plasmid das β -Galactosidase-Gen (*lacZ*), welches durch α -Komplementierung die Blau/Weiß Selektionierung ermöglicht, sowie ein Gen für Ampicillinresistenz (Abbildung 3).

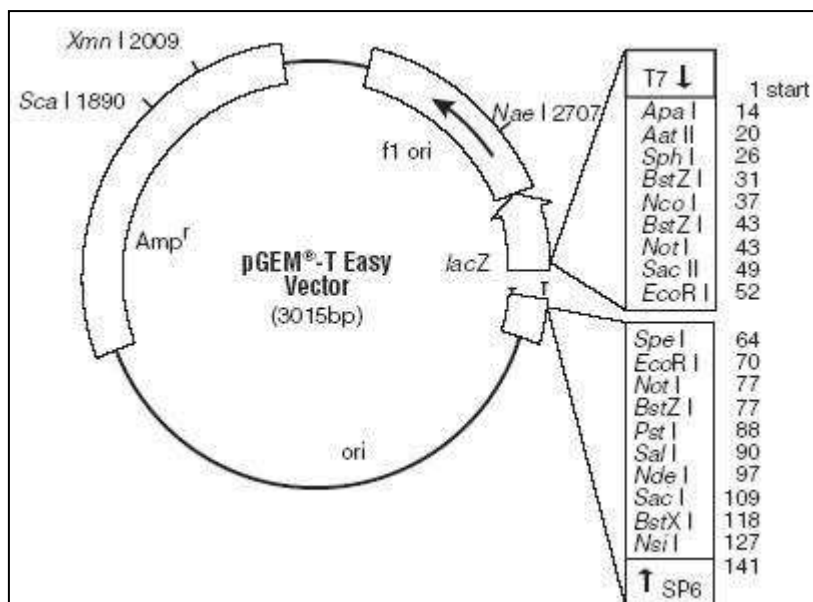


Abbildung 3: Genkarte des Klonierungsvektors pGEM-T Easy (Promega)

pSEAP2

Der 4700 bp große Vektor pSEAP2 kodiert für das Reporter Gen „sekretorische alkalische Phosphatase“ (SEAP). Im Vektor pSEAP-Basic fehlen Promotor- und Enhancer Sequenzen. Die Multiple cloning site (MCS) ermöglicht es jedoch, Promotor-DNA-Sequenzen in 5'-Richtung oberhalb des SEAP Gens zu inserieren. So ist es möglich, die Aktivität des inserierten Promotors anhand der Menge der exprimierten SEAP zu quantifizieren.

Der Kodierungssequenz für SEAP folgt im Vektor ein Signal zur Polyadenylierung (SV 40 poly A), um die zuverlässige Transkription in eukaryoten Zellen sicher zu stellen. Unspezifische Hintergrundaktivität wird durch einen synthetischen Transkriptionsstopp (TB) mit anschließender Polyadenylierung minimiert, welcher auf dem Gen unmittelbar nach der MCS in 5'-Richtung folgt.

Außerdem findet sich im Vektor ein Gen für Ampicillinresistenz, welches die Selektion von transformierten und nicht transformierten Zellen ermöglicht (Abbildung 4).

Das Plasmid pSEAP2-Control beinhaltet im Gegensatz zum pSEAP2-Basic zusätzlich den SV40 Promotor sowie den SV40 Enhancer und stellt somit eine Positivkontrolle bei Versuchen zur Aktivitätsmessung von Promotoren oder Enhancern dar.

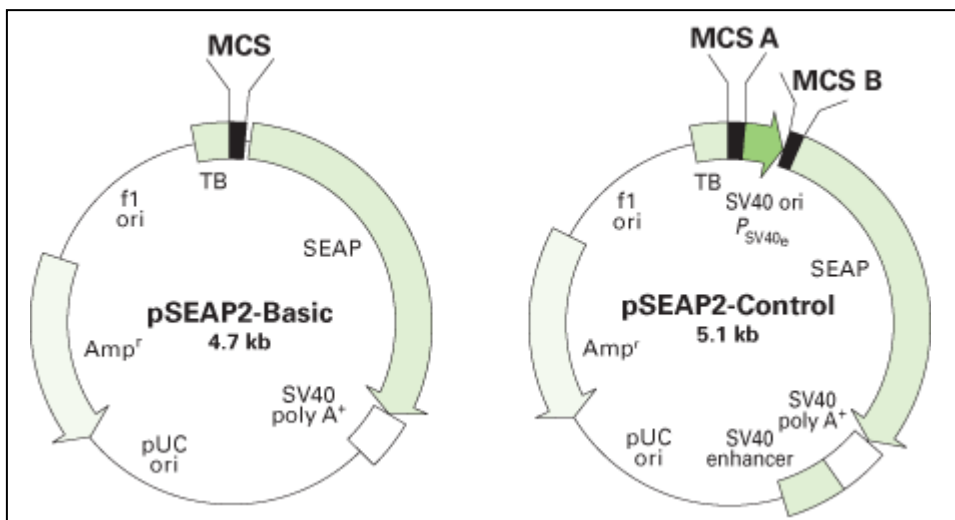


Abbildung 4: Genkarte des Klonierungsvektros pSEAP2-Basic und pSEAP2-Control (Clontech)

Bakterienstamm zur Präparation von Plasmid-DNA

Es wurde der Bakterienstamm E. coli DH5 α von der Firma Invitrogen bezogen.

Genotyp: fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

Gewebe zur Untersuchung der Gen-Expression mittels Realtime-PCR

Zur Quantifizierung der mRNA wurde ein Kollektiv von Patienten mit Nierenzellkarzinom herangezogen (Frey UH et al., 2006). Die hierfür benötigte cDNA stand bereits konserviert zur Verfügung. Als gesunde Kontrollgruppe diente cDNA aus Vollblut von gesunden Probanden aus dem Institut für Pharmakogenetik (Universität Duisburg-Essen).

2.1.5. PCR-Primer

Die Lage der Primer im *FNTB*-Promotor ist in Abbildung 5 dargestellt.

Primer zur Untersuchung der gesamten Promotorregion im Gen *FNTB*

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'-Richtung	Länge (-mer)
FNTB Pr1-0 Se	ATA CTG TTC TTC TGG ATG ACT CCT	27
FNTB Pr1-0 As	CGT TGT TTC CAC CGA GTC GTC CTG	21

Primer zur Untersuchung des Polymorphismus *FNTB* -609

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'-Richtung	Länge (-mer)
FNTB Pro Se	GCG GAC TGA CTG TCT ATT T	19
FNTB Pro As	GAC GCC GTC TCA GTA TCA	18

Primer zur Untersuchung des Polymorphismus *FNTB* -173

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'-Richtung	Länge (-mer)
FNTB G-1 Se	GCA GCA GCT CCT CTG TCC AA	20
FNTB G2 As	ACT CGA GCG GGC TAA AGC	18

Primer zur Untersuchung des Polymorphismus *FNTB* -179

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'-Richtung	Länge (-mer)
FTNB 3 Se	GCA GCA GCT CCT CTG CGC AA	20
FNTB G2 As	ACT CGA GCG GGC TAA AGC	18

Der Primer FNTB 3 Se wurde als sogenannter Mismatch-Primer gewählt. Er stimmte in einer Base nicht mit der Erkennungssequenz überein (Cytosin wurde durch Guanin ersetzt). Hierdurch war es möglich, eine Restriktionsstelle bei einem der Allele zu generieren.

Primer zur Untersuchung der Gen-Expression (Realtime-PCR)

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'-Richtung	Länge (-mer)
FNTB RT 03 Se	CTT CTC CGA GTT CTT TCA	18
FNTB RT 03 As	ATC TTT TCT TCT ACT TTT GC	20

64,521,960	acttggttgt tctggaggca agtgtgatga gtaagtccac tccataagaa	
64,522,010	tcaataagaa tttcttttat tctagctggg cgtgggtggg agcatctgta	
64,522,060	gttccagata ctcaggaggc tgaggcagga gggcacttg agcctatggt	
64,522,110	ttttgtttgt tttttgttt tgcttttttt ttttttttga aacagggtct	
64,522,160	cgctctgcca cccaggctgg agtgcagtgg cacaatcata gctcactgca	
64,522,210	gcctcgactt cttgggctca agagatcctc ccaccttagc ctgctcgagca	
64,522,260	gctgggacta caggcatgcg ccaccacgcc cggctaattt ttttgatatt	
64,522,310	taatagagat gaggctctgc tatggtgccc aggatgttct aactcctcaa	
64,522,360	gtgatcctcc tgcctcagcc tcccaaagtg ctggggttac aggcgtgagc	
64,522,410	caccgtgccc agcacatgct ttctaaaage tgctgtttct tctttttca	
	FNTB Prl-0 Se ATACTGT TCTTCTGGAT GACTCCTCGT	
64,522,460	ggagttcttt cccatactgt tcttctggat gactcctcgt catccttcgg	
64,522,510	atctcaaatg aaaggctcatt tagagaggct tggcctgacc atacaattca	
64,522,560	attagtttct tacccttta gtctctctca tagacctgt tattttcctt	
64,522,610	catctcattt atcacaagtc ttcataatatt tattgcgttg gatacattca	
64,522,660	attctgtcga ttttcttaga atgtaaggtt tccaagggaa gggactctgt	
64,522,710	ttgttctact tttgtattcc tagaacctag cacaatgctt gacacatagc	
	FNTB Pro Se G CGGACTGACT GTCTATT	
64,522,760	agggtttcca taaatatctg cggactgact gtctatttca cttatccttg	
	G>C (-609)	
64,522,810	ttccttgtaac tgcatttcag ttctcgctac tgcagtgtaa cctccaagag	
	TGATACTGA	
64,522,860	acaggagaaa atcataatac cccctcctcc ccatcactga gtgatactga	
	GACGGCGTC FNTB Pro AS	
64,522,910	gacggcgctcc ttgcacgttt gacgagctgc tgccttctcc tgggaggctg	
64,522,960	tcaagtaccc caagggtcac aataattctt ttagtaattg cctgactgag	
64,523,010	gcaaatcagt agagctgtca gaaatgcttt caaacttaac attcattggg	
64,523,060	ttcttgggca cctgaaattg caaacaattg cattacaatt aagtgagaat	
64,523,110	tagcagaatg ttacagttct ttaacaattt gcgtaacaaa ccgaggcgtc	
64,523,160	ctacgcatc tcgctgaaat gaaattcggg tgtagacacc cttgcgcttc	
	FNTB G-1 Se GCAG CAGCTCCTCT GTCCAA	
	FNTB G Se CAG CAGCTCCTCT GTCCAAT	
	FNTB 3 Se GCAG CAGCTCCTCT GCGCAA	
	(-179) T>A del G (-173)	
64,523,210	aggactctac gctcttgca gactcctct gcccaatggg gg[g]cggcagc	
64,523,260	atctcagtaa ctactcgaa agacgggtag gcgggaggag acattcgcgt	Exon 1
	TA TCCGCTCGCC GTAGCG FNTB G AS	
	GCTTT AGCCCGCTCG	
64,523,310	tcaaaatctt tttgctcta tccgctcggc gtagcgcttt agcccgtcg	
	AGT FNTB G2 AS	
64,523,360	agtttcaatg cgcgttgttg cttaacgaag cagagtccta cacactgtct	
64,523,410	gctgctctcc tgatcATGGC TTCTCCGAGT TCTTTCACCT ACTATTGCC	
64,523,460	TCCATCTTCC TCCCCCGTCT GGTCAGAGCC GCTGTACAGT CTGAGGCC	
	CAGGACGACT CGGTGGAAC A FNTB Prl-0 AS	
64,523,510	AGCACGCGCG AGAGCGGTTG CAGGACGACT CGGTGGAAC AGTCACGTCC	
64,523,560	ATAGAACAGG TGAGGTGGCA GGACTGGGCG AGGCGCCCGC GCGATGTGTT	Intron 1
64,523,610	CTGGGAGCGC GAGTCCCGTT CGTAGGGCCG CCCGGGTGCG GAACTCACCG	
64,523,660	GGGAACACTAG ACTCCACAG CGCACCGCGG TGCTTTTCTT CTGGGAAGCT	
64,523,710	CCGGGCGCCC AGGCTTGGGC TTCGTCTGCG AGCGTTTGGC CGGCCAGCTT	
64,523,760	GGGAAGGGT CGTTTCAAGG TTGGGCTTGG AGGAGAGGGC AGTAGCCGAG	
64,523,810	TCCCTCTGC CCTAAAGAAC GAGAAGAATC GTGTTCTATG CCTGGAGGAC	

Abbildung 5: Sequenz des Promotors im *FNTB*-Gen und Lage der PCR-Primer

2.2. Methoden

2.2.1. DNA Präparation aus Blut

Es wurde nach dem „Blood and Body Spin Protocol“ (Quiagen, 02/2003) vorgegangen unter Nutzung des QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

2.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch Polymerase Chain Reaction, PCR) ermöglicht es, DNA-Abschnitte definierter Länge und Sequenz in vitro zu vervielfältigen. Der Prozess läuft in drei sich vielfach wiederholenden Schritten ab (Abbildung 6):

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Danach lagern sich synthetische komplementäre Oligonukleotide, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt flankieren (sog. Primer), an die Einzelstränge an (Annealing). Diese dienen im dritten Schritt als Startpunkte für eine thermostabile Polymerase, welche den DNA-Abschnitt zwischen den definierten Primer-Paaren amplifiziert.

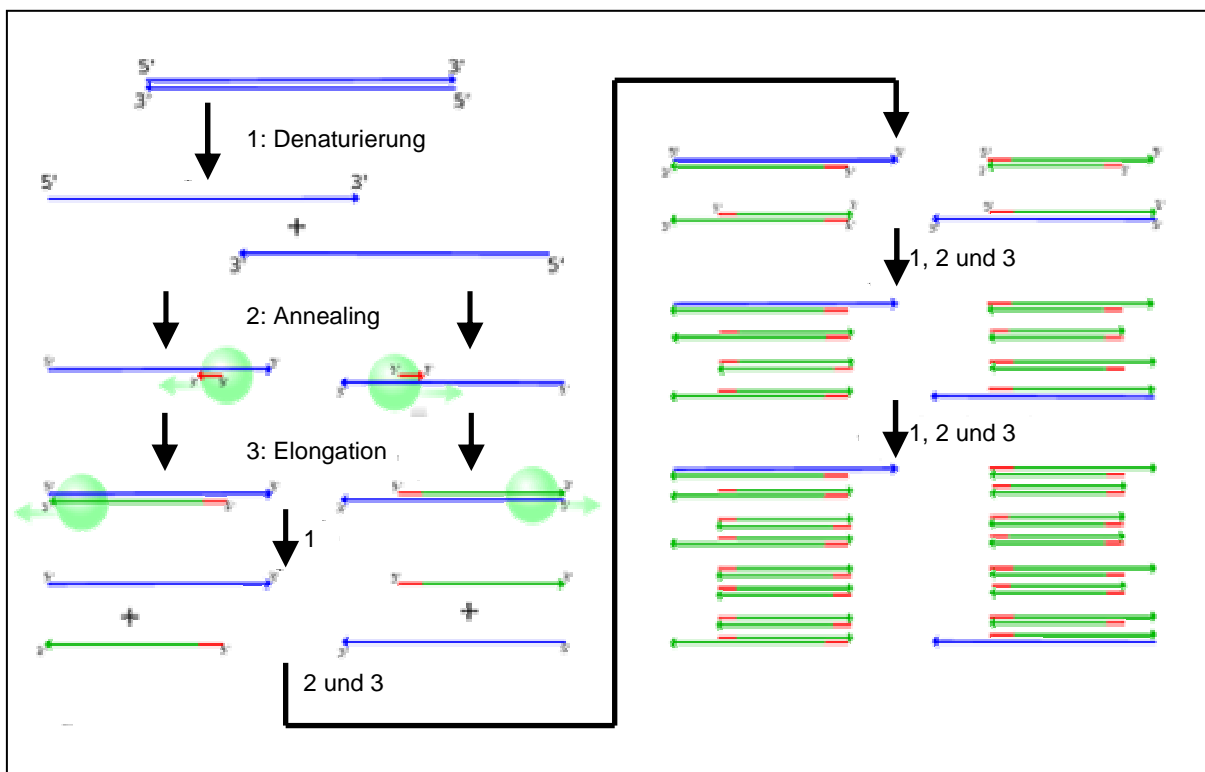


Abbildung 6: Schematische Darstellung der PCR-Reaktion

Anforderungen an Temperatur und Zyklendauer:

1. Denaturierung

DNA-Doppelstränge werden durch Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen Guanin (G) und Cytosin (C) sowie Thymin (T) und Adenin (A) vernetzt. Dabei bilden sich zwischen G und C drei, zwischen T und A jedoch nur zwei Wasserstoffbrücken. Um eine Wasserstoffbrücke zu lösen, ist eine definierte Menge an Energie erforderlich.

Somit ist die Temperatur, bei der doppelsträngige DNA-Abschnitte denaturieren, abhängig von ihrem GC-Gehalt. Je höher der GC-Gehalt einer DNA-Probe ist, desto höher liegt die Denaturierungstemperatur.

Bei DNA-Proben mit einem GC-Gehalt < 55% ist eine Denaturierungstemperatur von 95°C über einen Zeitraum von 30 sec ausreichend, um den Doppelstrang vollständig in zwei Einzelstränge aufzutrennen.

2. Annealing

Die Annealingtemperatur hängt von Länge und Sequenz der Primer ab. Je höher der GC-Gehalt der Primer ist, desto höher liegt auch die Annealingtemperatur. Die optimale Temperatur liegt 3 – 5 °C unter deren Schmelztemperatur. Diese kann bei gewöhnlichen Primern mit einer Länge von 18 – 25 Basenpaaren mit Hilfe der folgenden Formel abgeschätzt werden: $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (A + T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G + C)$ (Sambrook J, Russell D, 2000).

Ist die Annealingtemperatur zu hoch, binden die Primer nur schwach oder gar nicht an die komplementären DNA-Stränge. Bei einer zu niedrigen Annealingtemperatur können unspezifische Bindungen zwischen Primer und DNA auftreten.

Eine Zeitspanne von 30 sec ist für das Anlagern der Primer an den DNA-Strang ausreichend.

Bei der Slowdown-PCR wird die Annealingtemperatur nach je einem oder mehreren Zyklen stufenweise erniedrigt, und es werden zusätzlich kleine Heiz- und Kühlraten benutzt. Dies führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für spezifische Primerbindungen (Bachmann, H. S. et al., 2003).

3. Elongation

Die Elongationstemperatur hängt vom eingesetzten Enzym ab. Bei der hier verwendeten Taq-Polymerase liegt das Temperaturoptimum bei 72 – 78 °C, so dass die Elongation in diesem Temperaturbereich am effizientesten ablaufen kann.

Die Dauer des Elongationsschrittes ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes und der verwendeten Polymerase. Als Faustregel gilt, dass die

Elongation pro 1000 Basenpaare für die Taq-Polymerase eine Minute andauern sollte. Die Pfu-Polymerase dagegen kann in einer Minute lediglich 500 Basenpaare vernetzen, wobei jedoch durch eine zusätzliche Funktion Fehler bei der Kettenverlängerung minimiert werden.

Die Anzahl der Zyklen insgesamt ist abhängig von der Ausgangskonzentration der zu vervielfältigenden DNA. Mindestens 25 Zyklen sind nötig, um genügend Amplifikationsprodukt zu erhalten.

Anforderungen an die Primer

Um eine möglichst spezifische Bindung zu gewährleisten, sollten Primer 18 – 25 Basenpaare lang sein, einen GC-Gehalt von 40 – 60 % aufweisen, keine palindromischen Sequenzen enthalten und keine zueinander komplementären Abschnitte enthalten. Das Primer-DNA-Hybrid kann durch ein G oder C am 3'OH-Ende des Primers stabilisiert werden, längere GC Abschnitte sollten auf Grund der festen Bindung jedoch vermieden werden (Sambrook J, Russell D, 2000).

Taq-Polymerase und zusätzliche Komponenten

Der MasterMix der Firma Eppendorf beinhaltet eine Taq-Polymerase sowie als Substrate Desoxynukleosidtriphosphate. Diese liegen im Master Mix als dATP, dTTP, dCTP und dGTP in äquimolaren Mengen vor. Außerdem finden sich verschiedene Ionen, die die Bedingungen für die Elongationsreaktion optimieren.

Slowdown-PCR für den Promotor im *FNTB*-Gen

Ansatz:

15 µl MasterMix
1 µl Primer *FNTB* Pr1-0 Se
1 µl Primer *FNTB* Pr1-0 As
13 µl H₂O

+ je 2 µl DNA

Thermocycler:

95°C	3 min	
95°C	30 sec	}
70°C*	15 sec	
72°C	70 sec	
95°C	30 sec	
70°C	15 sec	
72°C	70 sec	
95°C	30 sec	
70°C	15 sec	
72°C	70 sec	
95°C	30 sec	
55°C	15 sec	}
72°C	70 sec	
72°C	10 min	

18 x

15 x

Erwartetes PCR-Produkt: 1078 bp

*) bei jeder Wiederholung verringerte sich die Temperatur bei diesem Schritt um 1°C

PCR für den Polymorphismus *FNTB* -609

Ansatz:

15 µl MasterMix
1 µl Primer *FNTB* Pro Se
1 µl Primer *FNTB* Pro As
13 µl H₂O

+ je 2 µl DNA

Thermocycler:

95°C	5 min	
95°C	30 sec	}
61°C	40 sec	
72°C	45 sec	
72°C	10 min	

38 x

Erwartetes PCR-Produkt: 140 bp

PCR für den Polymorphismus *FNTB* -173

Ansatz:

21 µl MasterMix
1 µl Primer *FNTB* G-1 Se
1 µl Primer *FNTB* G2 As
17 µl H₂O

+ je 2 µl DNA

Thermocycler:

95°C	5 min	
95°C	30 sec	}
64°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	7 min	

x 39

Erwartetes PCR-Produkt: 137 bp

PCR für den Polymorphismus *FNTB* -173 für DNA aus Paraffinschnitten

Ansatz:

15 µl MasterMix
1 µl Primer *FNTB* G Se
1 µl Primer *FNTB* G2 As
13 µl H₂O

+ je 2 µl DNA

Thermocycler:

95°C	5 min	
95°C	30 sec	}
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	

38 x

Erwartetes PCR-Produkt: 136 bp

PCR für den Polymorphismus *FNTB* -179

Ansatz:

15 µl MasterMix
1 µl Primer *FNTB* 3 Se
1 µl Primer *FNTB* G2 As
13 µl H₂O

+ je 2 µl DNA

Thermocycler:

95°C	3 min	
95°C	30 sec	}
63°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	

38 x

Erwartetes PCR-Produkt: 137 bp

2.2.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Nukleinsäuren sind auf Grund ihres Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Im elektrischen Feld wandern sie in Richtung Anode. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Elektrophorese zu Nutze, um DNA-Abschnitte nach ihrer Größe zu trennen oder ihre Größe durch Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe zu bestimmen.

Als Matrix diente bei der hier verwendeten horizontalen Elektrophorese ein Agarose-Gel, welches Poren aufweist, durch die kleine Moleküle im elektrischen Feld schneller wandern als große.

Zur Herstellung eines Gels wurde Agarose in einer bestimmten Konzentration in TBE-Puffer gegeben. Je höher die Konzentration der Agarose im Gel, desto kleiner sind die Poren und desto langsamer wandern die Moleküle. In den durchgeführten Experimenten wurde bis auf Ausnahmen 2,5 %iges Gel verwendet. Durch Aufkochen über mehrere Minuten löste sich die Agarose im Puffer und konnte nach kurzer Abkühlung und Zusatz von SYBRSafe (Invitrogen, verdünnt 1:1000 in Aqua dest.), welches die DNA in ultraviolettem Licht sichtbar macht, in Kammern gegossen werden. Diese wurden mit einem Kamm versehen, um im Gel Taschen für die DNA-Proben zu erzeugen.

Nach Aushärtung des Agarose-Gels konnte dieses in einer mit TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer gelagert werden und die mit einem Probenpuffer versehenen DNA-Proben wurden einzeln in die sich im Gel befindlichen Taschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein geeigneter Längenmarker, welcher DNA-Abschnitte definierter Größe enthielt, in eine der Taschen pipettiert, um die Größe der zu untersuchenden DNA-Stränge bestimmen zu können.

Im elektrischen Feld wurden die Proben bei 180 Volt aufgetrennt, wobei sich die Dauer der Elektrophorese nach der Konzentration des Agarosegels sowie nach der Größe der DNA-Proben und der gewünschten Wanderungsstrecke richtete.

Unter UV-Licht konnte das Ergebnis der Elektrophorese dargestellt und fotografiert werden.

*1x TBE: 10,8 g Tris-HCl, 5,5 g Borsäure, 0,744 g EDTA-Na, ad 1l H₂O bidest.
10x DNA Probenpuffer: 25% (w/v) Ficol, 0,5% (w/v) Orangel*

2.2.4. Extraktion von DNA aus einem Agarosegel

Um die mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennte und identifizierte DNA für weitere Experimente zugänglich zu machen, war es nötig, die DNA aus dem Gel zu extrahieren.

Zunächst wurden die DNA-Banden von Interesse unter UV-Durchleuchtung mit Hilfe eines Skalpell ausgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte anhand des Protokolls „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, 11/2006) unter Nutzung des zugehörigen Kits (Qiagen).

2.2.5. Sequenzierung

Alle Sequenzierungen, wurden durch die Fa. Eurofins Medigenomix GmbH, Martinsried durchgeführt.

Die Sequenzierung folgte der Kettenabbruchmethode (Didesoxymethode) nach Sanger (Sanger F et al., 1977): Ausgehend von einem kurzen Abschnitt bekannter Sequenz (Primer) wird durch das Enzym DNA-Polymerase einer der beiden komplementären zu sequenzierenden DNA-Stränge verlängert. Hierbei kommen als Substrate die vier Desoxynukleotide dATP, dTTP, dGTP und dCTP zum Einsatz. Zusätzlich enthält das Reaktionsgemisch mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Didesoxynukleotide (ddNTPs), welchen die 3'Hydroxygruppe fehlt. Werden diese in den durch die Polymerase synthetisierten DNA-Strang eingebaut, ist eine weitere Verlängerung nicht mehr möglich, da die 3'OH-Gruppe als Verbindung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt.

Werden die nach Ende der Reaktion entstandenen Kettenabbruchprodukte mittels Kapillarelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt, kann durch Detektion der für die vier ddNTPs unterschiedlich farbigen Fluoreszenz-Signale die Sequenz des zu bestimmenden DNA-Stranges abgelesen werden.

2.2.6. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme können bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und diese spezifisch schneiden. Die Enzyme kommen als natürliche Typ-II-Endonukleasen in Bakterien vor und zerstören fremde DNA, um die Zelle vor dem Befall mit Bakteriophagen zu schützen.

In der Molekularbiologie macht man sich die Eigenschaften von Restriktionsenzymen zu Nutze, sowohl um Gene in einen Vektor zu klonieren, als auch um DNA-Abschnitte anhand unterschiedlicher Schnittstellen von einander unterscheiden zu können.

Jedes Restriktionsenzym hat eine bestimmte Erkennungssequenz, die typischerweise 4 – 12 Nukleotide lang ist. Liegt ein SNP genau innerhalb der Erkennungssequenz, kann mit

Hilfe der Restriktion und anschließender Gelelektrophorese auf den Genotyp geschlossen werden.

So konnte für jeden untersuchten Polymorphismus im *FNTB*-Gen ein Restriktionsenzym gefunden werden, das die Genotypen unterscheidbar macht (Abbildung 7).

Je nach Restriktionsenzym unterschieden sich Pufferbedingungen, Temperatur sowie Dauer der Restriktion.

Es wurden jeweils 10 µl DNA eingesetzt und das Reaktionsgemisch wurde mit Aqua dest. auf 30 µl aufgefüllt.

Polymorphismus *FNTB* -609

Es wurde das Enzym *RsaI* gewählt, welches nur das G-Allel des SNPs *FNTB* -609 unter Zugabe von 3 µl Puffer 4 in 3 Stunden bei 37°C vollständig und spezifisch schneidet.

Erkennungssequenz: 5' GTAC 3'.

Erwartete Fragmente nach Genotypen:	Wildtyp GG	101 + 39 bp
	heterozygot GC	140 + 101 + 39 bp
	Mutation CC	140 bp

Polymorphismus *FNTB* -179

Es wurde das Enzym *BsrDI* gewählt, welches nur das T-Allel des Polymorphismus *FNTB* -179 unter Zugabe von 2 µl Puffer 2 sowie 0,3 µl BSA in 16 Stunden bei 65°C vollständig und spezifisch schneidet.

Erkennungssequenz: 5' NNGCAATG 3'. Diese Sequenz kam natürlicherweise nicht in der Promotorregion von *FNTB* vor, konnte jedoch mit einem sogenannten Mismatch-Primer (*FNTB* 3 Se) generiert werden und schloss den Polymorphismus *FNTB* -179 mit ein.

Erwartete Fragmente nach Genotypen:	Wildtyp TT	125 + 22 bp
	heterozygot TA	137 + 125 + 22 bp
	Mutation AA	137 bp

Polymorphismus *FNTB* -173

Es wurde das Enzym *BsII* gewählt, welches nur die Wildtyp-Variante (6G) des SNPs *FNTB* -173 unter Zugabe von 3 µl Puffer 1 oder 3 in 4 Stunden bei 55°C vollständig und spezifisch schneidet.

Erkennungssequenz: 5' CCNNNNNNNGG 3'.

Erwartete Fragmente nach Genotypen:	Wildtyp 6G	111 + 26 bp
	heterozygot 6G/5G	137 + 111 + 26 bp
	Mutation 5G	137 bp

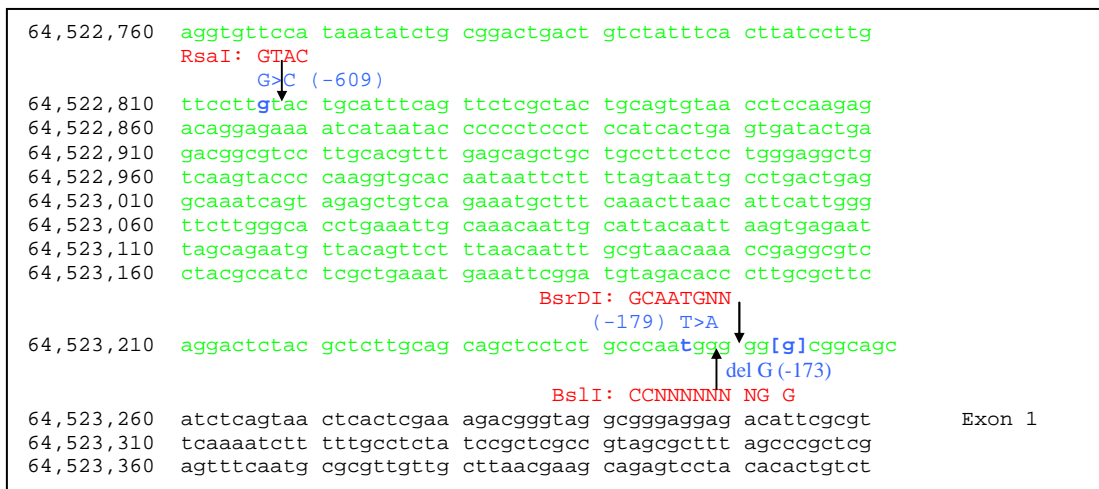


Abbildung 7: Erkennungssequenzen und Schnittstellen der Restriktionsenzyme

2.2.7. Zellkultur

Zellen benötigen zum Wachstum Nährstoffe, Sauerstoff sowie CO₂ und bevorzugen je nach Zelllinie unterschiedliche Bedingungen in Bezug auf Temperatur und pH-Wert. Um ein fortlaufendes Wachstum der Zelllinie zu ermöglichen, mussten die Zellmengen regelmäßig abgeschätzt werden und die Kultur bei Bedarf gesplittet werden. Hierzu wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Durch Zugabe von Trypsin wurden sowohl die Zellverbände als auch die Haftung der Zellen an das Gefäß gelöst. Durch Zugabe von Nährmedium wurde diese Reaktion gestoppt. Bevor die Zellen nun in frischem Nährmedium auf mehrere Gefäße verteilt werden konnten, musste zunächst das restliche Trypsin abzentrifugiert werden, wobei der Überstand verworfen wurde. Die Konzentration der Zellen im Nährmedium konnte mit Hilfe eines Zellzählers ermittelt werden. Die hier verwendeten Zellen wurden ausnahmslos bei 37° C und einer CO₂-Konzentration von 5 % inkubiert.

2.2.8. Zellkernextraktion

Die hier verwendeten Zellkernextrakte standen bereits konserviert bei -80° C zur Verfügung. Darum soll hier nur auf das Prinzip der Gewinnung von Zellkernextrakten

eingegangen werden: Zunächst wurde eine vitale Zelllinie durch Zentrifugation und Waschen mit PBS von Nährmedium gereinigt. Mit Hilfe von Lysis-Puffer und IGEPAL konnte die Zellmembran aufgelöst und durch Zentrifugation die Zytoplasmafraktion von der Zellkernfraktion getrennt werden. Durch Zusatz von Extraktionspuffer wurde die Kernmembran lysiert und nach erneuter Zentrifugation standen die Zellkernextrakte im Überstand zur Verfügung, welche bis zur Verwendung bei -80° C gelagert wurden.

2.2.9. Electrophoretic mobility shift assay

Der Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) dient dazu, Interaktionen zwischen DNA und Proteinen zu detektieren. Er beruht auf dem Prinzip, dass DNA-Protein-Komplexe im elektrischen Feld langsamer durch ein Agarosegel wandern als ungebundene DNA. Diese Unterschiede können nach Elektrophorese mit Hilfe von radioaktiven oder fluoreszierenden Markern dargestellt werden (Hellman LM und Fried MG, 2007).

Es wurden synthetisch hergestellte Primer (MWG Biotechs AG) als DNA eingesetzt, die die verschiedenen Allele der Polymorphismen *FNTB* -173 sowie *FNTB* -609 enthielten.

Primer zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion (EMSA)

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'-Richtung	Länge (-mer)
FNTB EMSA GG Se	ATC CTT GTT CCT TGT ACT GCA TTT CAG	27
FNTB EMSA GG As	CTG AAA TGC AGT ACA AGG AAC AAG GAT	27
FNTB EMSA CC Se	ATC CTT GTT CCT TCT ACT GCA TTT CAG	27
FNTB EMSA CC As	CTG AAA TGC AGT AGA AGG AAC AAG GAT	27
FNTB EMSA 5G Se	TCC TCT GCC CAA TGG GGG CGG CAG CAT CTC A	31
FNTB EMSA 5G As	TGA GAT GCT GCC GCC CCC ATT GGG CAG AGG A	31
FNTB EMSA 6G Se	TCC TCT GCC CAA TGG GGG GCG GCA GCA TCT CA	32
FNTB EMSA 6G As	TGA GAT GCT GCC GCC CCC CAT TGG GCA GAG GA	32

Als Proteinquelle kamen Zellkernextrakte unterschiedlicher Zelllinien zum Einsatz, die bestimmte Transkriptionsfaktoren enthielten, deren Bindungsverhalten zur DNA untersucht werden sollte.

Zunächst wurden die Primer auf eine Konzentration von 20pmol/µl eingestellt und durch das Enzym terminale Transferase mit Nukleotiden, welche mit Digoxigenin gekoppelt waren (DIG-ddUTP, Roche Applied Science), markiert (Rosemeyer V et al., 1995). Dieser „Labeling“ genannte Schritt ist wichtig für die spätere Chemilumineszenz-Reaktion und lief wie folgt ab: 10 µl des Sense- und Antisense-Primers wurden zusammen bei 95° C inkubiert, um alle unspezifischen Bindungen zu lösen. Nach Abkühlung wurde der Ansatz

auf 3,85 pmol/µl in TEN-Puffer (AppliChem) verdünnt – dies entsprach einer Menge von 100 ng Oligonukleotid in 1 µl. Auf Eis wurden zu jeweils 1 µl der verdünnten Primer-Lösung 9 µl H₂O, 4 µl Labeling Puffer, 4 µl CoCl₂, 1 µl DIG-ddUTP sowie 1 µl terminale Transferase, welche die DIG-ddUTPs mit dem 3'-Ende der Oligonukleotide verband, zugegeben. Nach 15minütiger Inkubation bei 37° C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,2 M) auf Eis gestoppt und die gelabelten Primer mit 3 µl H₂O auf 25 µl Lösung aufgefüllt. Die verwendeten Reagenzien stammten aus dem DIG-Oligonucleotide 3'End Labeling Kit der Firma Roche Applied Science.

Die Effizienz der DNA-Markierung wurde durch einen sogenannten Dot Blot bestimmt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der gelabelten Produkte mit TEN-Puffer erzeugt und jeweils 1 µl der verdünnten Proben auf eine Nylon-Membran getropft. Die Stärke der Chemilumineszenz (Beschreibung der Methode siehe unten) wurde mit einer Positivkontrolle bekannter Konzentration verglichen.

Für den eigentlichen EMSA musste zunächst ein nichtdenaturierendes Polyacrylamid-Gel hergestellt werden, durch das die Proben vertikal laufen sollten. Hierfür wurden ein Verschlussgel am Boden sowie ein Laufgel benötigt.

<i>Verschlussgel:</i>		<i>Laufgel (6 %):</i>	
<i>Resolving Puffer</i>	3 ml	<i>TBE 10x Puffer</i>	2 ml
<i>29:1 Acrylamide/Bisacrylamide (40 % w/v)</i>	3 ml	<i>29:1 Acrylamide/Bisacrylamide (40 % w/v)</i>	2,9 ml
<i>10 % APS</i>	30 µl	<i>40 % Acrylamide (w/v)</i>	3,1 ml
<i>Temed</i>	30 µl	<i>80 % Glycerol</i>	1,25 ml
		<i>Aqua dest.</i>	0,43 ml
		<i>Temed</i>	0,02 ml
		<i>10 % APS</i>	0,3 ml

Die Gele wurden zwischen senkrecht stehende gesäuberte Glasplatten gefüllt und am oberen Rand mit blasenfrei eingesetzten Kämmen versehen. Über Nacht polymerisierten die Gele bei 4° C.

Die gelabelten Proben wurden nach einem bestimmten Schema zusammen mit den Zellkernextrakten auf Eis gemischt. Als Kontrollen fungierten zum einen Gemische ohne Zellkernextrakte, zum anderen Gemische, welche ungelabelte Oligonukleotide im Überschuss enthielten, die sogenannte Kompetition. In Vorversuchen hatte sich herausgestellt, dass bei 25-fachem Überschuss eine optimale Kompetition auftritt.

Die so hergestellten Lösungen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich Komplexe aus Oligonukleotid und Protein bilden konnten. Anschließend wurde zu jeder Probe 5 µl Loading Buffer (mit Bromphenol-Blau) gegeben.

Nach einem probenfreien Vorlauf mit 0,5 M TBE-Puffer bei 200 V für 10 Minuten wurde das Gel mit den Proben beladen und so lange einer Spannung von 350 V ausgesetzt, bis die

Bromphenolblau-Bande drei Viertel des Gels durchlaufen hatte. Hierbei wurde durch ein Wasser-Kühlsystem sichergestellt, dass die Temperatur in der Elektrophoresekammer 30° C nicht überschritt.

Um die während der Elektrophorese entstandenen Banden sichtbar zu machen, wurde zunächst ein Blot durchgeführt, mit welchem die DNA-Banden aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen wurden. Hierfür wurde das Gel zunächst in 0,5 M TBE-Puffer abgeschwemmt und zwischen Schwämmen und Whatman Filtern auf der Nylon-Membran blasenfrei aufgefangen. Dieses Paket wurde abermals senkrecht in eine Elektrophoresekammer gesetzt. Durch Anlegen einer Stromstärke von 0,4 Ampere über 30 Minuten wanderte die DNA ihrer negativen Ladung folgend in Richtung der Nylon-Membran. Die Fixierung erfolgte im UV-Stratalinker (1200 mJ 40 sec) mit Zusatz von 2x SSC (Roche Applied Science).

Die Membran wurde nun getrocknet und konnte entweder bei 4° C gelagert werden oder es erfolgte direkt die Darstellung der Banden mittels Chemilumineszenz. Dies wurde mit Hilfe der Antikörper-Methode durchgeführt (Höltke HJ und Kessler C, 1990): Zunächst wurde die Nylon-Membran für 5 Minuten in Waschpuffer geschüttelt, bevor für 30 Minuten eine Blocking-Lösung aufgebracht wurde, welche eine unspezifische Bindung der im nächsten Schritt zugegebenen Antikörper an die Membran verhinderte. Die Antikörper-Lösung konnte ebenfalls für 30 Minuten einwirken, so dass die Antikörper an das Digoxigenin binden konnten. Nach zwei 15 minütigen Waschschritten wurde die Membran für 5 Minuten in Detection Puffer geschüttelt. 1 ml der CSPD-working-solution (Dot blot: 100µl), welche an die Antikörper binden konnte und im Folgenden die Lumineszenzreaktion auslöste, wurde auf die Membran pipettiert und selbige möglichst ohne Luftblasen zwischen zwei klaren Folien gelagert. Nach 5 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur wurde die überschüssige Lösung zwischen den zwei Folien entfernt und die Folien wurden möglichst luftdicht mit Klebeband verschlossen. Es erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei 37° C, bevor der Blot in der Dunkelkammer auf einen Film aufgelegt wurde. Die Entwicklung erfolgte nach 3 sowie 16 Stunden (Dot blot: 5 Minuten).

Maleic acid Puffer: 100 ml 1M Maleic acid, 150 ml 1M NaCl, 750 ml Aqua dest; pH 7,5 mit NaOH, Autoklaviert bei 121° C für 20 Minuten

Waschpuffer: 500 ml Maleic acid Puffer, 1,5 ml Tween 20

Blocking-Lösung: 10g Stocklösung (Roche Applied Science) in 100 ml Maleic acid Puffer

Antikörper-Lösung: Anti-Digoxigenin-AP (Roche Applied Science) 1:10000 verdünnt in Blocking-Lösung

Detection Puffer: 50 ml 1M Tris HCL (pH 9,5), 50 ml 1M NaCl, 400 ml Aqua dest.

CSPD-working-solution: Stocklösung (Roche Applied Science) 1:100 verdünnt in Detection Puffer

2.2.10. Klonierung

Klonierung bezeichnet die Integration eines DNA-Abschnittes in einen Vektor, der anschließend zur Vermehrung in eine Wirtszelle transformiert wird.

Als Ausgangssubstanz dienten PCR-Produkte aus der Slowdown-PCR mit den Primern FNTB Pr1-0 Se und FNTB Pr1-0 As, welche bereits zur Untersuchung des gesamten Promotors eingesetzt worden waren. Nach Sequenzierung der PCR-Produkte wurden vier Proben ausgewählt, welche die unterschiedlichen Haplotypen der SNPs *FNTB* -609 und *FNTB* -173 enthielten.

A-Tailing

Die in der PCR eingesetzte Taq-Polymerase synthetisierte sogenannte „blunt end“ PCR-Produkte, bei denen beide DNA-Stränge gleich lang sind. Zur Klonierung war jedoch ein „sticky end“ mit einem Poly-Adenosin-Schwanz nötig. Dieses wurde mit Hilfe des pGEM-T Easy Kit (Promega) nach dem Protokoll „Cloning Blunt-End *Pfu* DNA Polymerase-Generated PCR Fragments into pGEM-T Vector Systems“ (Promega, 1993) erreicht.

Ligation

Die T4-DNA-Ligase integrierte das DNA-Fragment nach erfolgreichem A-Tailing in den pGEM-T Easy Vektor. Hierzu war eine Inkubation bei 4 °C über Nacht nötig. Ansatz und Versuchsbedingungen entsprachen der Beschreibung im pGEM-T Easy Kit (Promega, 1993)

Transformation

Bei der Transformation wurde die Plasmid-DNA in eine Wirtszelle überführt. Hierfür diente das Bakterium *Escherichia coli* (Bakterienstamm DH5 α). 1 μ l des Ligationsmix wurde mit 20 μ l der Bakterien im Medium für 30 Minuten auf Eis inkubiert, um die Anheftung des Plasmids an die Außenhülle des Bakteriums zu ermöglichen. Die Aufnahme der DNA in die Zelle geschah durch einen Hitzeschock von 40 sec bei 42 °C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden jeweils 80 μ l SOC-Medium (Invitrogen) zu den Zellen gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden jeweils 50 μ l dieses Ansatzes gleichmäßig auf einer Nährplatte zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Ampicillin- und blau/weiß-Selektionierung

Der Vektor pGEM-T Easy besitzt eine natürliche Ampicillin-Resistenz, welche DH5 α -Zellen nicht aufweisen. Somit überlebten auf den mit Ampicillin beimpften Nährplatten nur solche Zellen, in welche der Vektor erfolgreich transformiert wurde.

Um sichtbar zu machen, welche Zellen im Vektor außerdem das ligierte PCR-Produkt enthielten, diente die blau/weiß-Selektionierung: Die Multiple Cloning Site des Vektors liegt innerhalb des β -Galactosidase-Gens, welches bei erfolgreicher Aufnahme eines DNA-Fragments seine Aktivität verliert. Hierdurch konnte der Nährplatte zugegebenes X-Gal nicht mehr verstoffwechselt werden, so dass diese Bakterienkolonien weiß erschienen. Im Gegensatz hierzu erschienen Kolonien mit leerem Plasmid und somit funktionstüchtigem β -Galactosidase-Gen blau.

Die weißen Klone wurden gepickt, in jeweils 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Präparation von Plasmid-DNA

Je nach gewünschter Menge des Endproduktes kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz: Zur Analyse der Klonierung diente eine sogenannte Miniprep, zur Gewinnung von DNA für weitere Versuche eine sogenannte Maxiprep. Hierfür wurden die entsprechenden Kits von Qiagen inklusive Protokoll (QIAprep Miniprep bzw. Maxiprep) eingesetzt.

2.2.11. Reporter Assay

Reporter Assays dienen dazu, die regulatorischen Elemente eines Gens zu identifizieren und zu analysieren. Hierbei wird die regulatorische Region des zu untersuchenden Gens mit einem Reportergen in einem Vektor gekoppelt und in eine geeignete Zelllinie transformiert. Je nach eingesetztem Reportergen kann dann anhand von translatierter mRNA, transkribiertem Protein oder katalytischer Aktivität des Reporterenzym auf die Aktivität der regulatorischen Region des untersuchten Gens geschlossen werden.

In den durchgeführten Versuchen wurde die Aktivität der Promotorregion im Gen *FNTB* untersucht. Hierfür wurden die Sequenzen zunächst aus dem Vektor pGEM-T Easy in den Vektor pSEAP umklontiert. Dieser kodiert für das Enzym „sekretorische alkalische Phosphatase“, welches proportional zur Menge der gebildeten RNA in das Kulturmedium sezerniert wird und somit als Reporter genutzt werden kann. Die durch eine Maxiprep

gewonnene Plasmid-DNA wurde immer auf eine Konzentration von genau 1µg/µl eingestellt.

Transfektion

HEK293-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Sowohl die Plasmid-DNA (4 µl) als auch Lipofektamin (10 µl), welches zu einer effizienten Aufnahme der DNA in die Zielzelle führt, wurden zunächst im Nährmedium DMEM verdünnt (ad 250 µl) und dann zusammengeführt. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Wells der 6-Loch-Platte mit diesem Gemisch beimpft und bei 37° C und 5% CO₂ bebrütet.

6 und 24 Stunden nach erfolgreicher Transfektion wurden Proben zur Analyse entnommen und der durch Zentrifugation gewonnene zellfreie Überstand wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Chemilumineszenz

Die Bestimmung der transskribierten Enzymmenge wurde mit Hilfe des Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Detection Kit (Clontech) durchgeführt und die Lumineszenz in einem Luminometer gemessen. Hierbei wurde exakt nach Protokoll (Clontech, 5/2005) vorgegangen.

2.2.12. Gewinnung von cDNA

Komplementäre DNA (engl. complementary DNA, cDNA) wurde durch eine Reverse-Transkriptase-Reaktion mit Hilfe von RNA oder mRNA als Vorlage gewonnen. In dem synthetisierten cDNA-Strang befinden sich nur die kodierenden Bereiche eines Gens.

Die Isolation von RNA erfolgte je nach Ursprung der Zellen nach unterschiedlichen Protokollen: Für die RNA-Gewinnung aus Vollblut von gesunden Probanden kam das QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen) zum Einsatz, und es wurde exakt nach dem Protokoll „QIAamp RNA Mini Protocoll für Isolation of Total Cellular RNA from Whole Human Blood“ (Qiagen, 01/1999) vorgegangen. RNA aus Nierenzellkarzinom-Gewebe wurde anhand des Protokolls „Purification of Total RNA from Animal Tissues“ (Qiagen, 04/2006) mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert.

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte durch die SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) nach beiliegendem Protokoll (Invitrogen, 2003)

2.2.13. Realtime PCR

Die Realtime PCR ist eine Methode zur quantitativen Erfassung der Gen-Expression. Während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion werden die Konzentrationen eines bestimmten DNA- oder RNA-Abschnittes bestimmt. Dies geschieht durch die Messung von fluoreszierenden Signalen, welche je nach angewandeter Methode durch unterschiedliche Farbstoffe oder Sonden erzeugt werden.

Hier wurde die SYBR-Green-Methode angewandt (Arya, M. et al, 2005): Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs ansteigt. Wird das Signal zum Ende der Elongation eines jeden Zyklus gemessen, gibt es Auskunft über die Menge an amplifiziertem PCR-Produkt.

Die PCR sowie die Detektion des Fluoreszenzsignals finden im selben Gerät statt. Hier wurde das Gerät ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) verwendet.

Die Ansätze wurden nach dem Protokoll im „Quantitect SYBR Green PCR Handbook“ (Quiagen, 01/2008) mit den Chemikalien aus gleichnamigem Kit (Quiagen) pipettiert. Untersucht wurde cDNA aus verschiedenen Geweben.

Die Primer FNTB RT 03 Se und As, die zur Untersuchung des Gens *FNTB* verwendet wurden, lagen am Beginn des Exon 1 bzw. Exon 2 wenige Basen aufwärts des ATGs, welches den Startpunkt der Translation bestimmt (Abbildung 8a).

Zur Etablierung der Realtime PCR wurde zunächst eine cDNA-Verdünnungsreihe hergestellt: Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Menge sowie dem Zeitpunkt der Schwellenüberschreitung, bei dem erstmals ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal gemessen wurde (Abbildung 8b).

Um eine Aussage über die relative Menge an amplifiziertem Nukleinsäure-Produkt treffen zu können und somit Ergebnisse verschiedener Messungen miteinander vergleichbar zu machen, wurde die Intensität der Fluoreszenzsignale mit denen eines Housekeeping Gens verrechnet. In diesem Fall handelte es sich um h β -Aktin (Vandesompele, J et. al., 2002). Die relative Expression von *FNTB* im Vergleich zu h β -Aktin wurde errechnet unter Benutzung der Formel: $FNTB/\beta\text{-Aktin}=2^{-[Ct(FNTB)-Ct(\beta\text{-Aktin})]}$. Ct bezeichnet die Anzahl der

Zyklen, nach denen die Fluoreszenz erstmals über die Hintergrundaktivität hinaus steigt und somit den Beginn der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion beschreibt.

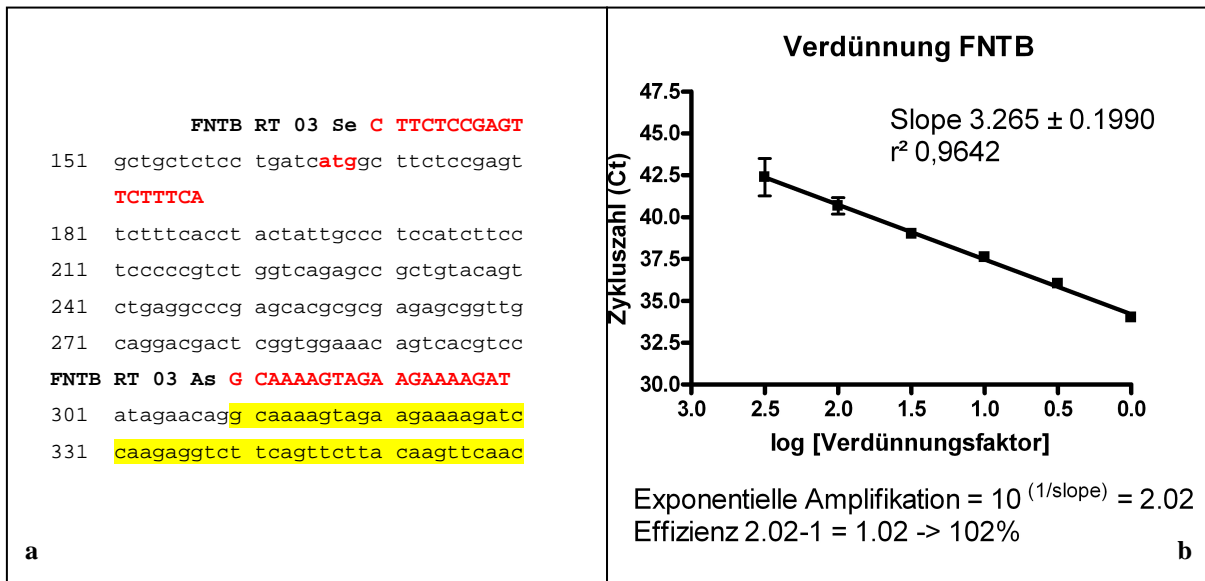


Abbildung 8: a) Lage der RT-PCR-Primer. b) Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Menge (x-Achse) und dem Zeitpunkt der Schwellenüberschreitung (y-Achse).

2.2.14. Statistische Methoden

Analyse der Genotyp- und Allelfrequenz

Das Hardy-Weinberg-Gesetz ist ein Begriff der Populationsgenetik. Es besagt, dass in einer idealen Population das Verhältnis von Homozygoten und Heterozygoten gleich bleibt. Kennzeichen einer idealen Population sind eine sehr große Individuenzahl, Panmixie sowie keine Selektion, Mutationen oder Zu- oder Abwanderungen – also eine Population, in welcher der Genpool konstant bleibt. Diese ideale Population ist in der Realität nicht vorzufinden, jedoch eignet sich das Konstrukt trotzdem zur Anwendung in der Praxis, um von bekannten Genotypfrequenzen auf die entsprechenden Allelfrequenzen zu schließen und umgekehrt.

Hierfür sind im Wesentlichen zwei Formeln nötig: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ und $p + q = 1$

Hierbei steht p für die relative Häufigkeit des Auftretens des Allels A und q für die relative Häufigkeit des Auftretens des zu A komplementären Allels a.

p^2 bezeichnet die relative Häufigkeit des Genotyps AA, $2pq$ die des Genotyps Aa und q^2 die des Genotyps aa.

Das frei erhältliche Programm HWE von Jurg Ott (<ftp://linkage.rockefeller.edu/linkutil.zip>) berechnet bei einer vorgegebenen Verteilung der tatsächlichen Genotypen über die Allelfrequenz die erwartete Genotypverteilung. Tatsächliche und erwartete Genotypverteilung werden mittels eines Chi-Quadrat-Tests auf Abweichungen der Verteilung untersucht.

In gesunden Populationen entspricht die Verteilung der Genotypen in etwa dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Das heißt, dass nur bei nicht signifikanten Ergebnissen von einer korrekten Analyse der DNA ausgegangen werden kann. In erkrankten Kollektiven ist durchaus eine Abweichung der Verteilung möglich, allerdings kann dies auch ein Hinweis auf Genotypisierungsfehler sein.

Haplotypenanalyse

Um herauszufinden, ob zwischen der Verteilung der Genotypen der untersuchten Polymorphismen ein Zusammenhang besteht, wurde eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Zunächst wurden mit Hilfe von Kreuztabellen im Datenanalyseprogramm SPSS 17.0 die Variablen „Genotyp“ von jeweils zwei der drei Polymorphismen miteinander verglichen. Durch Vergleich der beobachteten mit den erwarteten Häufigkeiten konnten Kopplungstendenzen erkannt werden.

Zur weiteren Analyse der Haplotypen wurde das Programm HaploView 4.1 (Barrett JC et al., 2005) genutzt. Dieses Programm berechnet ausgehend von den eingegebenen Genotypen unter anderem den Kopplungskoeffizienten D' sowie den Korrelationskoeffizienten r^2 . D' ist ein Maß für das Kopplungsgleichgewicht zweier Allele und kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Bei $D' = 0$ liegt ein komplettes Kopplungsgleichgewicht vor, d.h., die Verteilung der Allele zweier Polymorphismen ist voneinander unabhängig. Bei einem D' von -1 oder +1 liegt ein komplettes Kopplungsungleichgewicht vor, welches die feste Kombination der untersuchten Allele bedeutet. Um die Linearität der Abhängigkeit von gekoppelten Allelen festzustellen, berechnet das Programm r^2 , welches ebenfalls Werte zwischen -1 und +1 annehmen kann. Ein r^2 von -1 oder +1 steht hierbei für eine vollständige lineare Abhängigkeit.

Untersuchung der Patientenkollektive auf genotypabhängige Unterschiede

Die Patientenkollektive wurden auf verschiedene klinische Parameter und deren Abhängigkeit vom Genotyp untersucht. Kategoriale Variablen, beispielsweise das Geschlecht der Patienten oder das Tumorstadium wurden in Abhängigkeit vom Genotyp

der einzelnen Polymorphismen in Kreuztabellen dargestellt. Vorhandene Abhängigkeiten wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests analysiert.

Metrische Variablen, zum Beispiel das Alter der Patienten oder die gewonnenen Daten aus der Realtime-PCR wurden mit Hilfe einer ANOVA-Analyse (Analysis of Variance between Groups) untersucht.

Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4 konnten die Verteilung der Genotypen in erkrankten Kollektiven mit denen von gesunden Blutspendern verglichen werden. Hierzu wurde der Chi-Quadrat-Test genutzt und auf Basis der Kreuztabellen die Odds Ratios berechnet.

Überlebensanalyse

Überlebensanalysen in den verschiedenen Tumorkollektiven wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode im Programm SPSS Version 17 durchgeführt. Getrennt nach Genotypen konnten die Überlebensverläufe auf signifikante Unterschiede getestet werden, wobei der Log-Rang-Test Anwendung fand.

Die grafische Darstellung der Überlebenskurven erfolgte nach Export der Daten mit dem Programm GraphPad Prism 4.

Außerdem wurde mit dem Statistikprogramm SPSS für jedes Kollektiv eine Cox-Regression durchgeführt, um den Einfluss verschiedener klinischer Parameter auf das Überleben zu untersuchen. Hierbei wurde für jede Variable jeweils eine univariate sowie eine multivariate Analyse ausgeführt. Die Ergebnisse wurden als Hazard Ratio (HR) mit 95%-Konfidenzintervall angegeben.

Signifikanzniveau

Unterschiede der erhobenen Daten wurden dann als statistisch signifikant betrachtet, wenn der zugehörige p-Wert $< 0,05$ war.

3. Ergebnisse

3.1. Polymorphismen im *FNTB*-Promotor

In der SNP-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) waren bereits mehrere Polymorphismen im *FNTB*-Promotor registriert, jedoch waren diese bisher nicht unabhängig validiert.

Zur Identifizierung von Polymorphismen wurden 20 DNA-Proben gesunder kaukasischer Probanden sequenziert. Durch Vergleich mit der publizierten Referenzsequenz des *FNTB*-Promotors konnten abweichende Abschnitte identifiziert werden.

Das Vorkommen des bereits in der Datenbank mit der Nummer rs11623866 benannten Polymorphismus an der Position -609 im *FNTB*-Promotor, ausgehend vom Translationsstart, konnte bestätigt werden: In mehreren Proben zeigte sich ein Austausch der Base Guanin zu Gunsten von Cytosin.

Ebenfalls validiert werden konnte das Vorkommen des Polymorphismus rs17554381. Es zeigte sich bei mehreren Proben eine Deletion von einer von sechs aufeinanderfolgenden Guanin-Basen an der Position -173.

Außerdem wurde ein weiterer, bisher unbekannter Polymorphismus gefunden: Nahe der bekannten Deletion *FNTB* -173 fand sich an der Position -179 ein Austausch der Base Thymin zu Gunsten von Adenin. Dieser Austausch konnte in einer von 20 sequenzierten Proben heterozygot nachgewiesen werden.

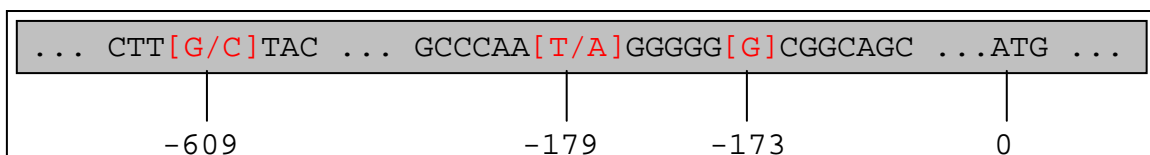


Abbildung 9: Lage und Bezeichnung der Polymorphismen im *FNTB*-Gen (vgl. auch Abbildung 5)

3.1.1. Verteilung der Polymorphismen bei gesunden Kaukasiern

Die Verteilung der Genotypen sowie die Allelfrequenzen der Polymorphismen *FNTB* -609, *FNTB* -179 und *FNTB* -173 wurde bei 171 gesunden Kaukasiern untersucht. Die Ergebnisse der Genotypisierungen für die SNPs *FNTB* -609 und *FNTB* -173 sind in den

Tabellen 3 und 4 dargestellt. Die Verteilung der Genotypen befand sich jeweils im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Der Polymorphismus *FNTB* -179 war mit einer Allelfrequenz für das A-Allel von 0,061 relativ selten.

Tabelle 3: Genotypen und Allelfrequenz des SNPs -609 bei gesunden Kaukasiern

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
GG	70	40,9 %
GC	73	42,7 %
CC	28	16,4 %
Allelfrequenz G = 0,62 Allelfrequenz C = 0,38		

Tabelle 4: Genotypen und Allelfrequenz des SNPs -173 bei gesunden Kaukasiern

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
6G	101	59,1 %
6G/5G	62	36,2 %
5G	8	4,7 %
Allelfrequenz 6G = 0,72 Allelfrequenz 5G = 0,28		

3.1.2. Verteilung der Polymorphismen bei verschiedenen Ethnien

Die Verteilung der Genotypen sowie die Allelfrequenzen der Polymorphismen *FNTB* -609 und *FNTB* -173 wurden in Kollektiven von gesunden Schwarzafrikanern und Chinesen untersucht. Die Verteilung der Genotypen befand sich bis auf eine Ausnahme (*FNTB* -609 bei Chinesen) im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Ergebnisse sind den Tabellen 5 bis 8 zu entnehmen.

Für beide Polymorphismen zeigten sich signifikante Unterschiede der Genotypverteilung zwischen den Ethnien: Das C-Allel des SNP *FNTB* -609 kam mit einer Allelfrequenz von 0,38 am häufigsten bei Kaukasiern vor. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich auch bei Schwarzafrikanern (C-Allel-Frequenz = 0,30). Die Verteilung des Polymorphismus in Chinesen war jedoch signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$ für Kaukasier vs. Chinesen und Schwarzafrikaner vs. Chinesen). Hier fand sich das C-Allel mit einer Frequenz von nur 0,14 am seltensten.

Die Deletion an der Stelle *FNTB* -173 konnte ebenfalls am häufigsten bei Kaukasiern nachgewiesen werden. Die 5G-Allel-Frequenz betrug 0,28. Schwarzafrikaner und Chinesen unterschieden sich in der Genotypverteilung nur unwesentlich: Die 5G-Allel-

Frequenz betrug 0,07 bzw. 0,08. Mit einem p-Wert < 0,0001 waren diese Verteilungen signifikant unterschiedlich zu der Verteilung bei Kaukasiern.

Tabelle 5: Verteilung des Polymorphismus *FNTB* -609 bei Schwarzafrikanern

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
GG	60	51,7 %
GC	42	36,2 %
CC	14	12,1 %
Allelfrequenz G = 0,70 Allelfrequenz C = 0,30		

Tabelle 6: Verteilung des Polymorphismus *FNTB* -609 bei Chinesen

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
GG	87	79,8 %
GC	14	12,8 %
CC	8	7,3 %
Allelfrequenz G = 0,86 Allelfrequenz C = 0,14		

Tabelle 7: Verteilung des Polymorphismus *FNTB* -173 bei Schwarzafrikanern

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
6G	100	86,2 %
5G/6G	15	12,9 %
5G	1	0,9 %
Allelfrequenz 6G = 0,93 Allelfrequenz 5G = 0,07		

Tabelle 8: Verteilung des Polymorphismus *FNTB* -173 bei Chinesen

Genotyp	absolute Häufigkeit	relative Häufigkeit
6G	99	83,9 %
5G/6G	18	15,3 %
5G	1	0,8 %
Allelfrequenz 6G = 0,92 Allelfrequenz 5G = 0,08		

3.2. Funktionelle Bedeutung der Polymorphismen

3.2.1. Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren

Mit Hilfe des „Electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) können Interaktionen zwischen Proteinen und DNA dargestellt werden. So war es möglich, die putative Bindung

von Transkriptionsfaktoren an Promotorsequenzen des *FNTB*-Gens zu untersuchen und mögliche Unterschiede zwischen den Genotypen der Polymorphismen *FNTB* -609 und *FNTB* -173 sichtbar zu machen.

In einer in-silico Analyse mit dem Programm ConSite (Sandelin A et al., 2004) ergaben sich für beide Polymorphismen mögliche unterschiedliche Bindungen von Transkriptionsfaktoren. Dies war für den Polymorphismus *FNTB* -609 der Transkriptionsfaktor Thing1-E47, der nur an das G-Allel bindet. Für den Polymorphismus *FNTB* -173 ergaben sich 3 möglicherweise unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. Das 5G-Allel zeigte eine Affinität zu dem Transkriptionsfaktor ZBP-89, welche das 6G-Allel nicht aufwies, welches dafür aber bevorzugt die Transkriptionsfaktoren B-cell-specific activator protein und CPBP band.

Da jedoch in-silico Analysen nur hypothetische Aussagen zulassen, wurden für die weitere Analyse des Bindungsverhaltens von Transkriptionsfaktoren Zelllinien gewählt, deren Zellkernextrakte eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren enthalten.

***FNTB* -609**

Die Versuche zum Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom SNP *FNTB* -609 wurden mit Zellkernextrakten aus HEK293-, KARPAS- und SUDH6-Zelllinien durchgeführt. Bei der Verwendung von 10 µg Zellkernextrakt pro Probe, gelabelten Oligonukleotiden in einer Konzentration von 15,5 fmol/µl und ungelabelten Oligonukleotiden als Konkurrenz in 125-fachem Überschuss zeigten sich für alle drei Zelllinien vergleichbare Bandenmuster, die eine selektive Bindung von Transkriptionsfaktoren an das G-Allel vermuten ließen (Abbildungen 10 bis 12): Bei den Proben mit den Nummern 1 und 2 entstanden unter regelrechten Versuchsbedingungen keine Banden. Hiermit wurden unspezifische Bindungen sowie Verunreinigungen durch Proteine ausgeschlossen, da kein Zellkernextrakt hinzugegeben wurde und somit Banden auch nicht zu erwarten waren. Eine Ausnahme bildet hierbei der EMSA mit Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen (Abbildung 10). Die Bande bei Probe 2 ist am ehesten mit einer Verunreinigung durch Zellkernextrakte aus der benachbarten Geltasche zu erklären.

Jeweils bei Probe 3 zeigte sich eine zusätzliche Bande, welche sich bei Probe 6 nicht darstellte. Dies weist auf eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an das G-Allel des Polymorphismus *FNTB* -609 hin. Durch die Konkurrenz mit ungelabeltem Oligonukleotid GG ließ sich diese Bindung unterdrücken, so dass bei Probe 4 keine Bande sichtbar wurde.

Allerdings ließ sich die Bindung zwischen Transkriptionsfaktor und G-Allel auch durch eine Konkurrenz mit ungelabeltem CC-Oligonukleotid unterdrücken (Probe 5), was auf die Bildung einer unspezifischen Bindung auf Grund der hohen Konzentration an ungelabeltem CC-Oligonukleotid hinweist.

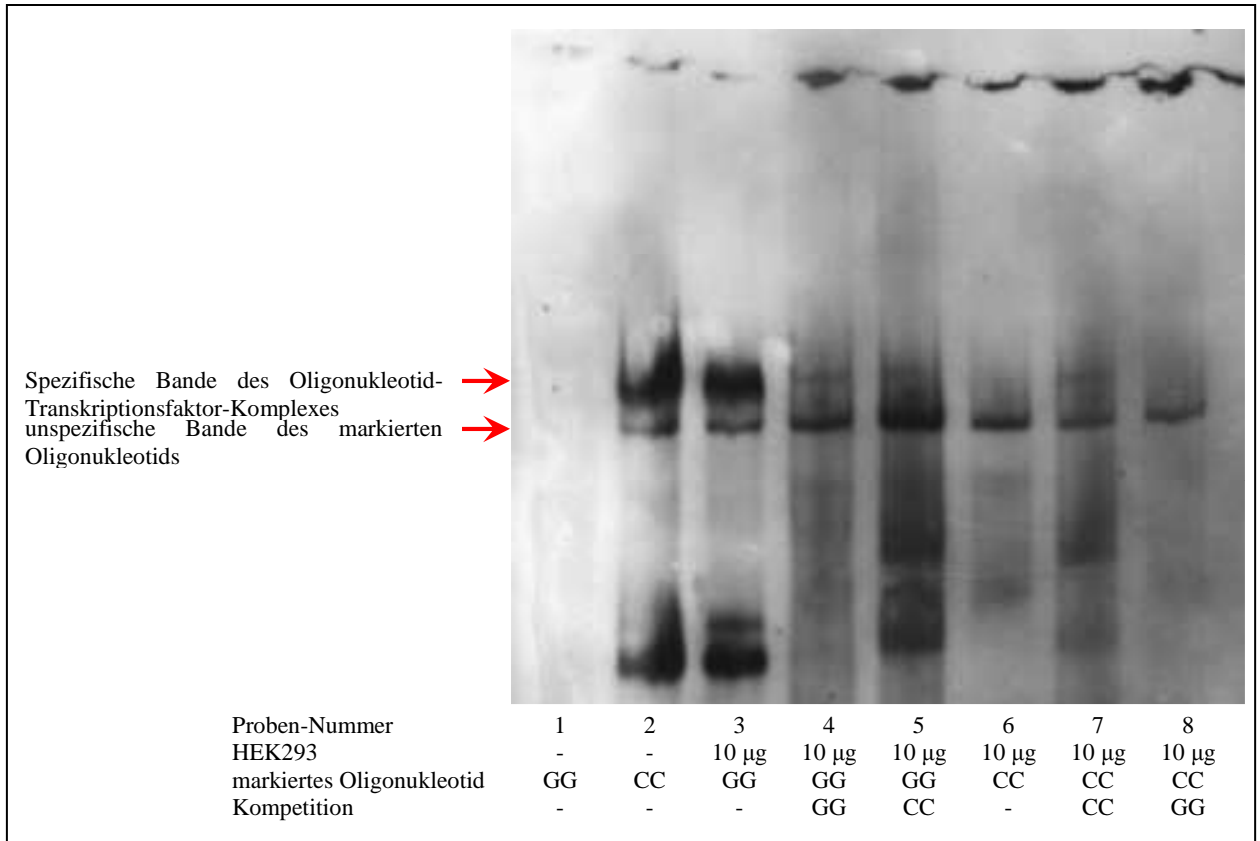


Abbildung 10: EMSA des SNP *FNTB* -609 mit Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen. Bei Probe 3 zeigt sich eine zusätzliche Bande, welche bei Probe 6 nicht zu sehen ist. Diese ist auf die spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an das Oligonukleotid GG zu erklären. Der Komplex aus Oligonukleotid und Transkriptionsfaktor wandert langsamer durch das Gel als ungebundenes Oligonukleotid, deshalb stellt sich diese Bande oberhalb der unspezifischen Banden dar. Die zusätzliche Bande bei Probe 2 ist am ehesten mit einer Verunreinigung durch Zellkernextrakte aus der benachbarten Geltasche (Probe 3) zu erklären.

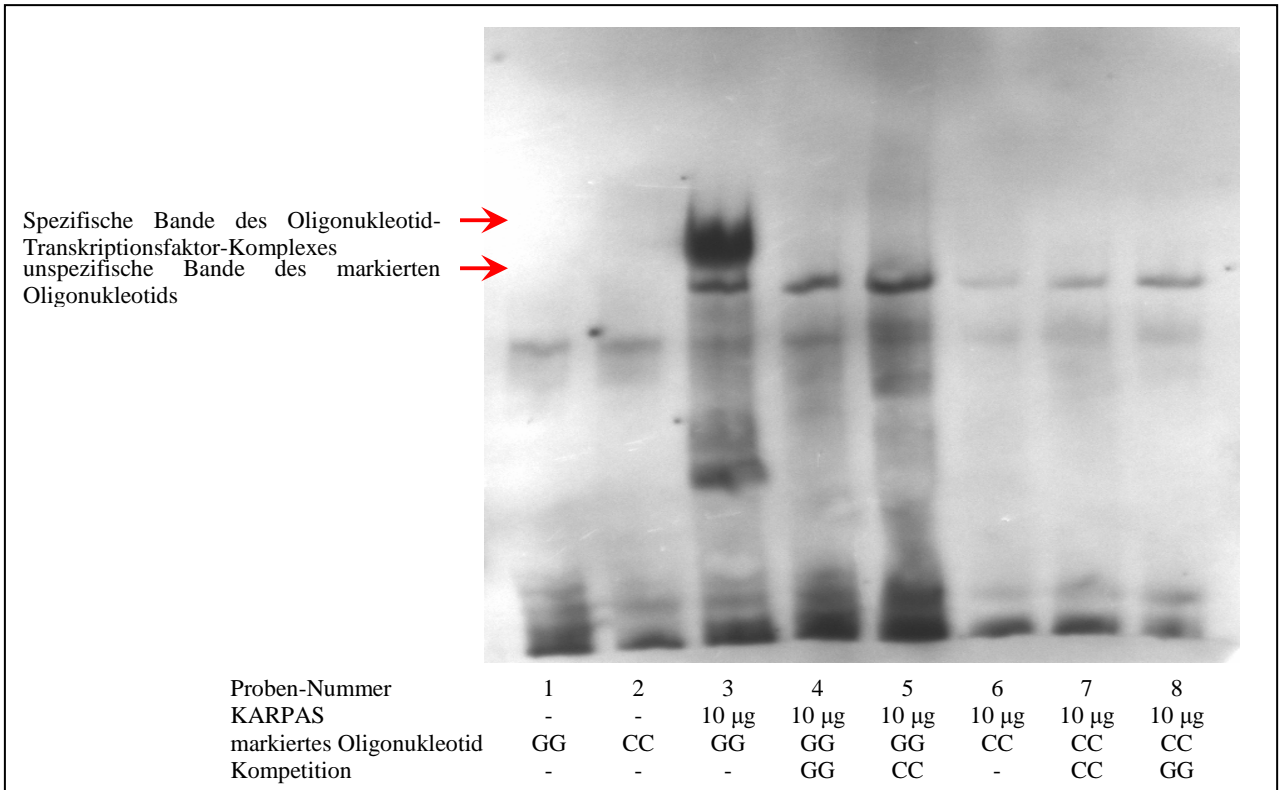


Abbildung 11: EMSA des SNP *FNTB* -609 mit Zellkernextrakten aus KARPAS-Zellen. Wie im EMSA mit Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen zeigt sich bei Probe 3 eine zusätzliche Bande, welche bei Probe 6 nicht zu sehen ist. Dies spricht für eine spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren an das G-Allel.

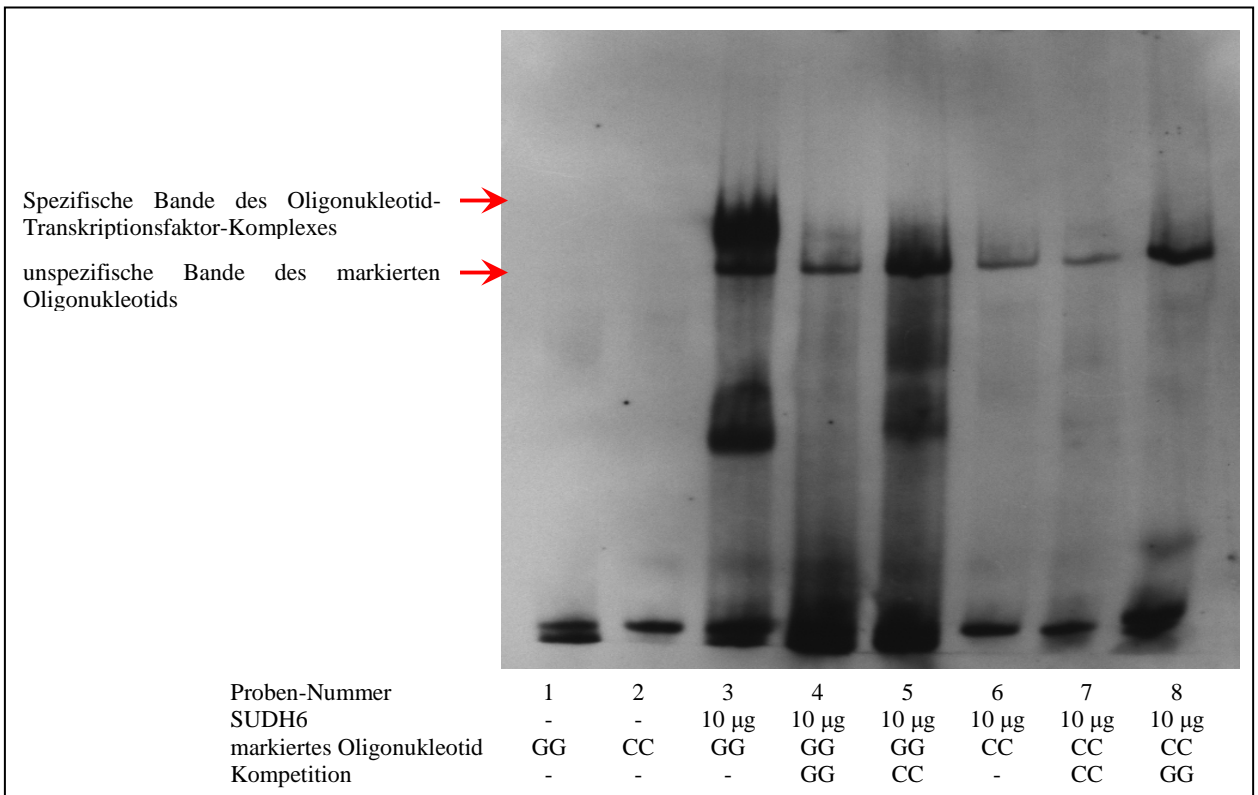


Abbildung 12: EMSA des SNP *FNTB* -609 mit Zellkernextrakten aus SUDH6-Zellen. Auch mit Zellkernextrakten aus SUDH6-Zellen zeigt sich eine spezifische Bande bei Probe 3, welche sich bei Probe 6 nicht darstellt.

Um diese unspezifische Bindung zu vermeiden, wurde ein Dosis-Wirkungs-Experiment durchgeführt, mit dem die optimale Konzentration an ungelabeltem Oligonukleotid bestimmt werden sollte (Abbildung 13).

Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die in insgesamt 9 Proben die ungelabelten CC-Oligonukleotide in einem bis zu 125-fachen Überschuss im Vergleich zu den gelabelten Oligonukleotiden enthielt. Als gelabelte Oligonukleotide wurden die gelabelten Primer FNTB EMSA GG Se und FNTB EMSA GG As bei einer konstanten Konzentration von 15,5 fmol/μl verwendet. Außerdem kamen Zellkernextrakte aus HEK293 Zellen in einer Menge von jeweils 10 μg zum Einsatz.

Bei Überschüssen zwischen dem 125- und 50-fachen (Proben 2 – 5) wurde die Bande des G-Allels unterdrückt, was für eine unspezifische Bindung der ungelabelten Oligonukleotide an die gelabelten Primer spricht. Ab einem Überschuss von 25 oder weniger (Proben 6 – 10) jedoch trat eine spezifische Bande am oberen Rand des Laufgels auf, und diese wurde mit abnehmender Konzentration der Gegenkompetition stärker.

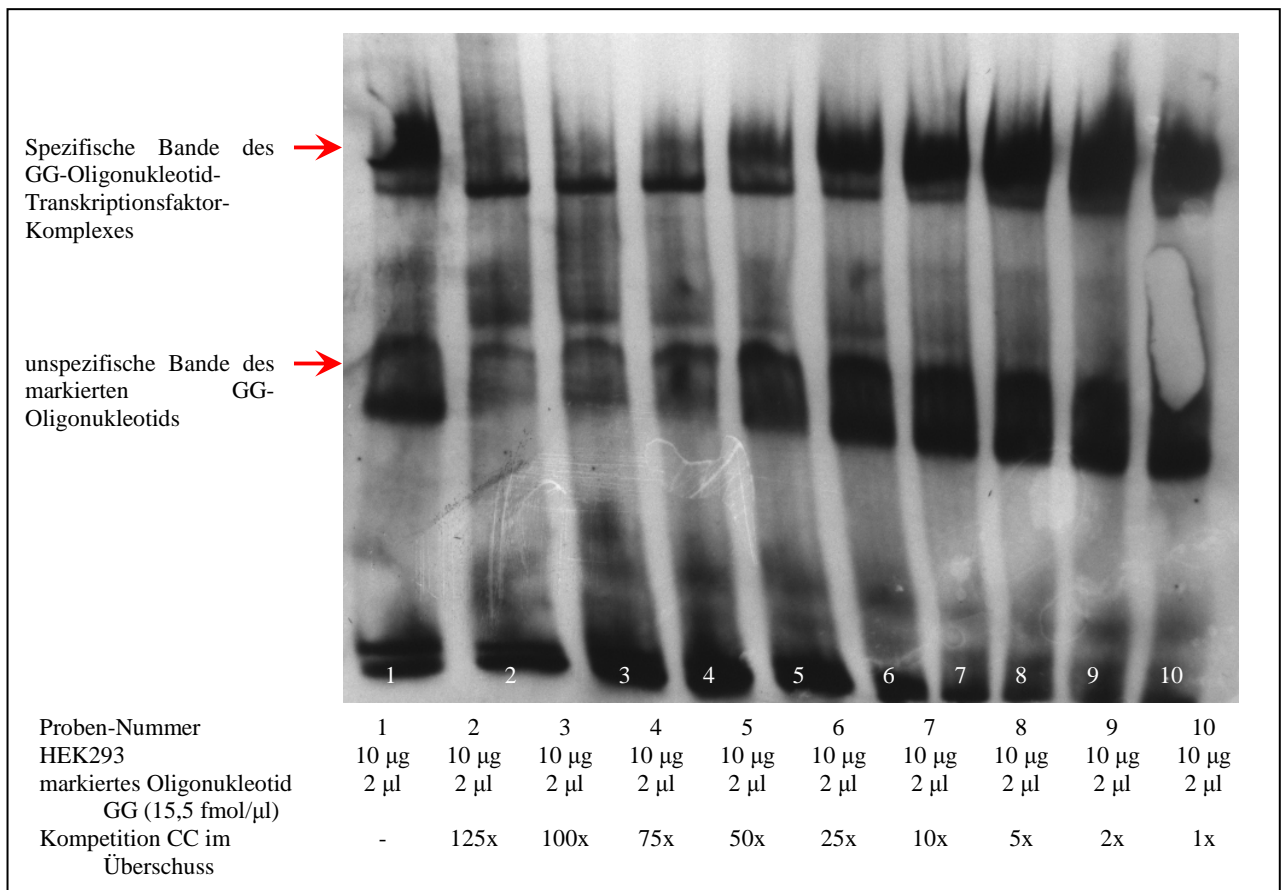


Abbildung 13: Verdünnungsreihe FNTB -609 HEK293. Zu erkennen ist eine spezifische Bande am Oberrand des Laufgels, welche bei hoher Konzentration an ungelabeltem CC-Oligonukleotid zunächst unterdrückt wird (Proben 2 – 5), bei abnehmenden Konzentrationen (Proben 6 – 10) jedoch zunehmend stärker in Erscheinung tritt.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde der EMSA mit Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen erneut durchgeführt, diesmal jedoch mit einem nur 25-fachen Überschuss der Konkurrenz im Vergleich zu den gelabelten Primern (Abbildung 14).

Wiederum ließ sich die selektive Bindung des G-Allels an Transkriptionsfaktoren nachweisen, welche sich bei Probe 3, und nun auch bei Probe 5 als zusätzliche Bande darstellte und bei den Proben 6 und 8 nicht auftrat. Auch bei der geringeren Konzentration an kompetitivem ungelabeltem Oligonukleotid ließ sich die Bildung von Banden bei Probe 4 unterdrücken. Dies bestätigt die selektive Bindung von Transkriptionsfaktoren an das G-Allel des Polymorphismus *FNTB* -609.

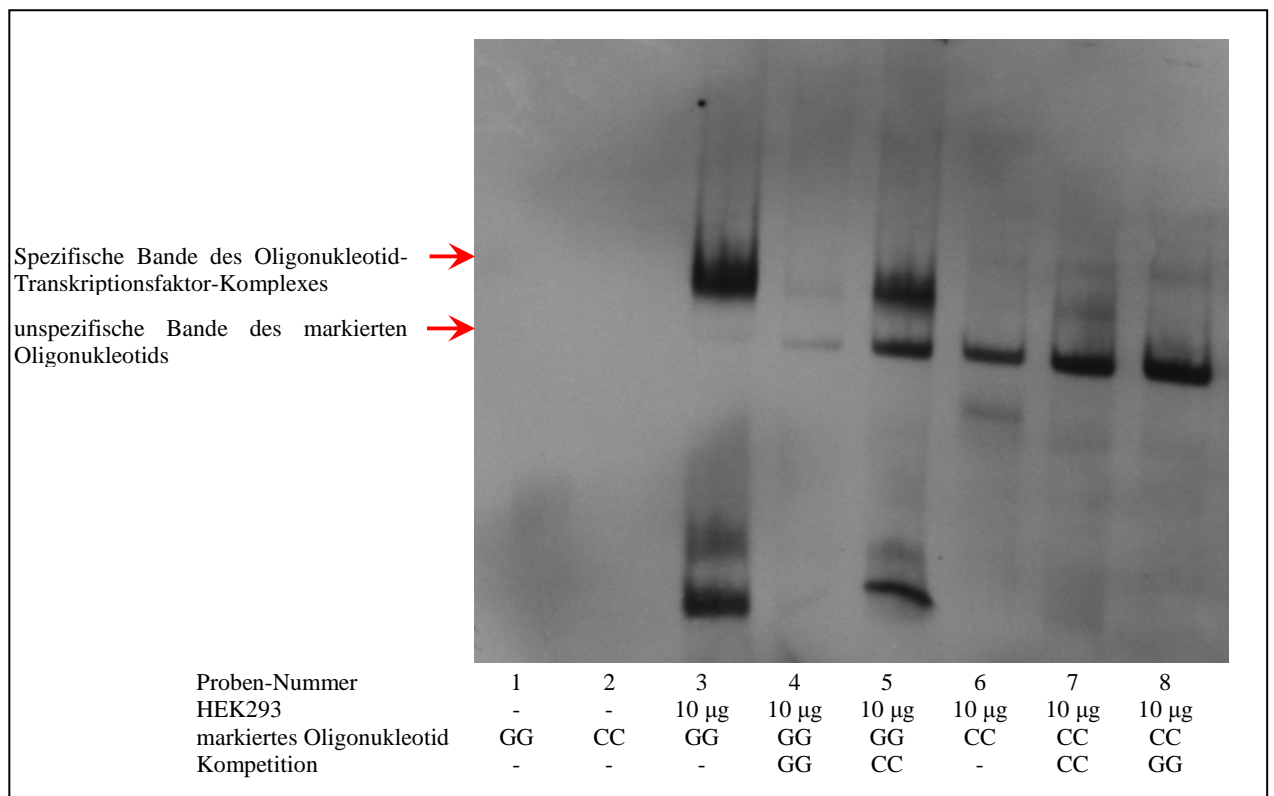


Abbildung 14: EMSA des SNP *FNTB* -609 mit Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen. Die zusätzlichen Banden bei Probe 3 und 5 sind durch eine Bindung des GG-Allels an Transkriptionsfaktoren bedingt. Unspezifische Bindungen treten hier nun bei geringerer Konzentration der Konkurrenz nicht mehr auf.

***FNTB* -173**

Für den Polymorphismus *FNTB* -173 wurden die gleichen Versuche durchgeführt. Während sich beim Einsatz von Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen keine Unterschiede in der Bindung zwischen den Genotypen zeigten (Abbildung 15), wurde bei Verwendung von KARPAS-Zellen (Abbildung 16) eine im Vergleich zum 6G-Genotyp (Probe 5) stärkere Bindung des 5G-Genotyps (Probe 3) an Transkriptionsfaktoren festgestellt. Diese wurde durch Konkurrenz mit ungelabeltem Oligonukleotid im Überschuss aufgehoben.

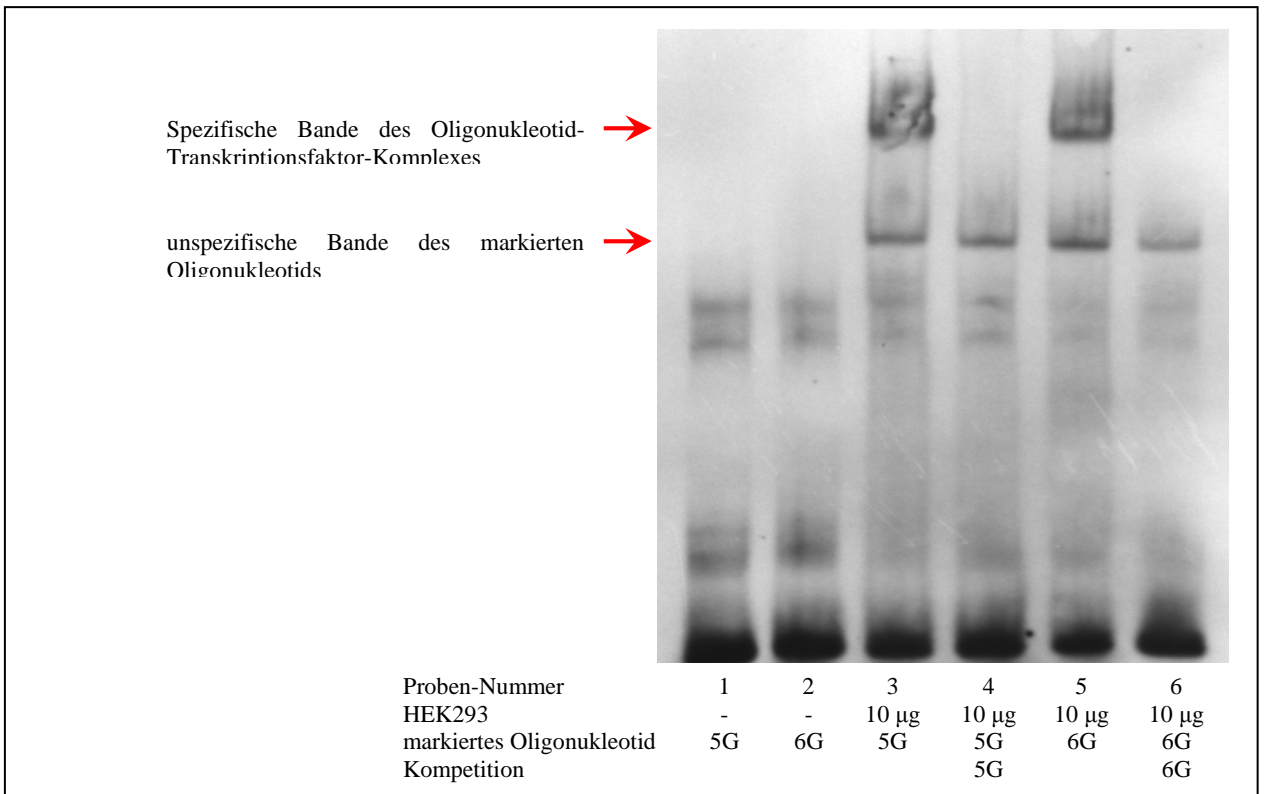


Abbildung 15: EMSA des SNP *FNTB* -173 mit Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen. Die Transkriptionsfaktoren binden sowohl an das 5G- als auch an das 6G-Allel, weshalb eine Oberbande sowohl bei Probe 3 als auch bei Probe 5 auftritt.

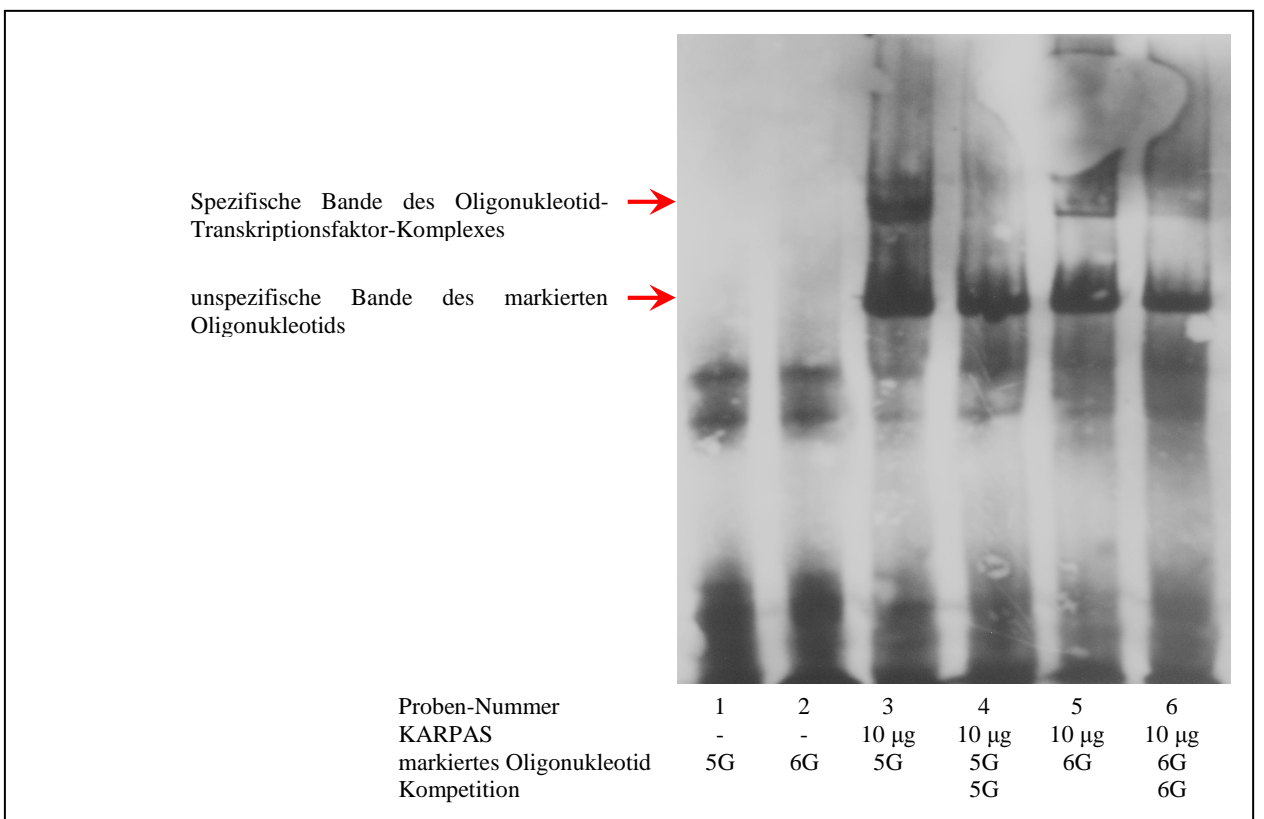


Abbildung 16: EMSA des SNP *FNTB* -173 mit Zellkernextrakten aus KARPAS-Zellen. Auch hier zeigt sich eine Oberbande sowohl bei Probe 3 als auch bei Probe 5; die Bande erscheint bei Probe 3 jedoch deutlich ausgeprägter, was für eine stärkere Bindung von Transkriptionsfaktoren an den 5G-Genotyp spricht.

3.2.2. Einfluss der Genotypen auf die Promotoraktivität

In Reporter Assays wurde die Promotoraktivität des *FNTB*-Gens in Abhängigkeit vom Haplotyp untersucht. Hierbei wurden die Polymorphismen *FNTB* -609 und *FNTB* -173 berücksichtigt, so dass vier verschiedene Allelkombinationen in den Vektor pSEAP kloniert wurden, um anschließend die Menge an transkribierter sekretorischer alkalischer Phosphatase zu messen. Anhand dieser Menge, welche als Vielfaches der Basic-Aktivität des Vektors angegeben wurde, konnte auf die Promotoraktivität geschlossen werden. Es zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der Haplotypen ($p < 0,001$): Am geringsten war die Promotoraktivität für den Haplotyp CC 5G. Die Haplotypen GG 5G und GG 6G nahmen eine intermediäre Stellung ein, während der Haplotyp CC 6G die stärkste Promotoraktivität besaß (Abbildung 17).

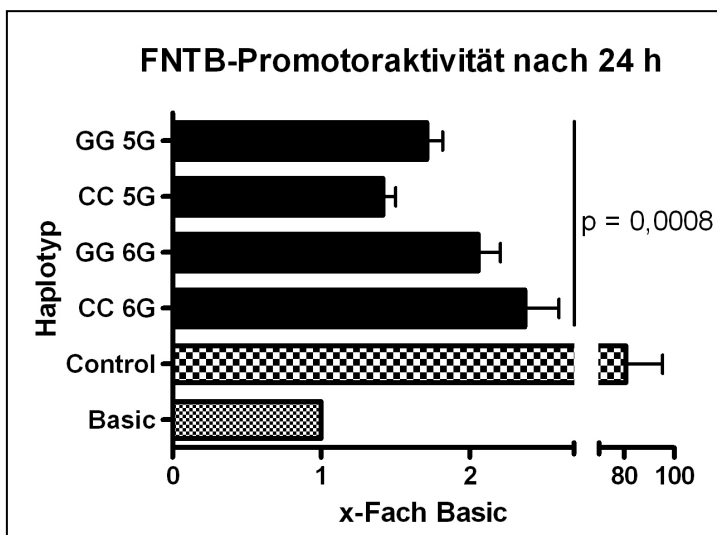


Abbildung 17: Promotoraktivität in Abhängigkeit vom Haplotyp für *FNTB*

3.2.3. Genotyp-abhängige Quantifizierung der mRNA-Expression

Die Quantifizierung der mRNA-Expression in Abhängigkeit von Genotypen des Polymorphismus *FNTB* -609 erfolgte zunächst mit cDNA aus Leukozyten von gesunden Probanden.

Die insgesamt 22 Proben zeigten in 11 Fällen den Genotyp GG, 10 Proben waren heterozygot für den Polymorphismus *FNTB* -609 und eine Probe zeigte den CC-Genotyp. Es zeigte sich ein Genotyp-abhängiger Unterschied: Die Menge der exprimierten mRNA war bei Individuen mit dem GC-Genotyp signifikant kleiner als bei solchen mit dem GG-Genotyp ($p = 0,015$). Homozygote CC-Träger zeigten eine noch geringere mRNA-Menge.

Eine ähnliche Tendenz ergab sich bei der Untersuchung von 23 Gewebeproben von Patienten mit Nierenzell-Karzinom. Hiervon zeigten 9 den Genotyp GG, 6 Proben waren heterozygot und 4 Proben zeigten den Genotyp CC. Auch hier war die Genotyp-abhängige Menge der mRNA-Expression signifikant unterschiedlich ($p = 0,042$, Abbildung 18): Die größte Menge an mRNA exprimierten homozygote GG-Träger, gefolgt von heterozygoten Individuen. Am wenigsten mRNA wurde von homozygoten Trägern des C-Allels exprimiert.

Für den Polymorphismus *FNTB* -173 konnten auf Grund seiner geringen Frequenz keine signifikanten Unterschiede dargestellt werden.

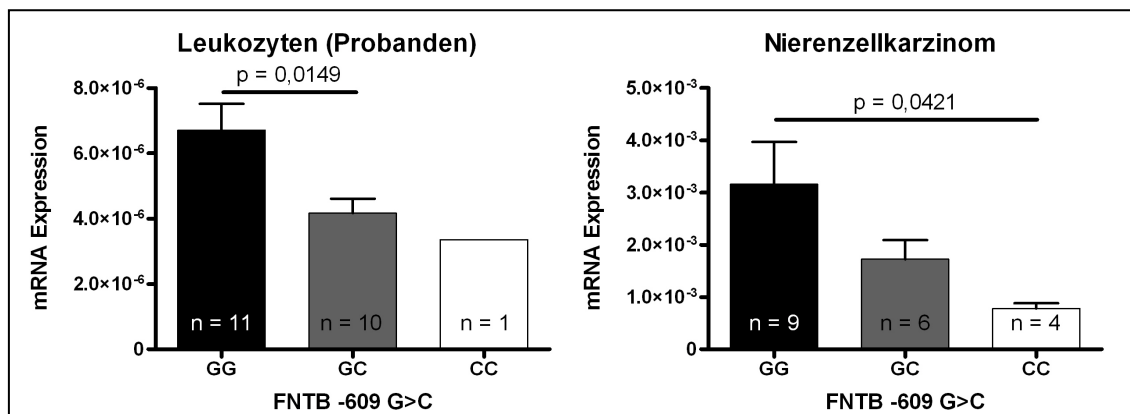


Abbildung 18: mRNA-Expression abhängig vom SNP *FNTB* -609. Die p-Werte wurden mittels t-Test bzw. One-Way ANOVA berechnet. mRNA-Expression dargestellt als Vielfaches der Aktin-Expression (Housekeeping-Gen) mit SEM.

3.3. Bedeutung der Polymorphismen bei Krebserkrankungen

Um festzustellen, ob Genotypen der Polymorphismen *FNTB* -609 und *FNTB* -173 Einfluss auf die Krebsentstehung sowie den Krankheitsverlauf haben, wurden Blut- und Gewebeproben unterschiedlicher Patientenkollektive untersucht. Abhängig vom Genotyp wurden das prozentuale Überleben sowie, je nach Kollektiv, spezielle klinische Parameter ausgewertet.

3.3.1. Auswirkungen des Polymorphismus *FNTB* -609

Es zeigte sich, dass der Polymorphismus *FNTB* -609 Einfluss auf das Überleben bei Multiplem Myelom und Nierenzellkarzinom hat. Hierbei fiel auf, dass das G-Allel bei beiden Krebserkrankungen mit einer besseren Prognose einherging.

Für die Untersuchung von Patienten, die an einem multiplen Myelom erkrankt waren, wurden die Blutproben eines Kollektivs von 114 Patienten genotypisiert. Hierbei zeigten 36 Proben den Genotyp GG, 53 den Genotyp GC und 25 den Genotyp CC (Tabelle 9). Die Allelfrequenzen betragen 0,55 für das G-Allel sowie 0,45 für das C-Allel. Die Verteilung lag im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Tendenziell zeigten sich im erkrankten Kollektiv mehr homozygote CC-Träger sowie weniger homozygote GG-Träger als bei gesunden Kaukasiern. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Keiner der erfassten klinisch-pathologischen Parameter zeigte eine Abhängigkeit bezüglich der Genotypen.

Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch in Bezug auf das Überleben (Abbildung 19). Während das 5-Jahres-Überleben bei Patienten, die den GG- oder GC-Genotyp aufwiesen, bei jeweils knapp 60 % lag (59,1 % sowie 54,3 %), überlebten Patienten mit dem CC-Genotyp signifikant kürzer. Nach 5 Jahren lebten in dieser Gruppe nur noch 32,9 % der Patienten. Die HR für CC vs. GG betrug sowohl in der uni- als auch in der multivariaten Analyse 2,3 (1,1 – 5,0, $p = 0,034$ bzw. 1,0-5,4, $p = 0,045$). Weiterhin zeigte sich, dass eine Hochdosis-Chemotherapie mit einem besseren Outcome assoziiert war. Außerdem ging ein höherer Wert im HCTCI mit einer höheren Sterberate einher (Tabelle 10).

Tabelle 9: klinisch-pathologische Eigenschaften und Genotypverteilung nach FNTB -609 bei Patienten mit multiplem Myelom

	Alle	FNTB -609 Genotyp			p-Wert
		GG	GC	CC	
Gesunde Kontrollen (Blutspender) n (%)	171 (100)	70 (40,9)	73 (42,7)	28 (16,4)	n.s.
Patienten n (%)	114 (100)	36 (31,6)	53 (46,5)	25 (21,9)	
Alter bei ED (Jahre ± SD)	58,0 ± 10,1	55,4 ± 11,5	59,2 ± 9,6	59,4 ± 8,4	n.s.
Geschlecht					n.s.
männlich	63	17	29	17	
weiblich	51	19	24	8	
Tumorstadium					n.s.
1	18	5	8	5	
2	15	8	5	2	
3	81	23	40	18	
Art der Therapie					n.s.
HD	74	23	37	14	
non HD	40	13	16	11	
HCTCI					n.s.
0 - 2	78	24	37	17	
3 - 5	25	7	10	8	
6 - 8	6	1	5	0	

ED = Erstdiagnose. SD = Standardabweichung. HD = Hochdosis-Chemotherapie. HCTCI = haematopoietic cell transplantation comorbidity index (Prognose-Score bei multiplem Myelom)

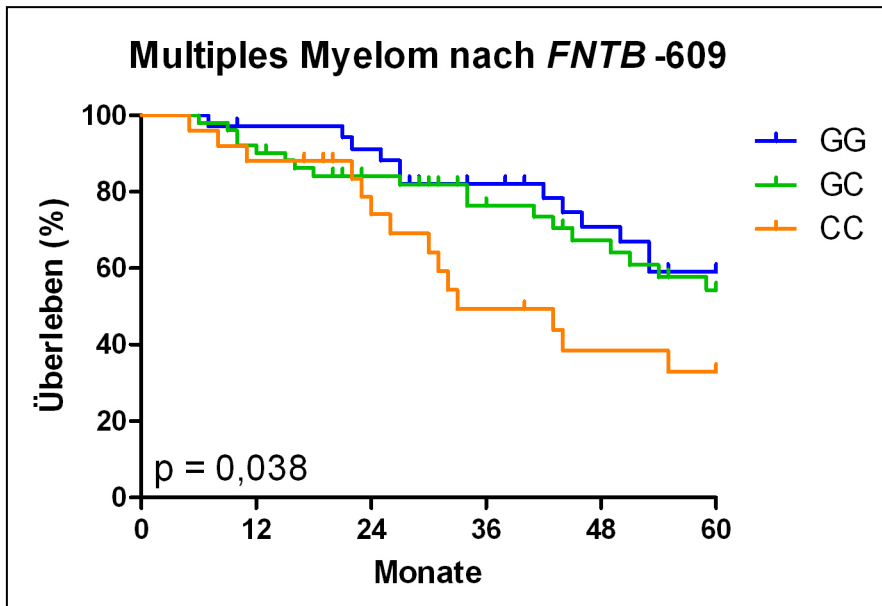


Abbildung 19: Prozentuales Überleben von Patienten mit multiplem Myelom abhängig von Genotypen des Polymorphismus *FNTB* -609

Tabelle 10: Einfluss verschiedener Faktoren auf das Überleben bei multiplem Myelom (Cox-Regression)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% KI)	p-Wert	HR (95% KI)	p-Wert
FNTB -609				
GG	1*		1*	
GC	1,204 (0,58-2,50)	0,618	1,098 (0,49-2,45)	0,818
CC	2,305 (1,06-5,00)	0,034	2,346 (1,02-5,41)	0,045
Geschlecht				
männlich	1*		1*	
weiblich	0,615 (0,33-1,15)	0,126	1,788 (0,92-3,50)	0,089
Tumorstadium				
1	1*		1*	
2	0,706 (0,18-2,73)	0,613	1,051 (0,25-4,42)	0,946
3	1,401 (0,62-3,16)	0,417	1,815 (0,79-4,18)	0,162
Art der Therapie				
HD	1*		1*	
non HD	1,985 (1,10-3,59)	0,023	1,873 (0,96-3,65)	0,065
HCTCI				
0 – 2	1*		1*	
3 – 5	2,401 (1,26-4,58)	0,008	2,029 (0,99-4,16)	0,054
6 – 8	3,332 (1,14-9,70)	0,027	4,856 (1,52-15,54)	0,008

HD = Hochdosis-Chemotherapie. HCTCI = haematopoietic cell transplantation comorbidity index (Prognose-Score bei multiplem Myelom)

Die Analyse des Krankheitsverlaufs von Patienten mit Nierenzellkarzinom abhängig von Genotypen des SNP *FNTB* -609 erfolgte bei 141 Patienten. Von den untersuchten DNA-Proben waren 63 homozygot für GG und 17 homozygot für CC. 61 Proben zeigten den heterozygoten Genotyp GC (Tabelle 11). Die Allelfrequenz betrug 0,66 für das G-Allel

sowie 0,34 für das C-Allel. Die Verteilung der Genotypen folgte dem Hardy-Weinberg-Gesetz und war nicht signifikant unterschiedlich zu der Genotypenverteilung bei gesunden Kaukasiern.

Bezüglich Geschlecht, Grading und Staging fanden sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

Die Metastasierung zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen ($p = 0,014$): Während im Laufe des Beobachtungszeitraums insgesamt bei etwa 30 % der Patienten neu aufgetretene Metastasen festgestellt werden konnten, war die Metastasierungsrate bei Patienten mit dem CC-Genotyp mit 70 % signifikant erhöht. Patienten mit dem GG- oder GC-Genotyp zeigten in nur 25 % der Fälle eine Metastasierung (Tabelle 11).

Ähnliches galt für die Tumorprogression: Auch hier fand man während des Beobachtungszeitraums mit über 70 % eine signifikant höhere Tumorprogression bei Patienten mit dem Genotyp CC ($p = 0,023$). Im Gesamtkollektiv lag die Progressionsrate bei 37,5 %, für Patienten mit einem G-Allel bei 26,6 % (Tabelle 11).

Diese Unterschiede spiegelten sich auch in der Kurve des Gesamtüberlebens wider: Alle Patienten, die den Genotyp CC aufwiesen, waren nach 117 Monaten verstorben, während von den Patienten mit dem GG- oder GC-Genotyp nach 240 Monaten noch etwa 80 % (77,3 % sowie 85,7 %) am Leben waren (Abbildung 20).

In der Cox-Regression spiegelte sich das schlechtere Outcome für Patienten mit dem CC-Genotyp ebenfalls wieder: Die HR für CC vs. GG lag bei 2,8 (1,1-7,1, $p = 0,025$). Ausserdem bestätigte sich, dass ein höherer Wert im Staging einen negativen Einfluss auf das Überleben bei Nierenzell-Karzinom nahmen (Tabelle 12).

Tabelle 11: klinisch-pathologische Eigenschaften und Genotypverteilung nach *FNTB* -609 bei Patienten mit Nierenzell-Karzinom

	Alle	<i>FNTB</i> -609 Genotyp			p-Wert
		GG	GC	CC	
Gesunde Kontrolle (Blutspender) n (%)	171 (100)	70 (40,9)	73 (42,7)	28 (16,4)	n.s.
Patienten n (%)	141 (100)	63 (44,7)	61 (43,3)	17 (12,1)	
Alter bei ED (Jahre ± SD)	60,9 ± 11,0	61,1 ± 10,8	61,1 ± 11,0	56,1 ± 11,7	n.s.
Geschlecht					n.s.
männlich	94	43	39	12	
weiblich	47	20	22	5	
Grading					n.s.
1	19	7	11	1	
2	75	35	32	8	
3	18	6	7	5	
Staging					n.s.
1 - 2	83	39	36	8	
3 - 4	58	24	25	9	

ED = Erstdiagnose. SD = Standardabweichung.

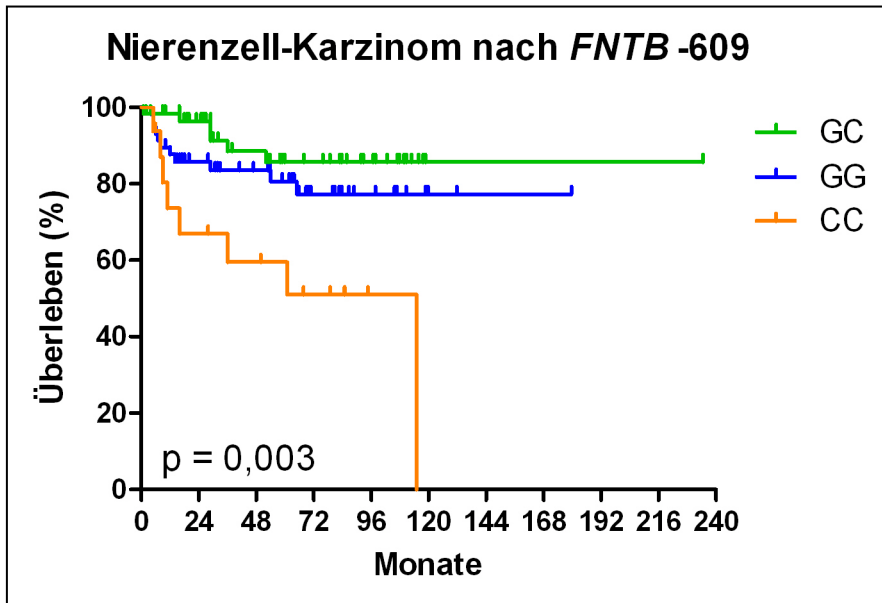


Abbildung 20: Prozentuales Überleben von Patienten mit Nierenzell-Karzinom abhängig von Genotypen des Polymorphismus *FNTB* -609

Tabelle 12: Einfluss verschiedener Faktoren auf das Überleben bei Nierenzell-Karzinom (Cox-Regression)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% KI)	p-Wert	HR (95% KI)	p-Wert
<i>FNTB</i> -609				
GG	1*		1*	
GC	0,547 (0,20-1,48)	0,235	0,499 (0,18-1,36)	0,175
CC	2,845 (1,14-7,08)	0,025	2,870 (1,13-7,29)	0,027
Alter bei ED	0,985 (0,95-1,02)	0,383	0,999 (0,96-1,04)	0,969
Geschlecht				
männlich	1*		1*	
weiblich	1,064 (0,69-1,64)	0,782	0,955 (0,39-2,34)	0,920
Staging				
1 - 2	1*		1*	
3 - 4	5,980 (2,40-14,90)	< 0,0001	5,835 (2,28-14,93)	< 0,0001

ED = Erstdiagnose.

3.3.2. Auswirkungen des Polymorphismus *FNTB* -173

Auch die Genotypen des Polymorphismus *FNTB* -173 waren mit unterschiedlichem Überleben bei verschiedenen Tumorerkrankungen assoziiert: Träger des 5G-Allels zeigten bei malignem Melanom sowie Mamma-Karzinom ein besseres Gesamtüberleben.

Die Analyse des Krankheitsverlaufs bei malignem Melanoms abhängig vom SNP *FNTB* -173 erfolgte bei 401 Patienten. Hiervon zeigten 165 Proben den 6G-Genotyp, 197 Proben waren heterozygot für den Polymorphismus *FNTB* -173 und bei 39 Proben fand sich der 5G-Genotyp (Tabelle 13). Die Allelfrequenzen betragen für das 6G-Allel 0,66 und für das

5G-Allel 0,34. Die Verteilung der Genotypen lag im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Verteilung der Genotypen im Vergleich zu gesunden Kaukasiern jedoch war signifikant unterschiedlich ($p = 0,0003$). Im erkrankten Kollektiv fanden sich signifikant weniger homozygote 6G-Träger sowie vermehrt heterozygote sowie homozygote 5G-Träger. Die Odds Ratios betragen 2,9 [1,34 – 6,64] (5G vs. 6G), 1,9 [1,33 – 2,83] (5G/6G vs. 6G) sowie 2,1 [1,43 – 2,97] (5G + 5G/6G vs. 6G) (Abbildung 21).

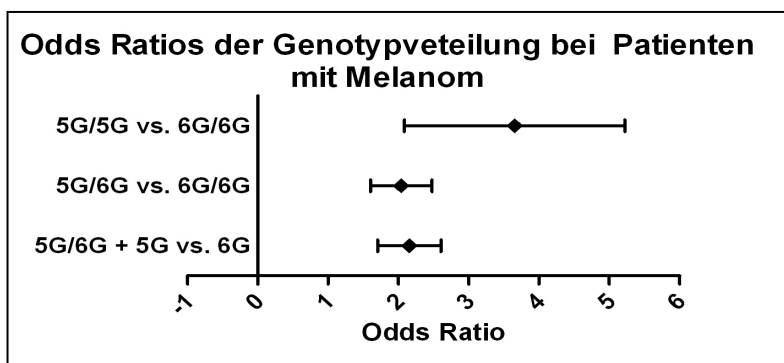


Abbildung 21: Odds Ratios der Genotypverteilung bei Patienten mit Melanom

Alter und Geschlecht waren vom Genotyp unabhängig und auch klinische Parameter wie Lokalisation des Melanoms, Clark-Level, UICC-Stadium, Ausdehnung des Primärtumors, Lymphknotenbefall sowie Fernmetastasen bei Erstdiagnose waren in Abhängigkeit des Genotyps nicht signifikant verschieden.

Für das Überleben von Melanom-Patienten fanden sich abhängig vom Genotyp für *FNTB* - 173 signifikante Unterschiede (Abbildung 22): Patienten mit dem 5G/5G-Genotyp zeigten eine deutlich bessere Prognose als Patienten mit dem 6G/6G-Genotyp ($p = 0,001$): Die 10-Jahres-Überlebensrate lag für homozygote Träger des 5G-Allels bei 57,7 %, wohingegen von den homozygoten Trägern des 6G-Allels nach 10 Jahren kein Patient mehr am Leben war. Die Überlebenskurve der heterozygoten Träger lag im Bereich zwischen den Kurven der homozygoten Träger. Hier betrug die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit 29,7 %. Auch in der Cox-Regression zeigte sich ein Überlebensvorteil für Patienten mit dem 5G-Allel. Die HR für 6G/6G vs. 5G/5G betragen 3,4 (1,3 – 8,9, $p = 0,012$) in der univariaten, sowie 5,9 (1,8 – 19,5, $p = 0,004$) in der multivariaten Analyse. Weiterhin zeigte sich, dass ein höheres Tumorstadium, ein Befall der Lymphknoten bei Erstdiagnose sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen bei Erstdiagnose mit einem schlechteren Outcome assoziiert waren (Tabelle 14).

Tabelle 13: klinisch-pathologische Eigenschaften und Genotypverteilung nach *FNTB* -173 bei Patienten mit Melanom

	Alle	<i>FNTB</i> -173 Genotyp			p-Wert
		6G	5G/6G	5G	
Gesunde Kontrolle (Blutspender) n (%)	171 (100)	101 (59,1)	62 (36,3)	8 (4,7)	0,0003
Patienten n (%)	401 (100)	165 (41,1)	197 (49,1)	39 (9,7)	
Alter bei ED (Jahre ± SD)	52,5 ± 17,2	52,7 ± 17,3	51,9 ± 17,3	54,3 ± 16,3	n.s.
Geschlecht					
männlich	188	79	90	19	n.s.
weiblich	213	86	107	20	
Lokalisation					
Kopf	57	20	31	6	n.s.
Stamm	158	66	78	14	
Extremitäten	178	72	87	19	
Tumorstadium T					
Tis, < 0,75 cm	137	58	63	16	n.s.
0,75 – 4 cm	223	88	116	19	
> 4 cm, Satelliten	30	12	15	3	
LK-Befall bei ED					
nein	381	155	188	38	n.s.
ja	20	10	9	1	
Fernmetastasen bei ED					
nein	394	160	195	39	n.s.
ja	7	5	2	0	
Clark-Level					
1	68	25	33	10	n.s.
2 - 3	208	83	106	19	
4 - 5	107	47	51	9	
UICC-Stadium					
1 - 2	352	144	174	34	n.s.
3 - 4	45	19	22	4	

ED = Erstdiagnose. SD = Standardabweichung. Tis = Tumor in situ. LK = Lymphknoten.

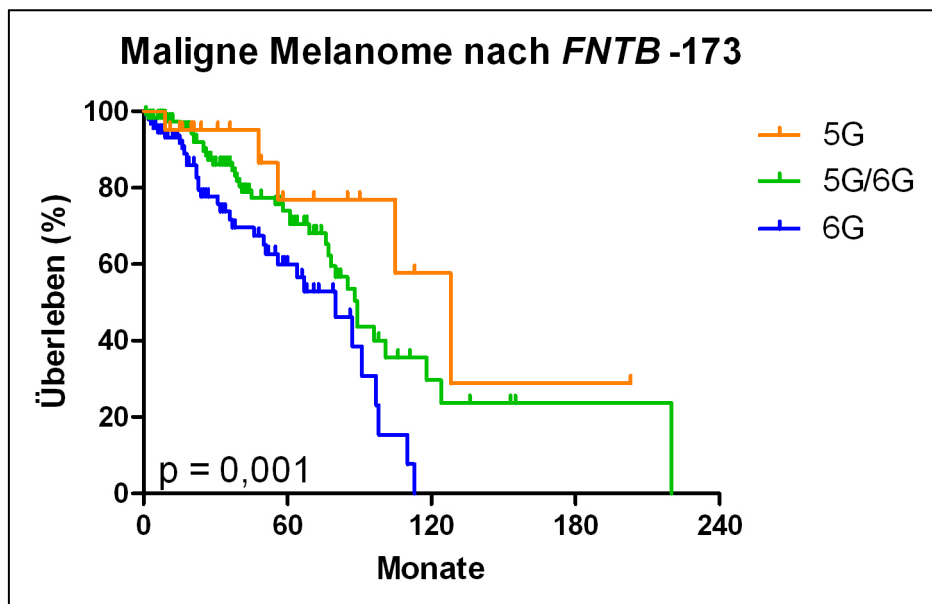


Abbildung 22: Prozentuales Überleben von Patienten mit Melanom abhängig von Genotypen des Polymorphismus *FNTB* -173

Tabelle 14: Einfluss verschiedener Faktoren auf das Überleben bei Melanom (Cox-Regression)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% KI)	p-Wert	HR (95% KI)	p-Wert
FNTB -173				
5G/5G	1*		1*	
6G/5G	1,762 (0,69-4,52)	0,239	3,724 (1,13-12,33)	0,031
6G/6G	3,407 (1,30-8,90)	0,012	5,890 (1,78-19,48)	0,004
Alter bei ED	1,029 (1,01-1,05)	0,001	1,042 (1,02-1,07)	<0,001
Geschlecht				
männlich	1*		1*	
weiblich	0,959 (0,60-1,53)	0,860	0,853 (0,48-1,51)	0,585
Lokalisation				
Kopf	1*		1*	
Stamm	1,480 (0,70-3,12)	0,303	0,510 (0,30-0,97)	0,039
Extremitäten	1,406 (0,67-2,95)	0,368	0,353 (0,14-0,89)	0,028
Tumorstadium T				
Tis, < 0,75 cm	1*		1*	
0,75 – 4 cm	1,107 (0,61-2,01)	0,736	2,495 (1,04-5,97)	0,040
> 4 cm, Satelliten	1,338 (0,63-2,83)	0,447	3,842 (1,04-14,16)	0,043
LK-Befall bei ED				
nein	1*		1*	
ja	5,061 (2,70-9,50)	<0,001	6,360 (2,39-16,89)	<0,001
Fernmetastasen bei ED				
nein	1*		1*	
ja	8,431 (3,30-21,57)	<0,001	4,628 (0,58-36,72)	0,147
Clark-Level				
1	1*		1*	
2 - 3	1,002 (0,41-2,45)	0,996	2,047 (0,50-8,33)	0,317
4 - 5	1,707 (0,72-4,07)	0,227	1,152 (0,34-3,87)	0,819

ED = Erstdiagnose. SD = Standardabweichung. Tis = Tumor in situ. LK = Lymphknoten.

Die Analyse des Einflusses des Polymorphismus *FNTB* -173 auf den Krankheitsverlauf bei Mammakarzinom erfolgte bei 202 Patientinnen. Die Genotypisierung ergab 108 Proben mit dem 6G-Genotyp sowie 14 Proben mit dem 5G-Genotyp. 80 Proben waren heterozygot (Tabelle 15). Die Allelfrequenzen betragen 0,73 für das 6G-Allel sowie 0,27 für das 5G-Allel. Die Verteilung der Genotypen folgte dem Hardy-Weinberg-Gesetz und war mit der Verteilung bei gesunden Kaukasiern vergleichbar.

Bei der Analyse der klinischen Parameter fanden sich keine signifikanten Unterschiede des Alters bei Erstdiagnose, des Tumorstadiums, der Invasivität des Tumors, des Lymphknotenbefalls und –status, des UICC-Stadiums, der Mitoserate sowie des Gratings bezogen auf den Genotyp.

Bei der Überlebensanalyse über 5 Jahre zeigte sich, dass keine der Patientinnen, die homozygot für den 5G-Genotyp war, verstarb. Von Patienten, die das 6G-Allel trugen, waren jedoch nach 5 Jahren nur noch etwa 75 % (homozygot 73,1 %, heterozygot 78,8 %) am Leben (Abbildung 23).

Tabelle 15: klinisch-pathologische Eigenschaften und Genotypverteilung nach *FNTB* -173 bei Patientinnen mit Mamma-Karzinom

	Alle	<i>FNTB</i> -173 Genotyp			p-Wert
		6G	5G/6G	5G	
Gesunde Kontrolle (Blutspender) (%)	171 (100)	101 (59,1)	62 (36,3)	8 (4,7)	n.s.
n (%)	202 (100)	108 (53,5)	80 (39,6)	14 (6,9)	
Alter bei ED (Jahre ± SD)	56,1 (12,0)	56,5 (11,9)	55,8 (11,9)	56,1 (14,2)	n.s.
Tumorstadium					n.s.
Tis / mic	9	8	1	0	
T1 – T2	169	88	67	14	
T3 – T4	22	11	11	0	
Invasivität					n.s.
nein	9	8	1	0	
ja	193	100	79	14	
LK-Befall bei ED					n.s.
nein	118	64	46	8	
ja	83	44	33	6	
LK-Status					n.s.
0	118	64	46	8	
1	46	28	13	6	
2 - 3	37	16	20	1	
UICC-Stadium					n.s.
0 - I	79	44	28	7	
IIA - IIB	75	40	29	6	
III - IV	46	23	22	1	
Mitoserate					n.s.
niedrig	17	8	8	1	
mittel	91	52	32	7	
hoch	88	45	38	5	
Grading					n.s.
1	71	38	28	5	
2	66	35	27	4	
3	51	25	22	4	

ED = Erstdiagnose. SD = Standardabweichung. Tis = Tumor in situ. mic = mikroinvasives Karzinom. LK = Lymphknoten

Die HR für 6G/6G vs. 5G/5G betragen 3,1 (1,1 – 9,4, $p = 0,037$) in der univariaten, sowie 3,2 (1,0 – 10,0, $p = 0,043$) in der multivariaten Analyse. Außerdem zeigte sich in der Cox-Regression, dass sowohl UICC-Statium als auch das Grading mit dem Überleben bei Patientinnen mit Mamma-Karzinom assoziiert waren (Tabelle 16).

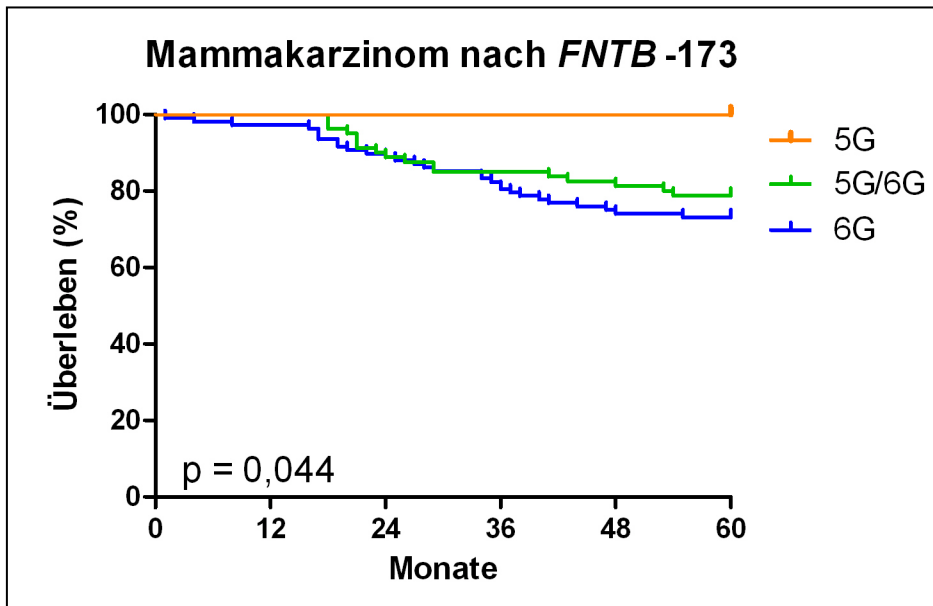


Abbildung 23: Prozentuales Überleben von Patientinnen mit Mamma-Karzinom abhängig von Genotypen des Polymorphismus *FNTB -173*

Tabelle 16: Einfluss verschiedener Faktoren auf das Überleben bei Mamma-Karzinom (Cox-Regression)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% KI)	p-Wert	HR (95% KI)	p-Wert
<i>FNTB -173</i>				
5G/5G	1*		1*	
6G/5G	1,309 (0,73-2,35)	0,367	1,197 (0,65-2,20)	0,562
6G/6G	3,174 (1,07-9,39)	0,037	3,210 (1,04-9,95)	0,043
Alter bei ED	0,997 (0,97-1,02)	0,806	1,000 (0,98-1,03)	0,981
UICC-Stadium				
0 - I	1*		1*	
IIA - IIB	1,573 (0,67-3,68)	0,296	1,342 (0,35-5,11)	0,667
III - IV	6,159 (2,86-13,29)	<0,001	9,258 (1,14-74,91)	0,037
Grading				
1	1*		1*	
2	1,653 (0,71-3,87)	0,247	1,362 (0,57-3,24)	0,490
3	3,824 (1,74-8,41)	0,001	2,257 (0,94-5,45)	0,070

ED = Erstdiagnose. SD = Standardabweichung. Tis = Tumor in situ. mic = mikroinvasives Karzinom. LK = Lymphknoten

3.4. Kopplungsanalyse

Genetische Merkmale werden nicht zwingend unabhängig voneinander vererbt. Je kleiner der Abstand zwischen zwei Genorten ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese gekoppelt vererbt werden. In diesem Fall spricht man von einem Kopplungsungleichgewicht. Die Kombination von Allelen zweier oder mehrerer SNPs wird als Haplotyp bezeichnet. Ist dieser sowie die Häufigkeit der verschiedenen

Allelkombinationen bekannt, so ist es möglich, durch die Genotypisierung eines SNPs Rückschlüsse auf andere zu ziehen.

Um mögliche Kopplungen der Polymorphismen in *FNTB* zu erkennen, wurden die Genotypenverteilungen zunächst vergleichend in drei Kreuztabellen dargestellt (Tabellen 17 bis 19).

Tabelle 17: Kreuztabelle der Genotypen der SNPs *FNTB* -609 und *FNTB* -173

<i>FNTB</i> -609 / <i>FNTB</i> -173	6G	5G/6G	5G	Gesamt
GG	68	2	0	70
GC	25	48	0	73
CC	8	12	8	28
Gesamt	101	62	8	171

Tabelle 18: Kreuztabelle der Genotypen der SNPs *FNTB* -609 und *FNTB* -179

<i>FNTB</i> -609 / <i>FNTB</i> -179	TT	TA	AA	Gesamt
GG	62	6	2	70
GC	68	4	1	73
CC	24	3	1	28
Gesamt	154	13	4	171

Tabelle 19: Kreuztabelle der Genotypen der SNPs *FNTB* -173 und *FNTB* -179

<i>FNTB</i> -173 / <i>FNTB</i> -179	TT	TA	AA	Gesamt
6G	89	9	3	101
5G/6G	58	3	1	62
5G	7	1	0	8
Gesamt	154	13	4	171

Es fiel auf, dass das 5G-Allel des Polymorphismus *FNTB* -173 eine nahezu 100%ige Kopplung zum C-Allel des Polymorphismus *FNTB* -609 zeigte. Passend dazu erschien das G-Allel des Polymorphismus *FNTB* -609 in auffälliger Häufigkeit zusammen mit der 6G-Variante des Polymorphismus *FNTB* -173 (Tabelle 17).

Außerdem wurde eine Kopplungstendenz des 5G-Allels des Polymorphismus *FNTB* -173 mit dem T-Allel des Polymorphismus *FNTB* -179 sowie des A-Allels des Polymorphismus *FNTB* -179 mit dem 6G-Allel des Polymorphismus *FNTB* -173 sichtbar (Tabelle 19).

Zur genaueren Untersuchung möglicher Kopplungsungleichgewichte, zur Bestimmung der Haplotypfrequenzen und für die Berechnung der Werte der Kopplungsstatistik wurden die Ergebnisse mit dem Programm „HaploView 4.1“ ausgewertet.

Zuerst wurden die drei Polymorphismen jeweils miteinander analysiert (Abbildung 24a). Es fand sich keine Kopplung zwischen den Polymorphismen *FNTB* -609 und *FNTB* -179 (Kopplungskoeffizient $D' = 0,008$ und Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,0$) und nur eine schwache Kopplung zwischen den Polymorphismen *FNTB* -179 und *FNTB* -173 (Kopplungskoeffizient $D' = 0,356$ und Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,002$).

In den zugehörigen Haplotypen-Plots mit Haplotypenfrequenzen (Abbildung 24b und c) zeigten sich dementsprechend auch keine Präferenzen für bestimmte Haplotypen. Es fiel aber auf, dass das A-Allel des Polymorphismus *FNTB* -179 in keinem Fall in Kombination mit dem 5G-Allel des Polymorphismus *FNTB* -173 auftrat. Hierbei ist jedoch die geringe Frequenz der beiden Allele zu beachten.

Die bereits aus den Kreuztabellen ersichtliche Kopplung zwischen den Polymorphismen *FNTB* -609 und *FNTB* -173 konnte bestätigt werden. Der Kopplungskoeffizient D' lag bei 0,951 und der Korrelationskoeffizient r^2 betrug 0,441. Im Haplotypenplot (Abbildung 24d) zeigte sich eine 95 %ige Kopplung des G-Allels des Polymorphismus *FNTB* -609 an das 6G-Allel des Polymorphismus *FNTB* -173 sowie eine Kopplung des 5G-Allels des Polymorphismus *FNTB* -173 an das C-Allel des Polymorphismus *FNTB* -609. Daher entstanden auch nicht, wie bei freier Rekombinierbarkeit üblich, vier, sondern nur drei verschiedene Haplotypen.

Es zeigten sich also bei Betrachtung der drei Polymorphismen, nicht wie bei freier Rekombination erwartet 8, sondern insgesamt nur 5 Haplotypen, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1% vorkamen (Abbildung 24e). Diese 5 Haplotypen führen zu 15 möglichen Diplotypen. Aufgrund der Größe der Studienkollektive und der zu erwarteten kleinen Zahl von Fällen pro Untergruppe wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine Analyse der Diplotypen in den Patientenkollektiven verzichtet.

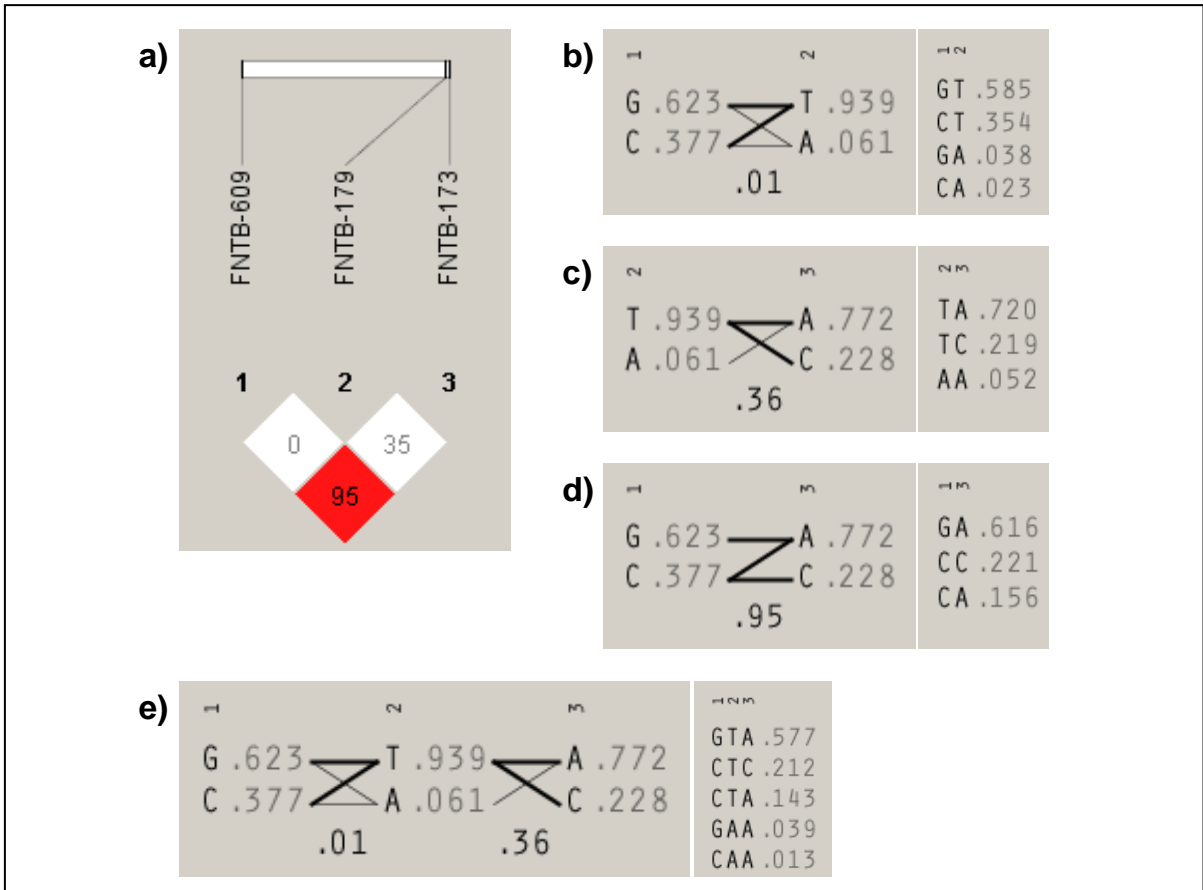


Abbildung 24: Haplotypenanalyse mit Haplotypfrequenzen. a) Lage der Polymorphismen sowie Angabe der Kopplungskoeffizienten D' . Rot eingefärbte Felder stehen für eine starke Kopplung als weiße. b) – d) Haplotypenplots mit Haplotypenfrequenzen. Dargestellt sind nur Kopplungen, die mit einer relativen Frequenz von mehr als 1 % auftraten. Fette Verbindungslinien stehen für ein Vorkommen der Allelkombination von mehr als 10 %. Unter den Verbindungslinien ist jeweils D' angegeben. Hinter den Allelen bzw. Haplotypen findet man die relative Häufigkeit ihres Auftretens. e) Darstellung der Haplotypen des FNTB-Promotors, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1 % auftreten. In allen Teilabbildungen: 1: FNTB -609, 2: FNTB -179, 3: FNTB -173. Die Genotypen des Polymorphismus FNTB -173 wurden aus programmtechnischen Gründen für die Haplotypenuntersuchung umbenannt: A: 6G, C: 5G

4. Diskussion

4.1. SNPs im Promotor von *FNTB*

Polymorphismen in der Promotorregion von *FNTB* waren zwar bereits in Datenbanken hinterlegt, jedoch durch unabhängige Untersuchungen bisher nicht validiert. Bei unseren Untersuchungen fanden wir drei Polymorphismen, denen eine funktionelle Bedeutung zukommen könnte. Nicht auszuschließen ist, dass es weitere, von uns nicht entdeckte Polymorphismen in der untersuchten Region gibt, jedoch ist es unwahrscheinlich, dass diese in einer Häufigkeit von mehr als 5 % auftreten.

Unsere Untersuchungen bestätigen die Existenz der beschriebenen Polymorphismen. Da die Verteilung der Polymorphismen *FNTB* -609 und *FNTB* -173 kompatibel mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht war, kann von einer korrekten Genotypisierung ausgegangen werden.

Der Polymorphismus *FNTB* -179, welcher mit einer A-Allel-Frequenz von lediglich 0,061 vorkam, zeigte eine Verteilung, die nicht dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprach. Es ist jedoch möglich, dass sich bei einer größeren Anzahl von sequenzierten DNA-Proben eine Verteilung im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht eingestellt hätte. Auf die weitere Analyse wurde jedoch verzichtet, da dem SNP auf Grund seines seltenen Vorkommens für klinische Anwendungen wahrscheinlich nur eine geringe praktische Bedeutung zukommt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Genotypen der SNPs *FNTB* -609 und *FNTB* -173 bei verschiedenen Ethnien unterschiedlich ist. Für beide Polymorphismen fand sich das seltenere Allel (*FNTB* -609 C und *FNTB* -173 5G) häufiger bei Kaukasiern als bei Schwarzafrikanern und Chinesen. Dies lässt darauf schließen, dass die häufiger vorkommenden Allele *FNTB* -609 G und *FNTB* -173 6G die evolutionär älteren sind und somit als Wildtyp-Variante verstanden werden können. Grundlage dieser Annahme ist die „Out of Africa Hypothese“, welche die nach heutigen Kenntnissen wahrscheinlichste Theorie zur Evolution des Menschen ist (Stinger C, 2002). Die Polymorphismen im Gen *FNTB* entstanden demzufolge erst nachdem die Ausbreitung des Menschen von Afrika auf andere Kontinente erfolgte.

Da die gefundenen Polymorphismen in der Promotorregion liegen, ist nicht davon auszugehen, dass es sich um stumme SNPs handelt, sondern vielmehr um Veränderungen, die das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren beeinflussen und somit zu einer

veränderten Genexpression führen können. Die funktionellen Auswirkungen konnten mit molekulargenetischen Methoden dargestellt werden (siehe 4.2 und 4.3).

Doch nicht nur jeder SNP für sich, sondern auch die Kombination der SNPs im sogenannten Haplotyp beeinflusst die Aktivität des Promotors, was wir mit Hilfe eines Reporter Assays darstellen konnten.

Auch denkbar ist, dass ein oder mehrere SNPs bzw. deren Kombination im Haplotyp die Splicevarianten bzw. das Verhältnis der unterschiedlichen Spleißvarianten beeinflusst, was eine veränderte Funktion der Farnesyltransferase bedingen könnte. Beispiele für eine Assoziation zwischen Promotorstruktur und alternativem Spleißen finden sich in der Literatur bereits zu ganz unterschiedlichen Molekülen (Cramer P et al., 1997, Kornblihtt AR, 2005). Untersuchungen möglicher Splicevarianten von *FNTB* könnten Gegenstand weiterer Forschung sein.

Weiterhin ist es möglich, dass die gefundenen SNPs nicht nur die Funktion des Promotors der Farnesyltransferase, sondern auch die anderer Gene, welche in unmittelbarer Nähe zum Genlocus von *FNTB* kodiert werden, beeinflussen (Abbildung 25). Beispielhaft ist hier das Gen *RAB15* zu nennen. Dieses wird in entgegengesetzter Richtung zu *FNTB* abgelesen und liegt mit seinem Translationsstart lediglich 14 kB vom ATG des *FNTB*-Gens entfernt. Somit ist es durchaus möglich, dass *RAB15* die gleiche Promotorregion wie *FNTB* nutzt und deshalb auch durch die SNPs im Promotor in seiner Transkriptionsaktivität beeinflusst wird. In diesem Fall spielt natürlich auch das für die SNPs gefundene Kopplungsungleichgewicht eine Rolle.

Das Gen kodiert für das gleichnamige Molekül Rab15, welches zur Gruppe der Ras-Moleküle gehört und, zusammen mit weiteren Molekülen, den transmembranären Transport reguliert (Zuk PA und Elferink LA, 2000) und somit Einfluss auf die Exprimierung von zellmembranständigen Rezeptoren und andere Signalwege hat.

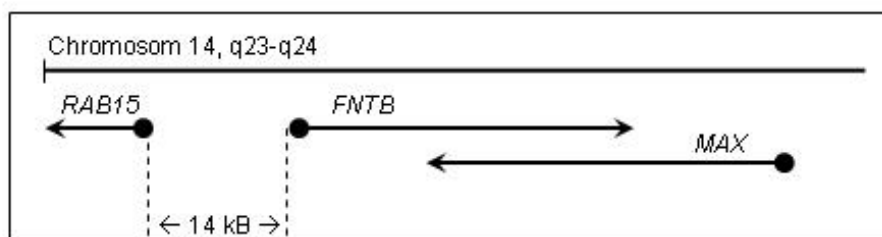


Abbildung 25: genomischer Kontext von *FNTB*.

Die Isoform F des *MAX*-Gens deckt sich zu großen Teilen mit dem Genlokus für *FNTB*. Das Gen wird ebenfalls in entgegengesetzter Richtung zu *FNTB* abgelesen, so dass hier eine gemeinsame Promotorregion ausgeschlossen werden kann. Denkbar ist jedoch, dass SNPs im Promotor von *FNTB* an andere Polymorphismen koppeln, die beispielsweise einen Aminosäure-Austausch im von *MAX* kodierten Protein bewirken. Das Protein Max (Myc associated factor X) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher als Heterodimer unter anderem mit Myc, einem Onkoprotein, Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose nimmt (Hurlin PJ und Huang J, 2006).

4.2. Funktionelle Auswirkungen des SNPs *FNTB* -609

Bei den Untersuchungen zu den funktionellen Auswirkungen des SNPs *FNTB* -609 zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen. Das G-Allel zeigte eine stärkere Bindung von Transkriptionsfaktoren und war mit einer höheren mRNA-Expression als das C-Allel assoziiert. Da die Ergebnisse für die Gruppe der heterozygoten Träger des SNPs *FNTB* -609 in Bezug auf die quantitative mRNA-Expression zwischen denen der Gruppen der homozygoten Träger lagen, kann ein Gen-Dosis-Effekt vermutet werden.

Der in der in-silico-Analyse identifizierte Transkriptionsfaktor Thing1-E47 gehört zur Familie der helix-loop-helix (HLH) Transkriptionsfaktoren, welche einen fördernden Einfluss auf die Expression von unterschiedlichen Genen zeigen (Murre C et al., 1994). Gemeinsam mit weiteren Transkriptionsfaktoren bildet er eine Plattform für die RNA-Polymerase II, welche daraufhin mit der Synthese von mRNA beginnt (Knippers R, 2006). Zwar ist die in-silico-Analyse nur ein theoretisches Konstrukt, welches die wahrscheinlichsten Bindungsaffinitäten anhand von mathematischen Modellen berechnet, jedoch kann anhand von unseren Ergebnissen zur mRNA-Expression zumindest von einem aktivierenden Transkriptionsfaktor ausgegangen werden, der bei Trägern des G-Allels zu einer stärkeren mRNA-Expression als bei Trägern des C-Allels führt.

Die Kaplan-Meier-Überlebensanalysen stützten sich auf bereits vorhandene Daten aus Überlebensstudien zu verschiedenen Tumoren (Frey UH et al., 2006 sowie unveröffentlichte Daten der Klinik für Hämatologie (Universitätsklinikum Essen)).

Hier musste darauf vertraut werden, dass systematische Fehler im Studiendesign sowie ein „Selection Bias“ vermieden worden waren, was anhand der veröffentlichten Literatur beurteilt werden konnte. Da jedoch die untersuchte Variable (der SNP *FNTB* -609) zur Zeit der Studien noch nicht bekannt war und dieser auch keine Abhängigkeit bezüglich der

erfassten klinischen Parameter zeigte, ist von einer unerkannten Selektion nicht auszugehen.

Sowohl bei Patienten mit multiplem Myelom als auch mit Nierenzell-Karzinom war das G-Allel mit einer besseren Prognose assoziiert. Auffällig war, dass die Genotypen GG und GC einen ähnlichen Kurvenverlauf und eine ähnliche Prognose hatten und sich vom CC-Genotyp signifikant unterschieden. Dies lässt darauf schließen, dass das Vorhandensein zumindest eines G-Allels als protektiver Faktor zu werten ist.

Bei Patienten mit multiplem Myelom zeigte sich eine Häufung des CC-Genotyps im Vergleich zu gesunden Kaukasiern. Bei einer größeren Anzahl an Proben wäre dieser Unterschied möglicherweise signifikant und könnte darauf hinweisen, dass der CC-Genotyp ein Risikofaktor für die Entstehung eines multiplen Myeloms ist.

Die Tatsache, dass die Unterschiede im Überleben sowohl bei einem soliden als auch bei einem hämatologischen Tumor gefunden wurden zeigt, dass der Einfluss des Polymorphismus *FNTB* -609 nicht auf ein Organsystem beschränkt ist. Es ist zu vermuten, dass auch bei weiteren Tumorkollektiven ähnliche Abhängigkeiten beobachtet werden können.

Die Frage, weshalb das G-Allel und die damit möglicherweise verbundene erhöhte Expression der Farnesyltransferase mit einem längeren Überleben bei Tumorerkrankungen einhergeht, soll weiter unten gemeinsam mit dem SNP -173 diskutiert werden.

Untersuchungen zu genotypabhängigen Unterschieden im Überleben bei Patienten mit Mamma-Karzinom sowie Melanom blieben für den Polymorphismus *FNTB* -609 ohne signifikantes Ergebnis.

4.3. funktionelle Auswirkungen des SNPs *FNTB* -173

Für den SNP *FNTB* -173 konnte *in vitro* eine selektive Bindung der in Karpas-Zellen vorhandenen Transkriptionsfaktoren an das 5G-Allel des Polymorphismus nachgewiesen werden. Bei der *in-silico*-Analyse fand sich hierzu der Transkriptionsfaktor ZBP-89. Dieses Protein gehört zur Familie der Krüppel-Typ Zink-Finger-Proteine, ist ubiquitär exprimiert und kann sowohl aktivierend als auch repressiv auf die Transkription wirken (Bai L et al., 2002). Außerdem hat ZBP-89 Einfluss auf Zellwachstum und Zelltod (Bai L et al., 2004). Signifikante Ergebnisse zur mRNA-Expression konnten für den SNP *FNTB* -173 nicht erzielt werden. Somit ist nicht klar, ob die Bindung von Transkriptionsfaktoren

an das 5G-Allel zu einer vermehrten oder verminderten mRNA-Expression führt. Denkbar wäre, dass die Funktion des Transkriptionsfaktors gewebeabhängig ist.

Die Überlebensanalyse stützte sich wiederum auf bereits vorhandene Daten, aber auch in den auf den SNP *FNTB* -173 untersuchten Kollektiven fanden sich keine klinischen Parameter, die abhängig vom Genotyp waren, so dass von einem unverzerrten Studiendesign ausgegangen werden kann. Die gefundene Abweichung der Genotypverteilung im Kollektiv von Patienten mit Melanom im Vergleich zu gesunden Probanden lässt vermuten, dass Träger des 5G-Allels ein höheres Risiko haben, an einem Melanom zu erkranken. Dies spiegelt sich auch in den Odds Ratios wider: Die berechneten Werte > 1 zeigen, dass das 5G-Allel als Risikofaktor, bzw. das 6G-Allel als protektiver Faktor zu werten ist. Die Beobachtung des Krankheitsverlaufs im Vergleich zu Trägern des 6G-Allels zeigte jedoch einen Vorteil im Überleben für die 5G-Variante. Diese zunächst widersprüchlich erscheinende Beobachtung ist damit erklärbar, dass das Protein Farnesyltransferase eine Vielzahl an Zielstrukturen hat, die unabhängig von einander Einfluss zum einen auf die Tumorentstehung, zum anderen auf die Tumorprogression nehmen können.

Auch bei an Mamma-Karzinom erkrankten Frauen zeigte sich ein längeres Überleben für Trägerinnen der 5G-Variante.

Diese gleichartigen Beobachtungen sowohl bei Melanom als auch bei Mamma-Karzinom lassen darauf schließen, dass das 5G-Allel mit seiner stärkeren Bindung von Transkriptionsfaktoren als ein positiver prognostischer Faktor in Bezug auf den Erkrankungsverlauf zu werten ist.

4.4. Interpretation der Ergebnisse im Zusammenhang mit klinischen Studien

Für den SNP *FNTB* -609 konnte gezeigt werden, dass das Allel, welches eine stärkere Transkriptionsfaktor-Bindung sowie eine erhöhte mRNA-Expression zeigte, mit einem längeren Gesamtüberleben bei verschiedenen Tumoren einherging. Ebenso verhielt es sich mit dem SNP *FNTB* -173, wobei hier keine Daten zur mRNA-Expression vorliegen, und nur vermutet werden kann, dass es sich bei den an das 5G-Allel bindenden Transkriptionsfaktoren um aktivierende Mechanismen handelt.

Wenn davon ausgegangen werden kann, dass diese Beobachtungen eine gesteigerte Expression der Farnesyltransferase bedeuten, wäre die Farnesylierung von bestimmten Proteinen als Schutzfaktor in Bezug auf die Tumorprogression zu deuten.

Dennoch zeigten sich in einigen klinischen Studien zur Anwendung von FTIs Erfolge bei der Tumorthherapie (Caponigro F et al., 2003), was zunächst widersprüchlich zu unseren Beobachtungen erscheint. Diese Studien basieren auf der These, dass die Farnesylierung Voraussetzung für die Funktion verschiedener Proteine sei, die das Tumorwachstum fördern. Für das Protein H-Ras beispielsweise ist ein solcher Zusammenhang bewiesen (Sebti SM et al., 2005). Im Umkehrschluss wurde klinisch versucht, das Tumorwachstum durch eine Hemmung der Farnesylierung zu unterdrücken.

Jedoch gibt es auch Substrate der Farnesyltransferase, welchen ein tumorsuppressiver Einfluss zugeschrieben wird: Hierzu gehört beispielsweise das Protein RhoB, welches sowohl in der farnesylierten, als auch in der geranylgeranylierten Form wachstumshemmende Eigenschaften zu haben scheint (Chen Z et al., 2000). In Brust- und Ovarial-Tumoren konnte ein Verlust des Tumor-Suppressor-Gens *NOEY2* festgestellt werden, das für ein Ras-ähnliches Signalprotein kodiert. Auch *NOEY2* ist von einer posttranslationalen Modifikation durch die Farnesyltransferase abhängig (Ellis CA et al., 2002). Solche und weitere Proteine könnten die von uns gemachten Beobachtungen erklären.

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft sind längst nicht alle farnesylierten Proteine sowie deren Funktionen bekannt, und so ist eine Koexistenz von wachstumsfördernden Proteinen, die die Erfolge in der Tumorthherapie mit FTIs erklären können, und wachstumshemmenden Proteinen, welche unsere Beobachtungen stützen, durchaus denkbar.

4.5. Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Praxis

Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass Ras nicht das einzige Schlüsselmolekül bei der Tumorthherapie mit FTIs sein kann. Gründe hierfür sind zum einen die fehlende Korrelation zwischen dem Vorhandensein von tumorfördernden Ras-Mutationen und dem FTI-induzierten Stopp des Tumorwachstums (Sepp-Lorenzino L et al., 1995). Zum anderen findet in Gegenwart von FTIs häufig eine alternative Prenylierung durch die GGTase I statt, welche die Funktion der mutierten Ras-Moleküle aufrecht erhält – in solchen Zellen

konnte aber dennoch ein Rückgang der Tumoraktivität unter Therapie mit FTIs beobachtet werden (Sun J et al., 1998).

Ras und andere bisher identifizierte Zielstrukturen der Farnesyltransferase konnten somit bisher keine zufrieden stellende Erklärung für die divergenten Erfolge in klinischen Versuchen liefern – neu identifizierte farnesylierte Proteine, wie z.B. PRL, RND und RHEB sind mögliche Zielstrukturen von FTIs, welche einer genaueren Betrachtung bedürfen (Sebti SM et al., 2003).

Während die klinische Evaluation von FTIs weiter voran schreitet, ist deren molekularer Wirkmechanismus noch immer nicht entschlüsselt. Das Nichtansprechen auf FTIs scheint nicht auf eine ungenügende Hemmung der Farnesylierung zurückzuführen zu sein, denn Surrogatproteine wie HDJ-2 zeigen unter FTI-Therapie eine ausreichende Hemmung (Lancet JE et al., 2007). Vielmehr scheint die Farnesylierung für die Tumorprogression nicht essentiell zu sein. Dies kann entweder auf alternative Prenylierungswege zurückzuführen sein, die unter Therapie mit FTIs einsetzen, oder auf bisher noch unbekannte Zielstrukturen der Farnesyltransferase, welche nur bei einer bislang nicht identifizierten Subgruppe der Patienten Ursache für die Tumorerkrankung sind.

Die von uns identifizierten Polymorphismen werden auf Grund ihrer Lokalisation im Promotor zwar keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von FTIs an die Farnesyltransferase haben, können jedoch trotzdem Einfluss auf das Therapieansprechen nehmen. Denkbar ist beispielsweise, dass Träger der jeweils aktiveren Allele eine höhere Konzentration der FTIs benötigen, um eine vollständige Hemmung der Farnesyltransferase und somit einen Therapieerfolg zu erreichen. Sollte sich diese Vermutung bestätigen, wären Genotypisierungen hilfreich, um einerseits Patienten zu identifizieren, die eine besonders hohe Dosis an FTIs benötigen, und andererseits, um Nebenwirkungen bei Patienten mit weniger aktiver Farnesyltransferase möglichst gering zu halten.

4.6. Ausblick

Inhibitoren der Farnesyltransferase haben nicht nur Potential bei der Tumorthherapie. Die Substanzen lassen Erfolge auch bei gänzlich anderen Erkrankungen erhoffen: Die Hutchinson-Gilford Progerie beispielsweise, eine Erbkrankheit, welche durch ein verlangsamtes Wachstum, sklerodermatöse Hautveränderungen, Alopezie, Mikrognathie, Osteoporose, osteolytische Läsionen der Knochen und artherosklerotischen Gefäßverkalkungen charakterisiert ist, beruht auf einer Genom-Mutation im Gen für

Prelamin A, welches eine posttranslationale Farnesylierung erfährt. Versuche im Mausmodell zeigten unter Therapie mit FTIs einen signifikanten Rückgang der Symptome, unter den verwendeten niedrigen Dosierungen jedoch keine vollständige Remission (Yang SH et al., 2006).

Auch im Bereich von Parasitenerkrankungen werden Farnesyltransferaseinhibitoren erprobt. Hier ist nicht die menschliche Farnesyltransferase das Ziel, sondern die der Protozoen, wie beispielsweise *Plasmodium falciparum* und *Trypanosoma brucei*. Diese zeigen ein vielfach besseres Ansprechen auf FTIs als humane Zellen; ein Grund hierfür könnte das Fehlen der GGTase I sein, welches jedoch noch nicht bewiesen ist. In Mäusen konnte mit Hilfe des FTIs BMS-38691 ein vollständiger Rückgang der Parasitämie beobachtet werden (Eastman RT et al., 2006). Diese Versuche im Tiermodell lassen auf neue Therapien im Kampf gegen Malaria und andere parasitäre Erkrankungen hoffen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die strukturelle und funktionelle Analyse der Promotorregion des Gens *FNTB*. Dieses kodiert für die β -Untereinheit der Farnesyltransferase, ein Enzym, das für die posttranslationale Modifikation zahlreicher Moleküle verantwortlich ist und zurzeit im Fokus von klinischen Studien zur Evaluation von Farnesyltransferaseinhibitoren (FTI), einem neuen Ansatz in der Tumorthherapie, steht. Wir konnten drei Polymorphismen validieren: Dies waren die Basenaustausche (single nucleotide polymorphisms (SNPs)) *FNTB* -609 G>C, *FNTB* -179 T>A und *FNTB* -173 6G>5G. Bei der funktionellen Analyse der SNPs *FNTB* -609 und *FNTB* -173 zeigten sich deutliche Unterschiede bei der Bindung von Transkriptionsfaktoren sowie der mRNA Expression abhängig vom Genotyp. Hierbei zeigten die Allele *FNTB* -609 G sowie *FNTB* -173 5G eine stärkere Transkriptionsfaktor-Bindung sowie eine erhöhte mRNA-Expression. Bei der Überlebensanalyse unterschiedlicher Tumorkollektive fanden sich für diese Allele höhere Überlebensraten im Vergleich zu den komplementären Allelen: Der SNP *FNTB* -609 zeigte Unterschiede im Überleben bei Patienten mit multiplem Myelom (5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) 59,1 % für den GG-Genotyp vs. 32,9 % für den CC-Genotyp, $p = 0,038$) sowie bei Patienten mit Nierenzell-Karzinom (10-JÜR 77,3 % für den GG-Genotyp vs. 0 % für den CC-Genotyp, $p = 0,003$). Der SNP *FNTB* -173 zeigte Unterschiede im Überleben bei Patientinnen mit Mamma-Karzinom (5-JÜR 100 % für den 5G/5G-Genotyp vs. 73,1 % für den 6G/6G-Genotyp, $p = 0,044$) sowie bei Patienten mit Melanom (10-JÜR 57,7 % für den 5G/5G-Genotyp vs. 0 % für den 6G/6G-Genotyp, $p = 0,001$). In diesem Kollektiv fiel außerdem ein Unterschied der Genotyp-Verteilung im Vergleich zu gesunden Kaukasiern zu Gunsten des 5G-Allels auf. Die Odds Ratios betrugen 2,9 [1,34 – 6,64] (5G vs. 6G), 1,9 [1,33 – 2,83] (5G/6G vs. 6G) sowie 2,1 [1,43 – 2,97] (5G + 5G/6G vs. 6G).

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Farnesylierung von Proteinen tumorsuppressiven Charakter hat. Trotzdem zeigen einige klinische Studien positive Erfolge in der Tumorthherapie mit FTIs. Mittlerweile ist bekannt, dass viele Moleküle in Anwesenheit von FTIs durch alternative Enzyme prenyliert werden, so dass mit den bisher bekannten Zielstrukturen der Farnesyltransferase noch keine zufrieden stellende Erklärung für die (teilweise divergenten) Studienergebnisse gefunden werden kann.

Zum heutigen Stand der Forschung ist das Schlüsselprotein in der Tumorthherapie mit Farnesyltransferaseinhibitoren weiterhin unbekannt, möglicherweise sind sogar je nach Tumorart unterschiedliche Moleküle für das Ansprechen auf FTIs verantwortlich. Unsere Ergebnisse können einen Beitrag zum Verständnis der Funktion der Farnesyltransferase liefern und sollten in zukünftigen Studien Berücksichtigung finden, wenn es um die klinische Evaluation von Tumorthapeutika sowie die Prognose von Tumorerkrankungen geht.

6. Literaturverzeichnis

1. Adjei, A.A., Mauer, A., Bruzek, L., Marks, R.S., Hillman, S., Geyer, S., Hanson, L.J., Wright, J.J., Erlichman, C., Kaufmann, S.H., Vokes, E.E. (2003):
Phase II study of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in patients with advanced non-small-cell lung cancer.
J Clin Oncol. 21, 1760-1766
2. Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. (2008):
Molecular Biology of the Cell. 5. Ed.;
New York: Taylor & Francis Inc.
3. Alsina, M., Fonseca, R., Wilson, E.F., Belle, A.N., Gerbino, E., Price-Troska, T., Overton, R.M., Ahmann, G., Bruzek, L.M., Adjei, A.A., Kaufmann, S.H., Wright, J.J., Sullivan, D., Djulbegovic, B., Cantor, A.B., Greipp, P.R., Dalton, W.S., Sebt, S.M. (2004):
Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib is well tolerated, induces stabilization of disease, and inhibits farnesylation and oncogenic/tumor survival pathways in patients with advanced multiple myeloma.
Blood 103, 3271-3277
4. Andres, D.A., Milatovich, A., Ozçelik, T., Wenzlau, J.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Francke, U. (1993):
cDNA cloning of the two subunits of human CAAX farnesyltransferase and chromosomal mapping of *FNTA* and *FNTB* loci and related sequences.
Genomics 18, 105-112
5. Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H.R. (2005):
Basic principles of real-time quantitative PCR.
Expert Rev Mol Diagn. 5, 209-219
6. Ashar, H.R., James, L., Gray, K., Carr, D., Black, S., Armstrong, L., Bishop, W.R., Kirschmeier, P. (2000):
Farnesyl transferase inhibitors block the farnesylation of CENP-E and CENP-F and alter the association of CENP-E with the microtubules.
J Biol Chem. 275, 30451-30457
7. Bachmann, H.S., Otterbach, F., Callies, R., Nüchel, H., Bau, M., Schmid, K.W., Siffert, W., Kimmig, R. (2007):
The AA genotype of the regulatory *BCL2* promoter polymorphism (938C>A) is associated with a favorable outcome in lymph node negative invasive breast cancer patients.
Clin Cancer Res. 13, 5790-5797
8. Bachmann, H.S., Siffert, W., Frey, U.H. (2003):
Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique.
Pharmacogenetics. 13, 759-766

9. Bai, L., Logsdon, C., Merchant, J.L. (2002):
Regulation of epithelial cell growth by ZBP-89: potential relevance in pancreatic cancer.
Int J Gastrointest Cancer. 31, 79-88
10. Bai, L., Yoon, S.O., King, P.D., Merchant, J.L. (2004):
ZBP-89-induced apoptosis is p53-independent and requires JNK.
Cell Death Differ. 11, 663-673
11. Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J. (2005):
Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps.
Bioinformatics. 21, 263-265
12. Basso, A.D., Kirschmeier, P., Bishop, W.R. (2006):
Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors.
J Lipid Res. 47, 15-31
13. Boulton, S.J. (2006):
Cellular functions of the *BRCA* tumour-suppressor proteins.
Biochem Soc Trans. 34, 633-645
14. Caponigro, F., Casale, M., Bryce, J. (2003):
Farnesyl transferase inhibitors in clinical development.
Expert Opin Investig Drugs. 12, 943-954
15. Chakrabarti, D., Azam, T., DelVecchio, C., Qiu, L., Park, Y.I., Allen, C.M. (1998):
Protein prenyl transferase activities of *Plasmodium falciparum*.
Mol Biochem Parasitol. 94, 175-184.
16. Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J., Sebti, S.M. (2000):
Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice.
J Biol Chem. 275, 17974-17978
17. Cohen, S.J., Ho, L., Ranganathan, S., Abbruzzese, J.L., Alpaugh, R.K., Beard, M., Lewis, N.L., McLaughlin, S., Rogatko, A., Perez-Ruixo, J.J., Thistle, A.M., Verhaeghe, T., Wang, H., Weiner, L.M., Wright, J.J., Hudes, G.R., Meropol, N.J. (2003):
Phase II and pharmacodynamic study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 as initial therapy in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma.
J Clin Oncol. 21, 1301-1306
18. Costa, R.H. (2005):
FoxM1 dances with mitosis.
Nat Cell Biol. 7, 108-110
19. Cramer, P., Pesce, C.G., Baralle, F.E., Kornblihtt, A.R. (1997)
Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing
Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 11456-11460

20. Downward, J. (2003):
Targeting Ras signaling pathways in cancer therapy.
Nat Rev Cancer. 3, 11-22
21. Eastman, R.T., Buckner, F.S., Yokoyama, K., Gelb, M.H., Van Voorhis, W.C. (2006):
Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation
J Lipid Res. 47, 233-240
22. Ellis, C.A., Vos, M.D., Howell, H., Vallecorsa, T., Fults, D.W., Clark, G.J. (2002):
Rig is a novel Ras-related protein and potential neural tumor suppressor.
Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 9876-9881
23. Frey, U.H., Lümnen, G., Jäger, T., Jöckel, K.H., Schmid, K.W., Rübber, H., Müller, N., Siffert, W., Eisenhardt, A. (2006):
The *GNAS1* T393C polymorphism predicts survival in patients with clear cell renal cell carcinoma.
Clin Cancer Res. 12, 759-763
24. Girgert, R., Marini, P., Janessa, A., Bruchelt, G., Treuner, J., Schweizer, P. (1994):
Inhibition of the membrane localization of p21 ras proteins by lovastatin in tumor cells possessing a mutated N-ras gene.
Oncology. 51, 320-322
25. Girgert, R., Hohnecker, A., Wittrock, J., Schweizer, P. (1999):
Inhibition of farnesyl-protein-transferase in neuroblastoma cells by alpha-hydroxyfarnesylphosphonate.
Anticancer Res. 19, 2959-2962
26. Guo, Y., Jamison, D.C. (2005):
The distribution of SNPs in human gene regulatory regions.
BMC Genomics. 6, 140
27. Hellman, L.M., Fried, M.G. (2007):
Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions.
Nat Protoc. 2, 1849-1861
28. Höltke, H.J., Kessler, C. (1990):
Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection.
Nucleic Acids Res. 18, 5843-5851
29. Hurlin, P.J., Huang, J. (2006):
The MAX-interacting transcription factor network.
Semin Cancer Biol. 16, 265-274

30. Johnston, S.R., Hickish, T., Ellis, P., Houston, S., Kelland, L., Dowsett, M., Salter, J., Michiels, B., Perez-Ruixo, J.J., Palmer, P., Howes, A. (2003):
Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyl transferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer.
J Clin Oncol. 21, 2492-2499
31. Kirsch, D.G., Kastan, M.B. (1998):
Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis.
J Clin Oncol. 16, 3158-3168
32. Knippers, R. (2006):
Molekulare Genetik. 9. Ed.
Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
33. Kohl, N.E., Diehl, R.E., Schaber, M.D., Rands, E., Soderman, D.D., He, B., Moores, S.L., Pompliano, D.L., Ferro-Novick, S., Powers, S., Thomas, K.A., Gibbs, J.B. (1991):
Structural homology among mammalian and *Saccharomyces cerevisiae* isoprenyl-protein transferases.
J Biol Chem. 266, 18884-188888
34. Kornblihtt A.R. (2005):
Promoter usage and alternative splicing.
Curr Opin Cell Biol. 17, 262-268
35. Lancet, J.E., Gojo, I., Gotlib, J., Feldman, E.J., Greer, J., Liesveld, J.L., Bruzek, L.M., Morris, L., Park, Y., Adjei, A.A., Kaufmann, S.H., Garrett-Mayer, E., Greenberg, P.L., Wright, J.J., Karp, J.E. (2007):
A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia.
Blood. 109, 1387-1394
36. Lane, K.T., Beese, L.S. (2006):
Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I.
J Lipid Res. 47, 681-699
37. Mijimolle, N., Velasco, J., Dubus, P., Guerra, C., Weinbaum, C.A., Casey, P.J., Campuzano, V., Barbacid, M. (2005):
Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development.
Cancer Cell. 7, 313-324
38. Murre, C., Bain, G., van Dijk, M.A., Engel, I., Furnari, B.A., Massari, M.E., Matthews, J.R., Quong, M.W., Rivera, R.R., Stuiver, M.H. (1994):
Structure and function of helix-loop-helix proteins.
Biochim Biophys Acta. 1218, 129-135

39. Omer, C.A., Kral, A.M., Diehl, R.E., Prendergast, G.C., Powers, S., Allen, C.M., Gibbs, J.B., Kohl, N.E. (1993):
Characterization of recombinant human farnesyl-protein transferase: cloning, expression, farnesyl diphosphate binding, and functional homology with yeast prenyl-protein transferases.
Biochemistry. 32, 5167-5176
40. Raz, T., Nardi, V., Azam, M., Cortes, J., Daley, G.Q. (2007):
Farnesyl transferase inhibitor resistance probed by target mutagenesis.
Blood. 110, 2102-2109
41. Rosemeyer, V., Laubrock, A., Seibl, R. (1995):
Nonradioactive 3'end-labelling of RNA molecules of different lengths by terminal deoxynucleotidyltransferase
Anal Biochem. 224, 446-449
42. Sadler, T.W. (2003):
Medizinische Embryologie. 10. Ed.
Stuttgart: Georg Thieme Verlag; s. bes. S. 43 – 50
43. Sambrook, J., Russel, D. (2000):
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. Ed.
New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. Sandelin, A., Wasserman, W.W., Lenhard, B. (2004):
ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison.
Nucleic Acids Res. 32 (Web Server issue), W249-W252
45. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977):
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 74, 5463-5467
46. Sebti, S.M., Der, C.J. (2003):
Opinion: Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors.
Nat Rev Cancer. 3, 945-951
47. Sebti, S.M. (2005):
Protein farnesylation: Implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy.
Cancer Cell 7, 297-300
48. Sepp-Lorenzino, L., Ma, Z., Rands, E., Kohl, N.E., Gibbs, J.B., Oliff, A., Rosen, N. (1995):
A peptidomimetic inhibitor of farnesyl:protein transferase blocks the anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cell lines.
Cancer Res. 55, 5302-5309
49. Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2005):
Unraveling the mechanism of the farnesyltransferase enzyme.
J Biol Inorg Chem. 10, 3-10

50. Stinger, C. (2002):
Modern human origins: progress and prospects.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 357, 563-579
51. Sun, J., Qian, Y., Hamilton, A.D., Sebt, S.M. (1998):
Both farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors are required for inhibition of oncogenic K-Ras prenylation but each alone is sufficient to suppress human tumor growth in nude mouse xenografts.
Oncogene. 16, 1467-1473
52. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002):
Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.
Genome Biol. 3, RESEARCH0034
53. Viani, G.A., Afonso, S.L., Stefano, E.J., De Fendi, L.I., Soares, F.V. (2007):
Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials.
BMC Cancer. 7, 153
54. Yang, S.H., Meta, M., Qiao, X., Frost, D., Bauch, J., Coffinier, C., Majumdar, S., Bergo, M.O., Young, S.G., Fong, L.G. (2006):
A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation.
J Clin Invest. 116, 2115-2121
55. Zuk, P.A., Elferink, L.A. (2000):
Rab15 differentially regulates early endocytic trafficking.
J Biol Chem. 275, 26754-26764

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	Analysis of Variance between Groups
BRCA	Breast Cancer (Brustkrebs)
C	Cytosin
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CENP	Centromer-Protein
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
E. coli	Escherischia coli
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal-growth-factor-receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FNTA	Farnesyltransferase-Alpha
FNTB	Farnesyltransferase-Beta
FPP	Farnesylpyrophosphat
FT	Farnesyltransferase
FTase	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferaseinhibitor
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GF	Growthfactor (Wachstumsfaktor)
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GTP	Guanosintriphosphat
Her2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2

HDJ	humanes DNA-J Homolog
HEK	Human Embryonic Kidney
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HR	Hazard-Ratio
Hsp	Hitzeschockprotein
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
MAX	Myc associated factor X
MCS	Multiple Cloning Site
Mg ²⁺	Magnesium
Mn ²⁺	Mangan
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
Pfu	Pyrococcus furiosus
PP	Pyrophosphat
PPi	Pyrophosphat
PRL	Phosphatase of Regenerating Liver
Rheb	Ras-homolog enriched in brain
Rho	Ras-homolog
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RND	Rho-related GTP-binding protein
RT-PCR	Realtime Polymerase Chain-Reaction (Echtzeit-PCR)
SD	Standardabweichung
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelbasen-Polymorphismus)
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.