

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pharmakogenetik

Promotor-Polymorphismen und Transkriptvarianten des *FNTB*-Genlokus und ihre
potentielle Bedeutung beim Prostatakarzinom

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Isabel Virchow
aus Essen
2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer

1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. H. S. Bachmann

2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Gellhaus

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2016

Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden bereits publiziert oder auf Kongressen vorgestellt:

1. Virchow I., Lazik A., Bau M., Schmid K.W., Siffert W., Bachmann H.S. (2014)
Polymorphisms in the FNTB promoter influence survival in different neoplasias
Jahrestagung der DGHO, OeGHO, SGMO und SGH, Hamburg, Abstract P850
2. Virchow I, Schmid K.W., Rübber H., Heukamp L.C., Siffert W., Bachmann H.S.
(2015)
FNTB promoter polymorphisms influence survival in prostate cancer
Jahrestagung der DGHO, OeGHO, SGMO und SGH, Basel, Abstract P259

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Proteinsynthese.....	6
1.2 Prenylierung als posttranslationale Modifikation.....	7
1.3 Die Enzyme Farnesyltransferase und Geranylgeranyltransferase.....	7
1.4 Zielproteine der Farnesyl- und Geranylgeranyltransferase.....	9
1.5 Bedeutung der Farnesyltransferase bei Tumorerkrankungen.....	10
1.6 Klinische Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren.....	11
1.7 Der <i>FNTB</i> -Genlocus.....	13
1.8 Einzelnukleotid Polymorphismen „Single nucleotide polymorphisms“.....	13
1.9 Alternative Transkripte „alternative splicing“.....	14
1.10 Pharmakogenetische Aspekte.....	15
1.11 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte.....	17
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	18
2.1.3 Medien.....	18
2.1.4 Biologisches Material.....	19
2.1.5 PCR – Primer.....	22
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	24
2.2.2 Arbeiten mit DNA.....	28
2.2.3 Pyrosequenzierung.....	30
2.2.4 Restriktionsverdau.....	31
2.2.5 Zellkultur.....	32
2.2.6 Zellkernextraktion.....	32
2.2.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)/ Infrared Electrophoretic Mobility Shift Assay (IR-EMSA).....	33
2.2.8 Klonierung.....	34
2.2.9 Reporter Assay.....	36

2.2.10 Arbeiten mit RNA und cDNA.....	37
2.2.11 Quantitative Echtzeit-PCR - „Real-Time PCR“.....	38
2.2.12 Statistische Methoden.....	39
3. Ergebnisse.....	42
3.1 Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren.....	42
3.2 Einfluss der Genotypen auf die Promotoraktivität.....	46
3.3 Verteilung der Polymorphismen FNTB -609, -179 und -173 beim Prostatakarzinom.....	49
3.4 Bedeutung und Auswirkung der Polymorphismen FNTB -609, -179 und -173 beim Prostatakarzinom.....	51
3.5 Expression alternativer Transkripte des FNTB-Gens in verschiedenen Geweben....	64
3.6 Relative Quantifizierung der gewebespezifischen Expression der verschiedenen Transkriptvarianten des FNTB-Gens.....	66
3.7 Explorative Analyse des Einflusses der Polymorphismen FNTB-173 und FNTB-609 auf die Expression alternativer Transkriptvarianten des FNTB-Gens beim Prostatakarzinom.....	67
4. Diskussion.....	69
4.1. Funktionelle Bedeutung der SNPs innerhalb des Promotors des FNTB-Gens.....	70
4.2. Prognostische Bedeutung der SNPs innerhalb des Promotors des FNTB-Gens.....	71
4.3. Bedeutung der Expression alternativer Transkripte des FNTB-Gens.....	73
4.4. Interpretation der Ergebnisse mit Bezug auf klinische Studien.....	74
4.5. Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis	74
4.6. Ausblick.....	76
5. Zusammenfassung.....	78
6. Literaturverzeichnis.....	79
7. Abkürzungsverzeichnis.....	92
8. Danksagung.....	95
9. Lebenslauf.....	96

1. Einleitung

1.1 Proteinsynthese

Proteine sind aus Aminosäuren aufgebaut. Durch Peptidbindungen zu Ketten verbunden, entstehen diese biologischen Makromoleküle, die in allen Zellen diverse Funktionen, wie z.B. die Katalyse, den Transport von intrazellulären Molekülen, die intrazelluläre Signaltransduktion oder als Strukturelement erfüllen. Erste Erwähnung fanden diese Bausteine des Lebens 1839 durch Gerardus Johannes Mulder. (*Journal für praktische Chemie* 16, 129 (1839) [as translated and excerpted in Mikulás Teich, *A Documentary History of Biochemistry, 1770-1940* (Rutherford, NJ: Fairleigh Dickinson University Press, 1992)]). Die Reihenfolge der Aminosäuren eines Proteins ist genetisch festgelegt. Auf chromosomaler Ebene wird durch die Abfolge der vier Nukleinbasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) zunächst die Reihenfolge der Aminosäuren kodiert. Je drei dieser Basen ergeben das so genannte Codon, dieses kodiert genau für eine Aminosäure. Die Gesamtheit der codierenden Codons, sowie die entsprechenden regulatorischen Abschnitte und die Introns werden als Gen bezeichnet. Bis zur korrekten Synthese eines Proteins aus den im Gen kodierten Informationen sind folgende Schritte erforderlich: Initial erfolgt die Transkription, hierbei wird Desoxyribonukleinsäure (DNA) in Ribonukleinsäure (RNA) umgeschrieben. Dieser Schritt wird durch den so genannten Promotor reguliert, einem bestimmten Abschnitt auf dem abzulesenden Gen, welcher dessen Aktivität reguliert. Der Promotor ist vor den kodierenden Sequenzen lokalisiert und interagiert mit DNA-bindenden Proteinen, welche als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Sie können fördernden, aber auch hemmenden Einfluss auf die Transkription haben (Knippers R, 2006). Nach erfolgter Transkription besteht die synthetisierte RNA aus *expressed sequences* oder Exons durchsetzt mit *intervening sequences* oder Introns, wobei nur die Exons proteinkodierend sind. Die Introns hingegen werden durch das sogenannte „RNA splicing“ in variabler Weise herausgeschnitten, wodurch es in etwa 60% der eukaryotischen Gene zur Produktion verschiedener Proteine aus ein und demselben Gen kommen kann. Die letztlich verbleibenden Exons werden zur mRNA zusammengesetzt (Alberts B et al., 2008). Im letzten Schritt erfolgt die Translation, die Übersetzung der

mRNA-Sequenz in die Aminosäure-Sequenz. Durch die Reihenfolge der Codons ist determiniert, in welcher Abfolge die Aminosäuren kovalent miteinander verbunden werden. Initiator ist grundsätzlich das Codon mit der Abfolge Adenin – Thymin – Guanin (ATG), es kodiert zum einen für die Aminosäure Methionin und ist zugleich auch immer Startpunkt der Translation. Tritt eines der Nukleinsäuretriplets TAG, TAA und TGA in der mRNA-Sequenz auf, die als Stopp-Codons bezeichnet werden, wird die Translation beendet.

1.2. Prenylierung als posttranslationale Modifikation

Der Terminus posttranslationale Modifikation steht für essentielle, chemische Veränderungen, die ein Protein unterlaufen muss, um seine endgültige Funktionalität zu erwerben. Hierzu gehören zum Beispiel Modifikationen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung. Diese Reaktionen beeinflussen die Proteinfaltung, die Bildung von Komplexen aus mehreren Untereinheiten sowie den Proteintransport und –abbau (Alberts B et al., 2008). Auch die Prenylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, die durch eine kovalente Bindung spezieller Lipide, Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Isoprenoide, an ein Protein, erfolgt. Durch diesen Vorgang wird einem Protein ohne eigene Membrandomäne die Interaktion mit Zellmembranen möglich. Diese für eine korrekte Funktion essentielle Modifikation konnte bereits bei über 100 Proteinen nachgewiesen werden (Lane KT, 2006). Viele dieser Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der zellulären Signaltransduktion.

1.3. Die Enzyme Farnesyltransferase und Geranylgeranyltransferase

Bisher konnten drei essentielle Enzyme identifiziert werden, die bei der Prenylierung eine wichtige Rolle spielen und welche in zwei funktionelle Klassen unterteilt werden können. Die Farnesyltransferase (FTase) und die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) bilden die Klasse der CAAX-Prenyltransferasen, die Geranylgeranyltransferase-II (GGTase-II) stellte eine zweite eigenständige Klasse dar (Tabelle 1). FTase und GGTase-I, zeichnen sich durch das C-terminale Erkennungsmotiv der CAAX-Box aus. Hierbei steht C für die Aminosäure Cystein, A für eine aliphatische Aminosäure und die endständige Aminosäure X ist entweder Serin, Methionin, Alanin oder Glutamin. Unter diesen Bedingungen kann eine Thioether-Bindung zwischen dem C-1 des Farnesyls

oder Geranylgeranyle und der SH-Gruppe eines Cysteins innerhalb des zu modifizierenden Proteins katalysiert werden. Beide Enzyme führen also zu einer Prenylierung am Cysteinrest des C-terminalen Endes eines Proteins. Diese Modifikation verschafft dem Protein lipophile Eigenschaften, so dass es in Zellmembranen integriert werden kann (Sebti SM, 2005). Die beiden CAAX-Prenyltransferasen teilen sich eine gemeinsame α -Untereinheit, unterscheiden sich jedoch in ihrer jeweiligen β -Untereinheit. Die β -Untereinheit der FTase ist 46 kDa groß, sie besteht aus 14 α -Helices, welche eine Faserstruktur bilden und die enzymatisch aktive Region beinhalten. Die β -Untereinheit ist einerseits für die Bindung des Farnesyldiphosphats (Abbildung 1) und andererseits für die Bindung der zu modifizierenden Proteine verantwortlich (Lane KT, 2006).

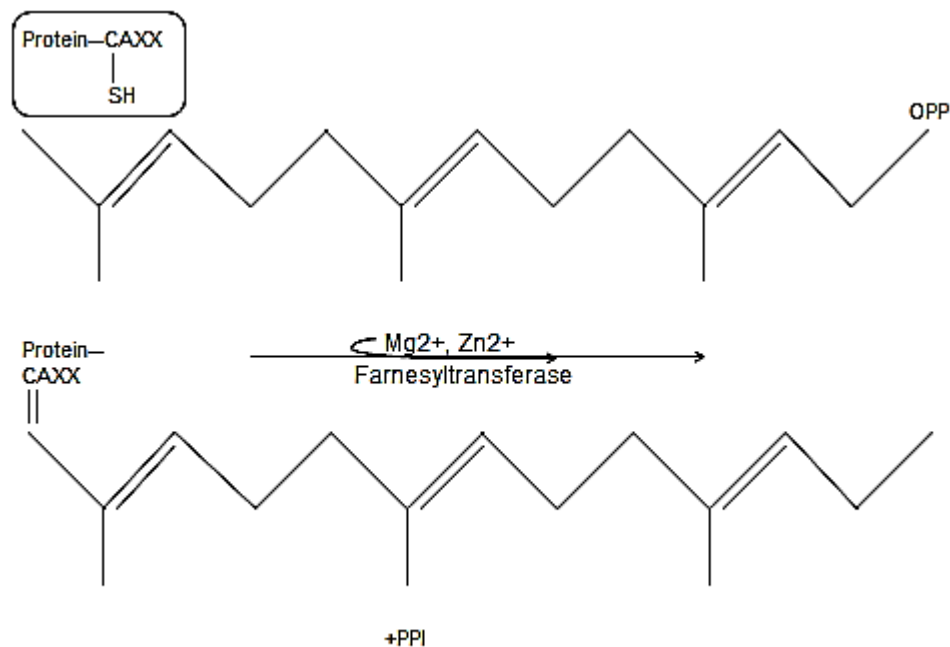


Abbildung 1: Reaktion der Farnesyltransferase

(Die Farnesyltransferase katalysiert die kovalente Bindung einer Farnesylgruppe an ein CAAX-Box Protein. OPP: Pyrophosphatgruppe, PPI: anorganisches Pyrophosphat, SH: Thiolgruppe, Mg²⁺: Magnesium, Zn²⁺: Zink)

Die β -Untereinheit der GGTase-I hat eine vergleichbare Funktion, sie katalysiert jedoch den Transfer einer Geranylgeranylgruppe auf ein Protein. Die GGTase II katalysiert ebenfalls den Transfer von Geranylgeranylresten von einem Geranylgeranylpyrophosphat, wobei jedoch die Bindung an zwei Cysteinresten insbesondere an sogenannte RAB-Proteinen mit spezifischen Erkennungsmotiven,

nämlich: -XXCC, -XCXC oder -CCXX am C-terminalen Ende des Proteins erfolgt. Zu diesen RAB-Proteinen zählen z.B. Rab1A, Rab3A und Rab5A (Farnsworth et al., 1994).

Tabelle 1: Überblick über die drei Schlüsselenzyme der Prenylierung

	Kodierendes Gen der α -Untereinheit	Kodierendes Gen der β -Untereinheit	Erkennungsmotif
Farnesyltransferase = FT	<i>FNTA</i>	<i>FNTB</i>	CAAX
Geranylgeranyltransferase I = GGT1	<i>FNTA</i>	<i>PGGT1B</i>	CAAX
Geranylgeranyltransferase II = GGT2/Rab GGT	<i>RABGGTA</i>	<i>RABGGTB</i>	XXCC, XCXC oder CCXX

Die prominentesten Substrate der FTase sind die sogenannten RAS-Proteine, die eine Schlüsselrolle in der intrazellulären Signaltransduktion spielen. Zudem sind sie als potentielle Onkogene an der Tumorgenese und –progression beteiligt (Bos JL, 1989). Sie sind sowohl im Rahmen ihrer physiologischen Funktion als auch bei der Onkogenese spezifisch entweder auf Farnesylierung oder Geranylierung angewiesen (Cox AD et al., 1992). Zwischenzeitlich konnten diverse andere, an der Onkogenese beteiligte Proteine identifiziert werden, die ebenfalls der Farnesylierung unterliegen.

1.4. Zielproteine der Farnesyl- und Geranylgeranyltransferase

Durch die FTase modifizierte Proteine sind vor allem die Signalproteine H-, N- und KRAS, 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 FTase ist essentiell für die embryonale Entwicklung. FTase-defiziente Maus-Embryonen 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. Es kommt zu vermehrtem programmierten Zelltod und dem Absterben des Embryos spätestens im Stadium E11.5 (Sadler TW, 2003). Postnatal ist der Verlust der FTase hingegen nicht letal; *in-vivo* Versuche an sogenannten „Knock-out“- Mäusen mit

postnatal defizienter FTase, zeigten eine nur um maximal 30% verzögerte, allerdings komplette Wundheilung sowie geringgradige Reifungsdefekte erythroider Vorläuferzellen (Mijimolle N et al., 2005). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass viele Proteine alternativ durch die GGTase I prenyliert werden können.

1.5. Bedeutung der Farnesyltransferase bei Tumorerkrankungen

Bei ungefähr 30% aller Tumorerkrankungen sind somatische *RAS*-Mutationen nachweisbar (Sousa SF et al., 2005). Zusätzlich konnten in multiplen Tumoren (Tabelle 2) Mutationen oder Amplifikationen von Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B. *EGFR* oder *ERBB2 (HER2/NEU)* nachgewiesen werden, die zu einer konstitutiven Aktivierung von *RAS*-Proteinen führen. (Downward J, 2003). Die FTase scheint bei der Genese *KRAS* mutierter Tumore nicht beteiligt zu sein, jedoch einen Einfluss auf die Tumorprogression, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte, zu haben (Mijimolle N et al., 2005).

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

Tumorentität	alteriertes Gen	Mutationshäufigkeit
Pankreaskarzinom	<i>KRAS</i>	90 %
Kolonkarzinom	<i>KRAS und NRAS</i>	50%
NSCLC	<i>KRAS</i>	35%
Seminom	<i>KRAS und NRAS</i>	45%
Melanom	<i>NRAS</i>	15%
Harnblasenkarzinom	<i>HRAS</i>	10%
Akute myeloische Leukämie (AML)	<i>NRAS</i>	30%
Myelodysplastische Syndrome	<i>NRAS und KRAS</i>	40%
Mamma-Karzinom	<i>ERBB2/HER2/NEU</i>	30%
Diverse Karzinome	<i>EGFR</i>	50%

Die Farnesylierung der *RAS*-Proteine ist für die Interaktion mit Zellmembranen essentiell. Konsekutiv können so intrazelluläre Signalwege durch die Rekrutierung weiterer Proteine an die Zellmembran aktiviert werden (Abbildung 2).

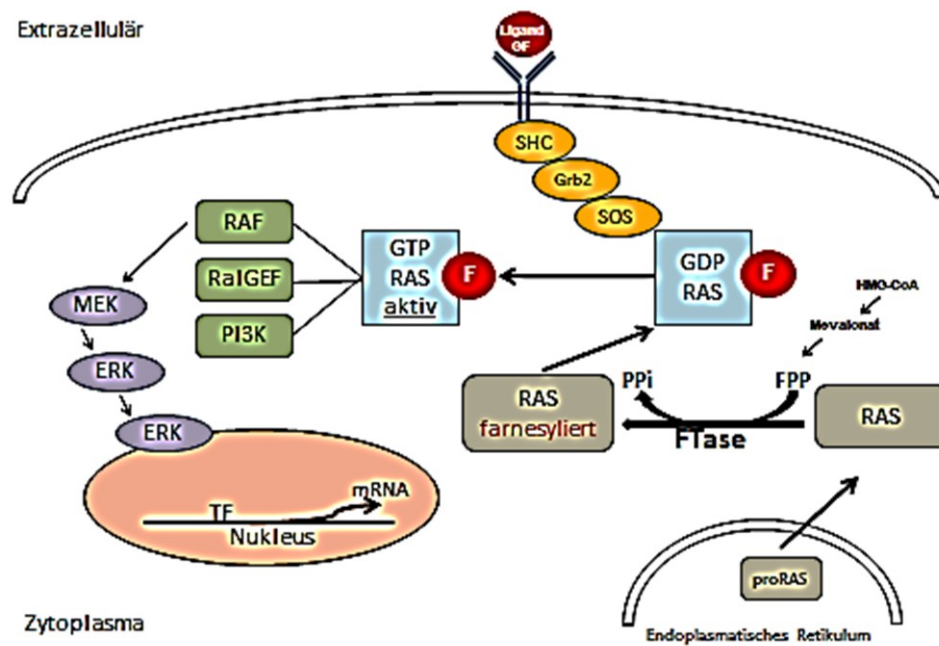


Abbildung 2: Schema der intrazellulären Signaltransduktion.

Wachstumsfaktor (GF)- Signale werden über SHC, GRB2 und SOS an RAS weitergeleitet. Nach Farnesylierung interagiert RAS mit der Zellmembran. Wichtige Effektormoleküle von RAS sind vor allem die Kinase RAF I (RAF), welche die Transkription im Zellkern durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beeinflusst, die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor der GTPase Ral (RalGEF), sie beeinflussen Zellwachstum und Apoptose.

1.6. Klinische Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren

Die Entwicklung von Farnesyltransferaseinhibitoren (FTIs) beruht auf der Idee die Interaktion von RAS-Proteinen mit der Zellmembran zu unterbinden und damit die intrazelluläre Signaltransduktion zu inhibieren. Es ist jedoch von einem durchaus komplexeren Wirkspektrum dieser Substanzen auszugehen (Caponigro F et al., 2003). Initiale Versuche die Farnesylierung von Signalproteinen zu blockieren wurden mit dem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin durchgeführt (Girgert et al., 1994). Aufgrund der geringen Spezifität dieses Lipidsenkens kam es vor allem zu unerwünschten Nebenwirkungen durch die Beeinflussung der Cholesterinbiosynthese. In der Folge wurde Hydroxyfarnesylpyrophosphat, ein Farnesylpyrophosphatanalogon entwickelt und *in vitro* getestet. Es blockiert die Übertragung eines Farnesylrestes auf sein Substrat (Girgert R et al., 1999). Präklinische Studien an transgenen Mäusen mit *HRAS*-Mutationen, die zur Entwicklung von Mamma- und Speicheldrüsentumoren führten, zeigten sowohl makro- als auch mikroskopisch ein deutliches Ansprechen auf den FTI L-744832; zu relevanten Nebenwirkungen kam es nicht (Kohl NE et al., 1995).

In der klinischen Prüfung von FTIs ergaben sich jedoch stark divergente Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit: In einer Phase-II-Studie konnte demonstriert werden, dass Patientinnen mit fortgeschrittenem Mamma-Karzinom von einer Behandlung mit dem FTI, R115777 profitierten, obwohl nur wenige Mammatumoren *RAS*-Mutationen aufweisen (Johnston SR et al., 2003). In hämatologischen Tumoren konnten darüber hinaus vielversprechende Ergebnisse unter der Behandlung mit FTIs erzielt werden. Ältere Patienten (> 75 Jahren), die an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) erkrankt waren und aufgrund ihres Allgemeinzustandes nicht mit einer konventionellen Chemotherapie behandelt werden konnten, profitierten von einer Erstlinienbehandlung mit dem FTI Tipifarnib. Insgesamt zeigte sich in dieser Phase II Studie eine Ansprechrate von 24%, darunter 14% komplette Remissionen (CR) (Lancet JE et al., 2007). Eine weitere Phase-II-Studie beim fortgeschrittenem multiplem Myelom zeigte Ansprechraten von 64% unter der Behandlung mit Tipifarnib bei zuvor therapierefraktären Patienten (Alsina M et al., 2004). Hingegen kam es in anderen Studien zu eher ernüchternden Ergebnissen. Die Anwendung eines FTI als Erstlinientherapie beim metastasierten Pankreaskarzinom, einem Tumor mit hoher *KRAS*-Mutationsrate, blieb ohne antitumoralen Effekt, obwohl in peripheren mononukleären Zellen eine Blockade der Farnesylierung nachweisbar war (Cohen SJ et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Monotherapiestudie in der Erstlinie bei Patienten mit fortgeschrittenem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), obwohl diese ebenfalls häufig eine *KRAS*-Mutation aufweisen (Adjei et al., 2003). Keines der geprüften Medikamente ist bisher zugelassen. Dennoch bleibt die Farnesyltransferaseinhibition, trotz der negativen Ergebnisse klinischer Studien, auch unter Addition der Blockade des alternativen Geranylierungsweges, im Fokus des wissenschaftlichen Interesses im Hinblick auf zielgerichtete Therapien wie z.B. im Prostatakarzinom (Virtanen, SS et al., 2010). Offenbar ist der Erfolg oder Misserfolg einer FTI-Therapie weder anhand des *RAS*-Mutationsstatus, noch anhand des Grads der Farnesyltransferasehemmung oder alternativer Geranylierung zu prädictieren. Für Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) ist der sogenannte „2-gene classifizier“ als prädictiver Marker für das Ansprechen auf eine Behandlung mit dem FTI Tipifarnib beschrieben worden, wobei das Verhältnis der Expression der 2 Gene *RASGRP1/APTX* gemessen wird. Dieses Verfahren ist jedoch bisher nur für Patienten

mit einer AML gezeigt worden (Raponi M et al., 2008). Aktuell existieren für Patienten mit anderen hämatologischen oder soliden Neoplasien keine validen prädiktiven Biomarker, um Patienten zu identifizieren, die von einer FTI-Therapie profitieren könnten.

1.7. Der *FNTB* Genlocus

Das Gen *FNTB* kodiert für die β -Untereinheit der FTase. Es ist auf dem langen Arm des Chromosom 14 an der Position q23-q24 (Andres DA et al., 1993) lokalisiert (Gene bank accession number NM_002028). Es besteht aus 12 Exons sowie einem vorgeschalteten Promotor. Das ATG liegt im Exon 1 an Position 166. Definitionsgemäß wird diese Position im Gen als „+1“ bezeichnet. Oligonukleotide und Polymorphismen, die weiter in Richtung des 5'-Endes des Gens lokalisiert sind werden negativ gezählt. Genlokalisierungen weiter in Richtung des 3'-Endes werden positiv gezählt.

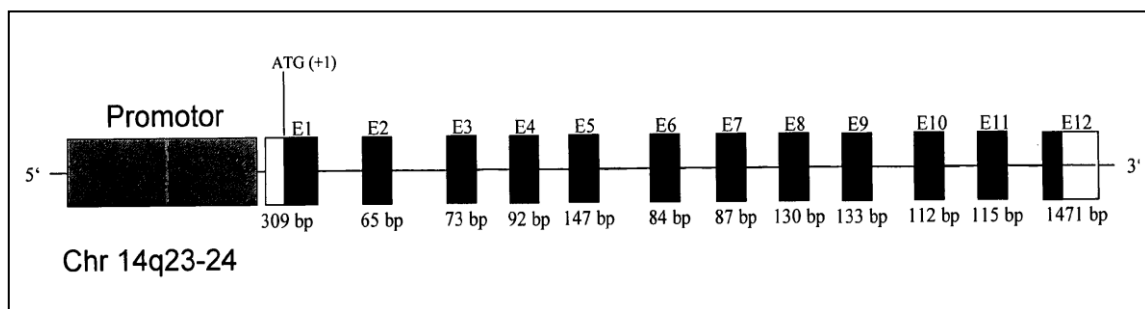


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *FNTB* Genstruktur

Das *PGGT1B* Gen ist auf dem Chromosom 5q22.3 lokalisiert und kodiert für die 43-kD große β -Untereinheit der GGase I.

1.8. Einzelnukleotid Polymorphismen „Single nucleotide polymorphisms“

Mit dem Terminus SNP für „single nucleotide polymorphism“ oder Einzelnukleotid Polymorphismus werden Basenvariationen bezeichnet, die ein einzelnes Nucleinbasenpaar innerhalb des DNA-Stranges betreffen und mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in einer Population auftreten (Brookes, A.J., 1999). Solche Veränderungen können potentiell in allen Abschnitten des Genoms auftreten, es kann sich dabei um den Austausch einzelner Basen handeln, oder um die Deletion bzw. Insertion eines Basenpaares. SNPs können also in kodierenden Sequenzen, den Exons, in letzter Konsequenz zu einem Aminosäureaustausch führen, wenn dadurch ein Codon

verändert wird. Dies wird als cSNP (codingSNP) bezeichnet. Verändert sich die Kodierung des Basentriplets durch den SNP nicht, spricht man von einem synonymen SNP. SNPs in regulatorischen Genregionen wie der Promotorregion können Einfluss auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren und somit die Proteinexpression nehmen. Diese werden rSNP (regulatorySNP) genannt. Durch einen so genannten srSNP (structuralRNASNP) kann die RNA Prozessierung gestört werden, wenn es zu einer Basenänderung an einer Spleißstelle kommt und dadurch mRNA generiert wird, die für ein funktionsloses Protein kodiert. Folglich kann ein SNP auf diversen Wegen funktionelle Veränderungen und evolutionäre Variabilität hervorrufen. Im menschlichen Genom sind über 35.000 SNPs in genregulierenden Regionen identifiziert worden. Insbesondere nahe des Translationsstarts finden sich gehäuft SNPs (Guo Y, Jamison DC, 2005).

1.9. Alternatives Spleißen „alternative splicing“

Spleißen bzw. "Splicing" beschreibt die cotranskriptionelle Prozessierung der Ribonukleinsäure, wobei intranukleär aus prä-mRNA reife mRNA entsteht. Während der Transkription gebildete prä-mRNA enthält noch Introns und Exons. Kommen Splicesosome zum Einsatz werden nicht kodierende Introns entfernt und die angrenzenden, kodierenden Exons zur reifen mRNA zusammengefügt. Durch alternatives prä-mRNA Spleißen können aus einer einzigen DNA-Vorlage multiple mRNA's entstehen, die zu einer hohen Variabilität von Proteinen führen, was somit einen zentralen Vorgang der genetischen Regulation in Eukaryoten darstellt. Typischerweise enthält die mRNA multiple Exone, wobei der Vorgang des Spleißens durch verschiedene Abläufe verändert werden kann. So werden u.a. Exons heraus geschnitten oder Introns alternativ rearrangiert. Alternative Promotoren spielen vor allem eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle, indem die 5'- terminalen Exons ausgetauscht werden. Formen des alternativen Spleißens sind in Abbildung 4 exemplarisch dargestellt (Black DL, 2003).

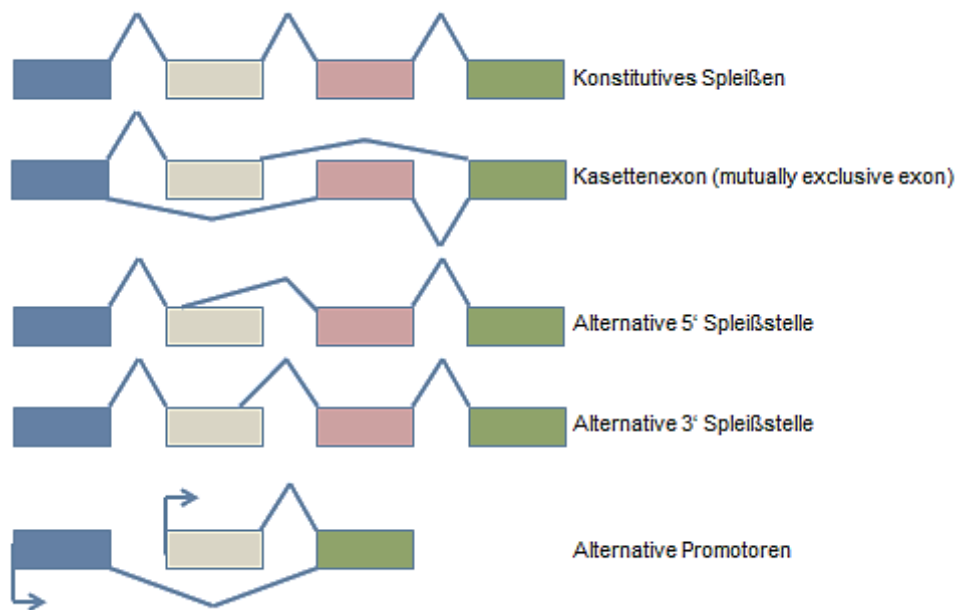


Abbildung 4: Schematische Darstellung möglicher Formen alternativen Spleißens

1.10. Pharmakogenetische Aspekte

In klinischen Anwendungsstudien mit FTIs zeigten sich inkohärente Ergebnisse bezüglich Therapieansprechen oder -versagen, so dass sich die Frage nach der Ursache dieser Ergebnisse stellt. Als Erklärung hierfür kommt zum einen die zum Teil bisher nicht vollständig aufgeklärten Zielstrukturen der Farnesylierung bzw. ihre Inhibition in Frage, zum anderen die humane, genetische Heterogenität. Es ist anzunehmen, dass alternatives Spleißen oder Polymorphismen des Farnesyltransferasegens die Tumorgenese aber auch die Wirksamkeit von Inhibitoren beeinflussen. Polymorphismenabhängige Medikamentenresistenzen bzw. -sensitivitäten konnten beispielweise beim Mammakarzinom gezeigt werden (Imai Y et al., 2002). Alternatives Spleißen als Ursache für die Tumorentstehung oder -progression, insbesondere auch von Onkogenen rückt mehr und mehr in den Fokus bei der Karzinogenese (Druillenec S et al., 2012) oder Resistenzentwicklung gegenüber zielgerichteten Therapien. So entsteht z.B. durch eine C>G Mutation an Position 1106 des *BCR-ABL*-Gens bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) die sogenannte *BCR-ABL* Variante L248V. Durch alternatives Spleißen einer kürzeren Variante durch eine zusätzliche splice site im Exon 4 entsteht so eine Variante des *BCR-ABL*-Gens, die mit einer erworbenen Resistenz gegenüber Imatinib assoziiert ist (Gruber FX et al., 2006).

Auch Untersuchungen zu den Auswirkungen von Mutationen in den kodierenden Sequenzen von *FNTB* wurden bereits durchgeführt (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. Untersuchungen zum regulierenden Bereich des *FNTB*-Gens oder aber alternative Splicevarianten des *FNTB*-Gens als potentielle Einflussgrößen sind bisher nicht umfassend durchgeführt worden, könnten jedoch als Erklärungsansatz für die divergenten Ergebnisse bisheriger klinischer Studien mit FTIs von außerordentlichem Interesse sein.

1.11. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es potentielle, molekulargenetisch ursächliche Mechanismen zu identifizieren, die möglicherweise zur Erklärung der divergenten klinischen Studienergebnisse mit FTIs beitragen. Gegenstand der Untersuchungen war zum einen die molekulargenetische Analyse der Promotorregion des für die Beta-Untereinheit der FTase kodierenden Gens *FNTB*. Hierzu wurden zunächst drei im Promotor des *FNTB*-Gens lokalisierte Polymorphismen strukturell und funktionell auf deren Bindungsverhalten und Aktivität hin analysiert. Anschließend wurde die Prävalenz der Polymorphismen in zwei unabhängigen Patientenkollektiven mit Prostatakarzinom bestimmt und mit klinisch-pathologischen Parametern und dem Überleben korreliert, um deren prognostische Wertigkeit zu untersuchen. Zum anderen erfolgten zur Identifizierung und Quantifizierung alternativer Transkriptvarianten des *FNTB*-Gens molekulargenetische Analysen verschiedener Tumorzelllinien mit anschließender Validierung in humanen Leukozyten gesunder Spender und an urogenitalen Tumorgewebe. Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Polymorphismen in der *FNTB*-Promotorregion einen Einfluss auf die Expressionsstärke des *FNTB*-Gens bzw. der unterschiedlichen Spleißvarianten ausüben, wurde abschließend in einem ausgewählten Prostatakarzinomkollektiv die relative Expression der alternativen Transkripte mit den Promotorpolymorphismen korreliert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

- Analysenwaage Satorius
- Autoklav Fedegari
- Blottkammer BioRad
- Brutschränke Cellstar, Queue, Memmert
- Feinwaage Denver Instrument
- Gelelektrophoresekammern Eigenbau
- Geldokumentation Intas
- Grobwaage Satorius
- Heizblöcke HLC
- Inkubationsschüttler New Brunswick Scientific
- Laufkammer Hoefer
- Luminometer Berthold
- Magnetrührer Heidolph
- Mikroskop Nikon
- Mikrowelle Lunik
- Netzgeräte LKB, Pharmacia
- Odyssey imaging systems Li-COR Bioscience,
Lincoln, NE, USA
- Pipetten Labsystems, Finnpiquette
(0.5-10, 5-40, 20-200, 200-1000)
- pH-Meter Metrohm
- Plattenluminometer Berthold
- Pyrosequenzierer Biotage
- Real Time PCR System Applied Biosystems
- Schüttler Janke + Kunkel
- Spektrophotometer Peqlab
- Sterilbank MDH, Heraeus
- Thermocycler Biometra

- Thermomixer Eppendorf
- Thermo Sealer Thermo Scientific
- Ultra-Turrax Janke + Kunkel
- UV-Crosslinker Stratagene
- Vortex Gerät Heidolph, Oehmen
- Wasserbad Julabo, Köttermann
- Zellzähler Schärfe
- Zentrifugen Megafuge 1.0R; (Heraeus)
Omnifuge 2.0 RS (Heraeus)
Biofuge pico A/13 (Heraeus)
Biofuge pico A/13 (Heraeus)
Centrifuge 5417C (Eppendorf)

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Boehringer, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Enzyme

Die eingesetzten Enzyme stammten von den Firmen New England Biolabs und MBI-Fermentas.

PCR-Primer

Sämtliche verwendeten Primer stammten von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg).

2.1.3. Medien

Die Medien für verwendete Zelllinien wurden von den Firmen PAA Laboratories und Cascade Biologics (Invitrogen) bezogen und insofern nicht anders angegeben auf ein Endvolumen von 1 Liter mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert.

Medium für PC3 Zellen und DU 145 Zellen

DMEM (500 ml)

+ 0,1 ml/ml Fötale Kälberserum

+ 100 U/ml Penicillin

+ 100 µl/ml Streptomycin

Medium für LNCaP Zellen und für HeLa Zellen

RPMI -1640 (500 ml)

+ 0,1 ml/ml Fötale Kälberserum

+ 100 U/ml Penicillin

+ 100 µl/ml Streptomycin

+ 1.0 mM Natriumpyruvat

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 Dampfsterilisation erfolgt für 20 min bei 120°C und 1,4 bar im Autoklaven.

Bakterienmedium fest

Zur Herstellung eines Festmediums für Bakterien wird dem flüssigen Bakterienmedium vor dem Autoklavieren 15g Agar-Agar zugegeben und nach Abkühlung auf 60°C mit 500ng/ml Ampicillin versetzt.

Bakterienmedium zur Selektion

Zu späterem Selektionszweck wird das flüssige Bakterienmedium nach Autoklavierung und Abkühlung auf 60°C mit 40 mg/ml Xgal und 500ng/ml Ampicillin versetzt.

2.1.4. Biologisches Material

2.1.4.1 DNA zur Untersuchung der Verteilung der SNPs *FNTB* -609 G>C, *FNTB* -179 T>A sowie *FNTB* -173 6G>5G in Prostatatumorkollektiven

Die DNA stammte von 130 Prostatakarzinom-Patienten aus einem für frühere Studien in 1) Essen aquiriertem Kollektiv, sowie 2) aus einem Kollektiv von 122 Prostatakarzinom-Patienten, welches in Bonn aquiriert wurde.

2.1.4.2 cDNA zum Nachweis der potentiellen Spleißvarianten TK 10-1, TK 12-1 und TK 12-2 im *FNTB* Gen

Sämtliche verwendete RNA wurde mit DNase behandelt und anschließend mit Superscript II RNase H Reverse Transcriptase der Firma Invitrogen nach Protokoll in cDNA umgeschrieben.

Gesunde Kaukasier: Die RNA stammt aus mit dem RNA Blood Kit der Firma Qiagen behandeltem Blut eines gesunden Probanden.

RNA aus Zelllinien (vergleiche 2.1.4.3): Sämtliche verwendete RNA stammt aus nach Protokoll (RNeasy Kit, Quiagen) hergestellten Zellkernextrakten dieser Zelllinien.

2.1.4.3 Zelllinien

Die Zellen stammten von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) sowie von der Firma Cascade Biologics (Invitrogen).

HEK 293 Zellen: HEK 293 Zellen sind humane embryonale Nierenzellen. Erstmals beschrieben wurden diese Zellen in einer menschlichen mit Adenovirus Typ 5 transformierten Urniere (Bernards et al., 1986). Morphologisch stellen sich HEK 293 Zellen als große, epitheliale Zellen dar, die adhären in Monolayern wachsen.

HeLa: HeLa Zellen sind plattenepitheloide Zervixkarzinomzellen die seit 1953 breite Verwendung in der Grundlagenforschung finden (Scherer et al., 1953).

PC3: PC3 Zellen sind Androgen-unabhängige Adenokarzinomzellen der Prostata mit hohem Metastasierungspotential (Kaighn ME et al., 1978).

LNCaP: LNCaP Zellen sind Androgen abhängige Prostatakarzinomzellen. Sie wachsen in adhärenen Zellaggregaten und auch als Einzelzellen und werden seit den 1970er Jahren wissenschaftlich eingesetzt (Horoszewicz JS et al., 1983)

JAR: Die JAR Zelllinie geht aus einem trophoblastischen Tumor der Plazenta hervor (Pattillo RA, 1971).

A431: A431 Zellen sind von einem epidermalen Karzinom isoliert worden (Giard DJ et al., 1973), insbesondere verfügen diese Zellen über eine hohe Anzahl von EGF Rezeptoren pro Zelle.

DU 145: DU 145 Zellen wurden aus Hirnmetastasen eines Adenokarzinoms der Prostata isoliert (Stone KR et al., 1978); sie besitzen ein moderates Metastasierungspotential und sind weder Hormonsensitiv noch exprimieren sie Prostata spezifisches Antigen (PSA).

2.1.4.4 Plasmide

Klonierungsvektor für die FNTB Promotorkonstrukte:

Der pGEMTeasy ist ein etwa 3kb großer, linearisierter Klonierungsvektor der Firma Promega; er verfügt über so genannte 3' T Überhänge an der Insertionsstelle, welche für die Ligation des PCR Produktes sorgen; zudem wird so eine Selbstligation des Vektors verhindert. Bei der Ligation lagern sich die 3' T Überhänge des Vektors an die überhängenden Desoxyadenosine des amplifizierten PCR-Produktes an, die durch die Taq Polymerase entstehen. Die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors beinhaltet

zudem die α -Peptid codierende Region des β -Galaktosidase Enzyms. Dieses wird bei der Ligation des PCR Produktes in die MCS des Vektors inaktiviert, so dass rekombinante Klone auf einer mit Xgal versetzten Indikatorplatte durch Farbumschlag sichtbar gemacht werden können (Abbildung 5).

Reportervektor für FNTB Promoterkonstrukte:

Der pGl 4.10 Vektor (Promega) ist ein etwa 4,2 kb großer Reportervektor, der zur Messung der Genexpression optimiert wurde. Er besitzt ein sog. luc2 Gen (Photinus pyralis), dessen Aktivität bei der Expressionsmessung detektiert wird. Zusätzlich besitzt er ein β -Laktamase bzw. Amp Gen, das die Bindung von Transkriptionsfaktoren an das luc2 Gen reduziert und so die Hintergrundaktivität bei der Messung verringert. Dies verhindert eine abnormale Transkription des luc2 Gens (Abbildung 5).

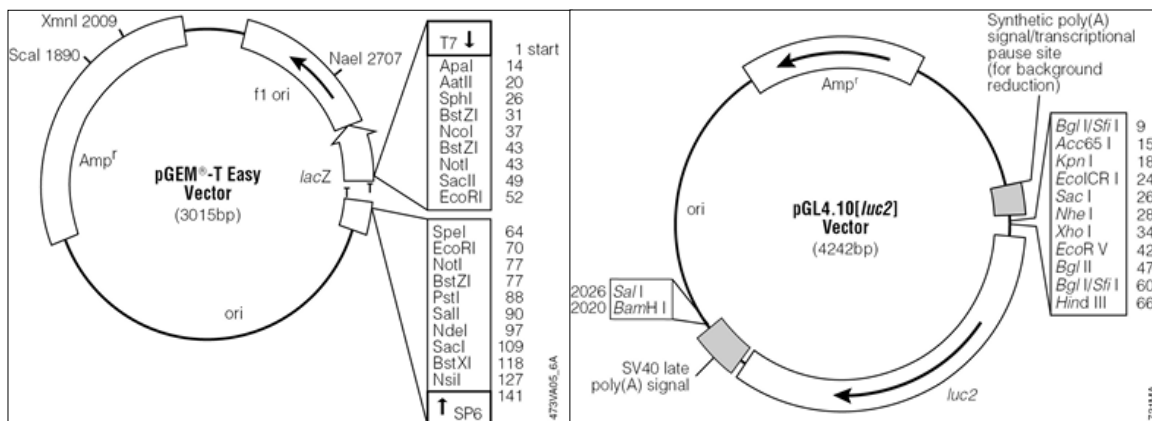


Abbildung 5: Genkarten des Klonierungsvektors pGEM-T Easy und des Reportervektors pGL4.10 (Promega)

2.1.4.5. Bakterienstämme

Bakterienstamm zur Präparation von Plasmid-DNA

E.coli DH5 α (Life Technologies), Genotyp: F- Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-,mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1

2.1.5 Primer

Primer zur Untersuchung des Polymorphismus *FNTB* -609 (PCR):

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer)

FNTB Pro Se GCGGACTGACTGTCTATTT 19

FNTB Pro As GACGCCGTCTCAGTATCA 18

Primer zur Untersuchung des Polymorphismus *FNTB* -173 (PCR):

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer)

FNTB G-1 Se GCAGCAGCTCCCTGTCCAA 20

FNTB G2 As ACTCGAGCGGGCTAAAGC 18

Primer zur Untersuchung des Polymorphismus *FNTB* -179 (PSQ):

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer)

FNTB 3Pyr Se GCAGCAGCTCCTCTGCCCAA 20

FTNB 3Pyr ASBT (BIO)ACTCGAGCGGGCTAAAGC 18

FNTB 3Seq CAGCTCCTCTGCCCA A 16

Primer zur Überprüfung (von cDNA) auf alternative Transkripte im *FNTB*-Genlocus und ihrer Quantifizierung:

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer) (PCR)

TK01-1 Se CAAAGTTCAGGAGAAGGGACA 21

TK01-1 As GGGCAAAGGGTCAGTAAGG 19

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer) (PCR& RT-PCR)

TK10-1 Se ATGTTTTCTCTCCTGTCTCTCTCCC 25

TK10-1 As CCTCGGTGCCAATGATGC 18

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer) (PCR)

EX6b Se TGTGGAGGTAGGGAGAATAGAA 22

EX6b As ATGATGTTGGTCAGCGAGG 19

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer) (PCR&RT-PCR)

TK12-1 Se CGGCAGATGCGATTTGAAGG 20

TK12-1 As AAGTGCTGGGCTATGGACAGG 21

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer) (PCR&RT-PCR)

TK12-2 Se GAGAAAGCAGCAAGCACAAA 20

TK12-2 As GCTTCTCCCTCTGCAAAACA 20

Primer zur Bestimmung der Genexpression identischer Regionen (RT-PCR) in den alternativen Transkripten:

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer) (RT-PCR)

FNTB RT-ALL Se CGGCAGATGCGATTTGAA 18

FNTB RT- ALL As GGCCTGCTGATGGAACAT 19

Primer zum Nachweis der kompletten kodierenden cDNA der alternativen Transkripte im *FNTB*-Genlocus:

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer) (PCR)

FNTBcDNA TK 10-1 Se ATGTTTTCTCTCCTGTCTCTCTCCC 25

FNTBcDNA Ex7A TAG CTAGTAAGCTGTAATCACCTCC 22

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer) (PCR)

FNTB Ex 8 ATG ATGGAAGCCCATGGTGGCTATAACC 24

FNTB Ex 12 TAG CTAGTCGGTTGCAGGCTCTGCCGAT 25

TK-10-1
(Zwei
mögliche
Proteine)

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer)

FNTB Ex 1 ATG ATGGCTTCTCCGAGTTCTTTCACC 24

FNTB Ex 12 TAG CTAGTCGGTTGCAGGCTCTGCCGAT 25

TK 12-1

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer)

FNTB Ex 1A ATG ATGAGGGAGGAAGCCATCATGGATC 25

FNTB Ex 12 TAG CTAGTCGGTTGCAGGCTCTGCCGAT 25

TK 12-2

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer)

FNTB Ex 10A ATG ATGTCAAAGTTCAGGAGAAGGGACC 25

FNTB Ex 10A TAG TCAAGGTTTCTGCTCCCCTTCC 23

TK 1-1

Primer zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion (EMSA) des SNP's *FNTB* -609:

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer)

FNTB EMSA GG Se ATCCTTGTTCCCTTGACTGCATTTTCAG 27

FNTB EMSA GG As CTGAAATGCAGTACAAGGAACAAGGAT 27

FNTB EMSA CC Se ATCCTTGTTCCCTTCTACTGCATTTTCAG 27

FNTB EMSA CC As CTGAAATGCAGTAGAAGGAACAAGGAT 27

Primer zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion (EMSA) des SNP's *FNTB* -173:

Oligonukleotid Sequenz 5' → 3'-Richtung Länge (-mer)

FNTB EMSA 5G Se TCCTCTGCCCAATGGGGGCGGCAGCATCTCA 31

FNTB EMSA 5G As TGAGATGCTGCCGCCCCCATTGGGCAGAGGA 31

FNTB EMSA 6G Se TCCTCTGCCCAATGGGGGCGGCAGCATCTCA 32

FNTB EMSA 6G As TGAGATGCTGCCGCCCCCATTGGGCAGAGGA 32

2.2 Methoden

2.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein seit den 80er Jahren bekanntes *in vitro* Verfahren, das der exponentiellen Vervielfältigung von Genabschnitten definierter Sequenz und Länge dient und für deren Erfindung 1993 der Nobelpreis für Chemie an Karry Mullis (Mullis KB 1990) verliehen wurde. Die Reaktion läuft im Wesentlichen in drei sich kontinuierlich wiederholenden Schritten ab (Abbildung 6). Zunächst werden unter Kenntnis der DNA Sequenz von Interesse zwei synthetische DNA Oligonukleotide (sogenannte Primer), die jeweils komplementär zu einem Strang der DNA Doppelhelix sind, ausgewählt und diese somit an den entgegengesetzten Enden flankieren. Desweiteren wird eine hitzestabile DNA-Polymerasen wie z.B. die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, die auch nach wiederholtem Erhitzen auf 95°C aktiv bleiben, benötigt, sowie als Substrat u.a. Desoxynukleosidtriphosphate.

Der erste Schritt ist die Denaturierung der DNA-Doppelstränge durch Erhitzen auf 95°C. Bei dieser Temperatur brechen die drei zwischen den Basen Guanin (G) und Cytosin, sowie die zwei zwischen Adenin (A) und Thymin (T) bestehenden Wasserstoffbrückenbindungen auf, so dass nun Einzelstrang -DNA (ssDNA) vorliegt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, wird die Temperatur auf 50-60° C gesenkt. Genomische DNA bleibt dabei denaturiert, da die komplementären Stränge in einer zu geringen Konzentration vorliegen, um während der Inkubationsdauer aufeinander zu treffen. Es können also nun die in sehr hoher Konzentration vorhandenen Primer mit ihren komplementären Sequenzen der genomischen DNA eine Bindung eingehen. An dieser Stelle kann nun der dritte Schritt, die Elongation, also die Synthese eines neuen DNA-Stranges beginnen. Dabei wird die Temperatur wieder auf 72°C erhöht, so dass die thermostabilen Polymerasen die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz an den 3'-OH-Enden synthetisieren können. Die Elongationszeit sollte dabei ca. 1 min pro kb betragen. Nach Beendigung der Synthese wird die gesamte Mischung erneut auf 95°C erhitzt, um die neu gebildeten DNA-Doppelstränge zu denaturieren. Nach erneuter Temperatursenkung findet erneut die Synthese statt. Mit jedem Zyklus wird die Anzahl

der Kopien der synthetisierten Sequenz verdoppelt, so dass es zur gewünschten exponentiellen Vervielfältigung kommt.

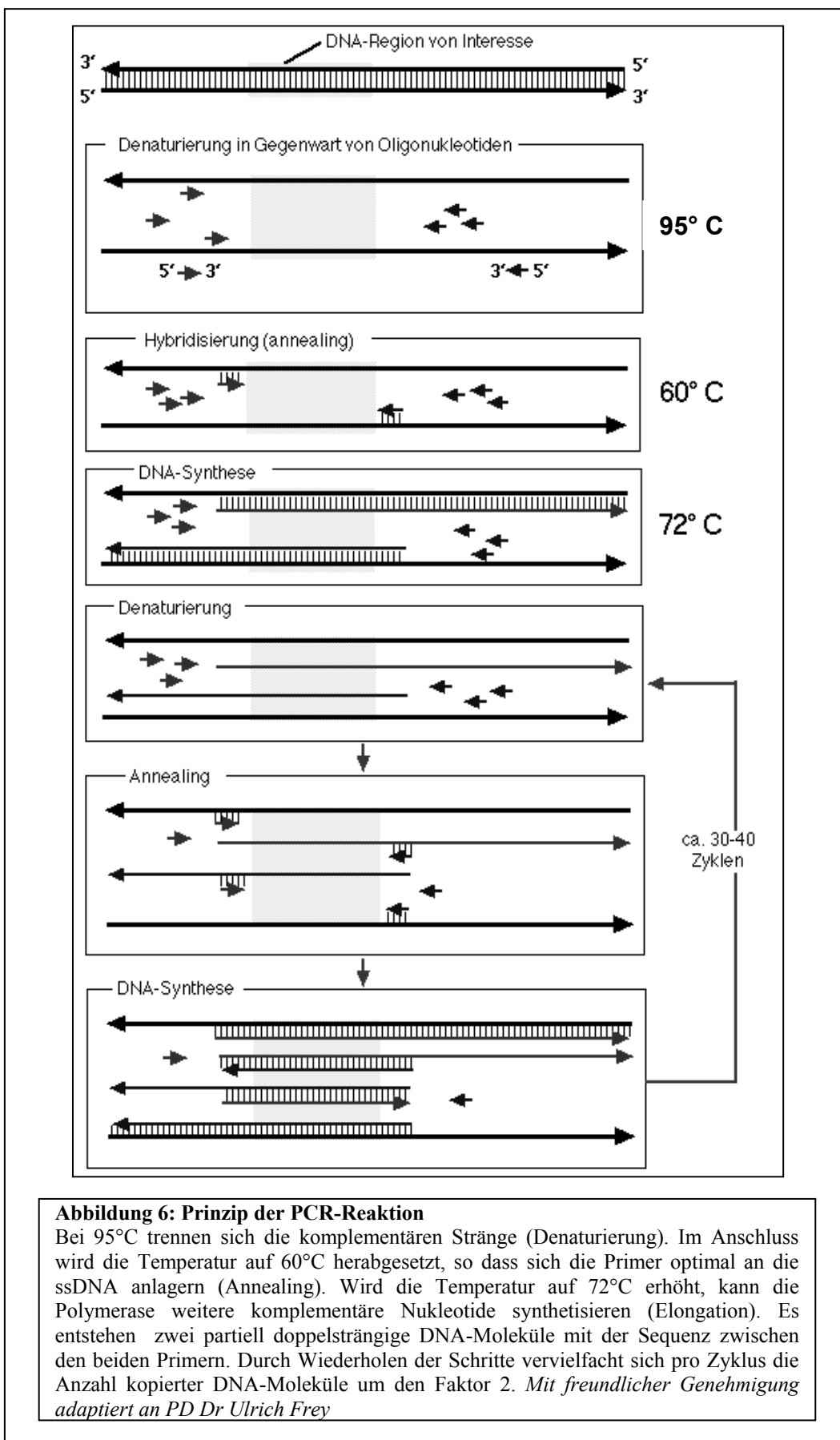


Abbildung 6: Prinzip der PCR-Reaktion

Bei 95°C trennen sich die komplementären Stränge (Denaturierung). Im Anschluss wird die Temperatur auf 60°C herabgesetzt, so dass sich die Primer optimal an die ssDNA anlagern (Annealing). Wird die Temperatur auf 72°C erhöht, kann die Polymerase weitere komplementäre Nukleotide synthetisieren (Elongation). Es entstehen zwei partiell doppelsträngige DNA-Moleküle mit der Sequenz zwischen den beiden Primern. Durch Wiederholen der Schritte vervielfacht sich pro Zyklus die Anzahl kopierter DNA-Moleküle um den Faktor 2. *Mit freundlicher Genehmigung adaptiert an PD Dr Ulrich Frey*

Folgende Aspekte sollten zur optimalen Etablierung einer PCR Berücksichtigung finden:

Primer:

Bei der Auswahl der Primer sollten folgende Merkmale beachtet werden:

- GC-Gehalt ca. 50%
- ideale Länge 18 - 28 bp; längere Primer müssen HPLC-gereinigt werden
- palindromische Sequenzen vermeiden
- Homologien der Primer zueinander vermeiden
- G oder C am 3'-OH-Ende zur Stabilisierung des in der PCR-Reaktion entstehenden Hybrids, längere GC-Abfolgen jedoch vermeiden (Sambrook J, Russell D, 2000).

Annealing-Temperatur:

Die Annealingtemperatur hängt von Länge und Sequenz der Primer ab. Je höher der GC Gehalt der Primer ist, desto höher liegt auch die Annealingtemperatur. Unter zu Hilfenahme der Formel: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A + T) + 4^\circ\text{C} \times (G + C)$ (Sambrook J, Russell D, 2000) kann die Annealingtemperatur (T_m) der Primer abgeschätzt werden. Die optimale Annealing-Temperatur liegt etwa $3\text{-}5^\circ\text{C}$ unter dem niedrigsten errechneten Schmelzpunkt. Diese Faustregel gilt allerdings nur für Primer mit ca. 18 – 24 bp. Falls unspezifische PCR-Produkte gebildet werden, sollte die Annealing-Temperatur erhöht werden. Bei besonders GC- reichen Sequenzen kann mittels Slowdown-PCR eine höhere Wahrscheinlichkeit für spezifische Primerbindungen erreicht werden (Bachmann HS et al., 2003). Hierbei wird die Annealingtemperatur nach je einem oder mehreren Zyklen stufenweise erniedrigt und zusätzlich kleine Heiz- und Kühlraten benutzt.

Elongationstemperatur:

Die Elongationstemperatur variiert abhängig von der eingesetzten Polymerase. Die in dieser Arbeit verwendete *Taq*-Polymerase hat ihr Temperaturoptimum bei $72 - 78^\circ\text{C}$ die *Pfu*-Polymerase bei $72 - 74^\circ\text{C}$. 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, dafür werden durch einen ihr spezifischen Autokorrekturmechanismus Fehler während der Elongation minimiert.

Taq-Polymerase und zusätzliche Komponenten:

Der MasterMix der Firma Eppendorf beinhaltet eine Taq-Polymerase sowie als Substrate die Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dTTP, dCTP und dGTP in äquimolaren Mengen. Durch den Zusatz bestimmter Ionen werden die Reaktionsbedingungen der Elongation chemisch optimiert.

PCR Ansätze der FNTB Promotorpolymorphismen:

PCR für den Polymorphismus *FNTB* - 179

Ansatz:

21 µl MasterMix
1 µl Primer FNTB 3 Se (20 pmol)
1 µl Primer FNTB 3Pyr AsBT (20 pmol)
17 µl H₂O
+ je 2 µl DNA

Thermocycler:

95°C 3 min
95°C 30sec
64°C 20sec 38 x
72°C 30sec
72°C 10min

Erwartetes PCR-Produkt: 137 bp

PCR für den Polymorphismus *FNTB* - 609

Ansatz:

16 µl MasterMix
1 µl Primer FNTB Pro Se (10 pmol)
1 µl Primer FNTB Pro As (10 pmol)
12 µl H₂O
+ je 2 µl DNA

Thermocycler:

95°C 5min
95°C 30sec
61°C 40sec 38 x
72°C 45sec
72°C 10min

Erwartetes PCR-Produkt: 140 bp

PCR für den Polymorphismus *FNTB* - 173

Ansatz:

16 µl MasterMix
1 µl Primer FNTB G-1 Se (10 pmol)
1 µl Primer FNTB G2 As (10 pmol)
12 µl H₂O
+ je 2 µl DNA

Thermocycler:

95°C 5min
95°C 30sec
64°C 30sec x 39
72°C 30sec
72°C 7min

Erwartetes PCR-Produkt: 137 bp

PCR Ansätze der alternativen Transkripte im FNTB Gen:

<p>PCRs für die alternativen Transkripte TK 01, TK 10, TK 12-1, TK 12-2 und EX 6B</p> <p>Ansatz: 16 µl MasterMix Je 1 µl Primer Sense (10 pmol) Antisense (10 pmol) des jeweils untersuchten Transkripts wie unter 2.1.5 angegeben + 12 µl H₂O + 2 µl DNA Thermocycler: 95°C 5min 95°C 30sec 60°C 30sec x 37 72°C 30sec 72°C 7min Erwartete PCR-Produkte: TK 01: 177 bp TK 10: 244 bp TK 12-1: 290 bp TK 12-2: 131 bp EX 6B: 201 bp</p>	<p>PCRs für die komplette codierende cDNA der alternativen Transkripte TK 10-1, TK 10-2, TK 12-1, TK 12-2 und TK1-1</p> <p>Ansatz: 16 µl MasterMix Je 1 µl Primer Sense (10 pmol) Antisense (10 pmol) des jeweils untersuchten Transkripts wie unter 2.1.5 angegeben + 12 µl H₂O + 2 µl DNA Thermocycler: 95°C 3min 95°C 40sec 62°C 30sec x 38 72°C 45sec 72°C 7min Erwartete PCR-Produkte: TK 10-1: 513 bp TK 10-2: (Proteinvariante) 582 bp TK 12-1: 1316 bp (ohne CAG) TK 12-2: 1260 bp TK1-1: 102 bp</p>
---	--

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 DNA Präparation aus Blut

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

2.2.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Unter zu Hilfenahme einer horizontalen Agarosegelelektrophorese kann DNA aufgetrennt und ihrer Größe nach identifiziert werden. Grundlage dieser Methode ist die physikalische Eigenschaft von DNA, durch ihr Phosphatgerüst negativ geladen zu sein und somit in einem elektrischen Feld der Anode entgegen zu wandern. Hierbei ist aufgrund des Widerstandes der Agarose-Gelmatrix die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus der DNA-Länge. Zur Größenidentifizierung werden kommerzielle, standardisierte Marker eingesetzt, die entsprechend der erwarteten Größe des zu untersuchenden Fragments ausgewählt werden. Für DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1000 bp wurden 1%-Agarose-Gele, für kleinere Fragmente 2,5%-Agarose-Gele, verwendet. Die Herstellung eines solchen Gels erfolgt

unter Verwendung von Agarose in gewünschter Menge und TRIS-Borat-EDTA (TBE). Diese Mischung wird aufgeköcht und 10 µl SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen) 1:10 verdünnt pro 100 ml hinzugefügt. Diese Substanz ist ein Cyanin-Farbstoff, der in der Lage ist sich in die DNA Doppelhelix einzulagern und diese folglich unter UV-Licht visualisierbar macht. Nachdem die Agaroselösung blasenfrei in Gelkammern gegossen und mit einem Kamm, zur Erzeugung von Pipetiertaschen für die DNA-Proben versehen wurde, kann das Gel bei Raumtemperatur polymerisieren. Anschließend kann der Gelschlitten in eine Elektrophoresekammer, die mit TBE gefüllt ist, eingelegt werden. Die Taschen werden mit Probenpuffer vermischten DNA-Proben gefüllt. Eine Tasche wird mit Längenmarker beladen. Im elektrischen Feld werden die Proben bei 180 Volt aufgetrennt (Faustregel hier: 12 V/cm Gellänge), wobei sich die Dauer der Elektrophorese nach der Konzentration des Agarosegels sowie nach der Größe der DNA-Proben und der gewünschten Wanderungstrecke richtet. Unter ultraviolettem Licht kann 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 11 H₂O bidest.
- 10x DNA Probenpuffer 25% (w/v) Ficol; 0,5% (w/v) Orangel
- SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen)

2.2.2.3. Extraktion von DNA aus einem Agarosegel

Zur weiteren Verwendung elektrophoretisch aufgetrennter DNA muss diese wieder aus dem Agarosegel extrahiert werden. Hierzu wurde nach Visualisierung unter UV-Durchleuchtung die entsprechende DNA Bande von Interesse mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und nach Protokoll des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, 11/2006) behandelt.

2.2.2.4. Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte streng nach dem Protokoll „QIAquick PCR Purification Kits“ (Qiagen).

2.2.2.5. Sequenzierung

Alle durchgeführten Sequenzierungen wurden durch die Eurofins Medigenomix GmbH, Martinsried vorgenommen. Die Methodik der Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode (Dideoxymethode) nach Sanger (Sanger F et al., 1977). Hierbei wird ein Reaktionsgemisch bestehend aus Primer, zu bestimmender Sequenz, DNA Polymerase, den vier herkömmlichen Desoxynukleotiden dATP, dTTP, dGTP, dCTP

als Substrat sowie zusätzlich fluoreszierend markierten Didesoxynukleotiden, ddNTPs generiert. Diesen Didesoxynukleotiden fehlt die zur Verlinkung mit der Phosphatgruppe des darauf folgenden Nukleotids nötige 3' -OH Gruppe. Bei Einbau dieser durch die Polymerase kommt es zum Kettenabbruch. Sämtliche Kettenabbruchprodukte werden folgend mittels Kappillarelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und anhand des farbigen Fluoreszenzausschlags, welcher für jedes der vier ddNTP spezifisch ist, kann die Sequenz des DNA Strangs ermittelt werden.

2.2.3 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung ist eine Methode, die auf der Detektion des während der DNA-Synthese gebildeten Pyrophosphats basiert (Ronaghi M 2001). Ausgehend von einem Primer und der zu untersuchenden DNA erfolgt die Strangverlängerung durch Zugabe von jeweils einem der vier Nukleosidtriphosphate (NTP) nacheinander unter der Aktivität einer DNA Polymerase. Wird ein entsprechend komplementäres Nukleotid eingebaut wird ein Pyrophosphat (PPi) abgespalten, welches durch die ATP-Sulfurylase zu Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt wird, welches wiederum anschließend als Energielieferant für die Luciferase katalysierte Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin zur Verfügung steht. Das Resultat ist ein detektierbares Lichtsignal, dessen Stärke in linearer Beziehung zur Menge an gebildetem Pyrophosphat und somit zum eingebauten dNTP steht. Die Lichtemission wird aufgezeichnet und mittels Pyrogramm™ als Peak wiedergegeben. Da auch quantitative Aussagen über die Peak-Höhe der Laserauslesung möglich sind, hebt sie sich von der herkömmlichen Sequenzierung nach der Sanger-Methode, die auf Kettenabbruch mit Didesoxynukleotiden beruht, ab.

Es wurde ausschließlich der Pyrosequenzierer der Firma Biotage unter der Verwendung unter 2.1.5 angegebener Primer und des Biotage Manuals zur Durchführung der Genotypisierung der verschiedenen Kollektive bezüglich des SNPs *FNTB* -179 eingesetzt. Dabei dient der biotinilierte Primer als komplementäre Vorlage zur Anlagerung des Sequenzierprimers. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der SQA Software (Pyrosequencing AB).

2.2.4 Restriktionsverdau von DNA

Auch durch den Restriktionssverdau findet eine heute weitläufig etablierte Methode der molekularen Genetik ihre Anwendung (Rutherford NJ 1992). Das Prinzip eines Verdaus durch Typ II-Restriktionsendonukleasen prokaryontischer Herkunft beruht auf deren Fähigkeit bestimmte DNA-Sequenzen zu erkennen (meist 4– 8 bp lang) und diese hydrolytisch zu spalten, wobei stumpfe „blunt-end“ oder überhängende „sticky-end“ Enden entstehen können. Abhängig vom eingesetzten Restriktionsenzym variieren Pufferbedingungen, optimale Temperatur und Dauer der Reaktion. Einsatz findet die Methode unter anderem in der Vektorklonierung oder um DNA-Abschnitte anhand unterschiedlicher Schnittstellen zu differenzieren. Befindet sich dementsprechend ein SNP innerhalb einer Erkennungssequenz kann nach einem Verdau und konsekutiver elektrophoretischer Auftrennung auf den Genotyp geschlossen werden. Die zur Genotypisierung der Polymorphismen *FNTB-609* und *FNTB-173* verwendeten Restriktionsenzyme wurden folgendermaßen eingesetzt:

Polymorphismus *FNTB -173*

Enzym: BslI, Erkennungssequenz: 5' CCNNNNNNNGG 3'.

Fragmente nach Genotypen:

Wildtyp:	6G	111 + 26 bp
Heterozygot:	6G/5G	137 + 111 + 26 bp
Mutation:	5G	137 bp

Polymorphismus *FNTB -609*

Enzym: RsaI, Erkennungssequenz: 5' GTAC 3'.

Fragmente nach Genotypen:

Wildtyp:	GG	101 + 39 bp
Heterozygot:	GC	140 + 101 + 39 bp
Mutation:	CC	140 bp

Je 10 µl PCR Produkt, 3 µl Puffer und 0,3 µl Enzym und wurden verwendet und das Reaktionsgemisch mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 30 µl aufgefüllt.

Zur Überprüfung erfolgreicher Transformationen mit dem pGEMT-easy Vektor kam EcoRI als Endonuklease zum Einsatz, welche in der multiple Clonig site des Vektors hydrolysiert und die Regeneration des klonierten PCR Produkt ermöglicht.

Analytischer Verdau (20 µl): 10 µl Miniprep-DNA
 2 µl Reaktionspuffer (10x)
 1-5 u Restriktionsenzym
 mit ddH₂O auffüllen

Alle Ansätze wurden im Durchschnitt für etwa 90 min bei der entsprechenden enzymespezifischen optimalen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt und analysiert.

2.2.5. Zellkultur

Vitale Zellen stellen je nach Zelllinie bezüglich Nährstoff-, O₂- sowie CO₂- Versorgung individuelle Ansprüche an ihre Umgebung; es bedarf zudem einer optimierten Umgebungstemperatur und pH-Werten. Um die Teilungsaktivität der Zellen und somit ein kontinuierliches Wachstum unter diesen Bedingungen aufrechtzuerhalten ist eine regelmäßige Abschätzung der Zellzahl und bedarfsweise eine Aufspaltung bzw. Subkultivierung der Zellverbände bei Erreichen des Konfluenzstadiums notwendig. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit der Casy1 Apparatur (Schärfe System, Reutlingen) durchgeführt. Hier wird mittels der Pulsflächenanalyse, einer Abwandlung des Widerstandsmessprinzips, die Zellgröße eines einzelnen Messereignisses bestimmt. Jede Zelle verdrängt bei ihrem Durchfluss durch eine Messkapillare eine definierte Menge einer geeichten Elektrolytlösung, wodurch eine Widerstandserhöhung erfolgt, die ein direktes Maß des Zellvolumens ist. Die hier verwendeten Zellen wurden ausnahmslos bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert. Jegliche Zellkulturarbeiten wurden unter Beachtung der nötigen Sterilität mit den unter 2.1.3 angegebenen Medien unter einer Reinraumbank durchgeführt.

2.2.6. Zellkernextraktion

Zur Herstellung von Zellkernextrakten wurde zunächst das Medium der Zellen entfernt und die Zellen in PBS aufgenommen, anschließend zentrifugiert, erneut mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Im Folgenden wurde das restliche PBS entfernt und das Zellpelletvolumen bestimmt. Abhängig vom Zellpelletvolumen wurde dem Pellet die 5-fache Menge (bezogen auf das Volumen) Lyse-Puffer dazugegeben. Dieser Lyse-Puffer besteht aus einem hypotonen Puffer mit zugesetzten Proteaseinhibitoren. Nach

einer 15 minütigen Inkubation auf Eis folgte die Hinzugabe eines nicht-denaturierenden Detergens (10% IGEPAL). Nach 10sec Durchmischung erfolgte die Zentrifugation bei 4°C. Das entstandene Pellet repräsentiert die Kernfraktion, während sich im Überstand die Zytoplasmafraktion befindet, welche abgenommen wird. Mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung wird überprüft, ob sich die Zellkerne anfärben lassen. Das Pellet wurde im Weiteren in Extraktionspuffer (2/3 des Zellpackvolumens) resuspendiert und gevortext. Zuletzt wurde wiederum bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert. Im Überstand sind nun die extrahierten Zellkernextrakte, welche zunächst in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80°C eingefroren werden. Für diese Arbeit wurden Zellkernextrakte von HeLa, LNCaP, DU 145 und PC3 Zellen hergestellt, Zellkernextrakte von Hek293, JAR und A431 Zellen standen bei -80°C eingefroren, bereits zur Verfügung. Die Präparation der Zellkernextrakte erfolgte mit dem NuCLEAR Extraction Kit (Sigma, Deisenhofen, Germany) entsprechend der Empfehlungen des Herstellers. Verwendet wurden die Zellkernextrakte zur Herstellung von RNA und konsekutiv cDNA sowie zur Untersuchung von Proteinbindung mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay.

2.2.7. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)/ Infrarot-Electrophoretic Mobility Shift Essay (IR-EMSA)

Der Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) oder Band Shift Assay ist ein Verfahren Interaktionen zwischen Proteinen wie z.B. Transkriptionsfaktoren und DNA bzw. RNA nachzuweisen. Er beruht auf der Grundlage, dass DNA-Protein-Komplexe in einem elektrischen Feld langsamer durch ein Agarosegel wandern als ungebundene DNA. Diese kann nach der Elektrophorese unter zu Hilfenahme von radioaktiven oder fluoreszierenden Sonden visualisiert werden (Hellman LM, 2007). Hier wurden bereits etablierte, synthetisierte Sonden, die unter 2.1.5 beschrieben wurden verwandt, welche spezifisch an die verschiedenen Allele der Polymorphismen *FNTB*-609 und *FNTB*-173 binden können. Die Durchführung der EMSAs erfolgte mit dem EMSA buffer kit (Li-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA) analog des Herstellerprotokolls. Oligonukleotide und die unter 2.2.6 beschriebenen LNCaP, DU145 und PC3 Zellkernextrakte (je 5 µg) wurden mit 2 µl des 10x binding puffers, 2,5 mM DTT, 0,25% Tween-20, 1 µg poly (dI-dC) und 0,05% NP-40 auf ein Gesamtvolumen von 20

µl titriert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Separation in einem 6%igen Polyacrylamidgel in 0,5 x Tris–Borate-EDTA Laufpuffer. Die Gele wurden abschließend mittels direkter Infrarot-Fluoreszenz mit Hilfe des Odyssey Imaging Systems (Li-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA) dargestellt und analysiert.

Nicht denaturierendes Polyacrylamid Gel 6%(Mengenangaben für 2 Gele)

<i>Polyacrylamid 40%</i>	<i>3,75 ml</i>
<i>Sigma 1M, pH 7,5</i>	<i>1,00 ml</i>
<i>Glycin 1M</i>	<i>3,80 ml</i>
<i>EDTA 0,5M</i>	<i>80,00 µl</i>
<i>Wasser</i>	<i>11,75 ml</i>
<i>APS 10%</i>	<i>0,10 ml</i>
<i>TEMED</i>	<i>15,00 µl</i>

Elektrophorese- Lösungen/Chemikalien:

a) 0,5x TBE Puffer (=10x TBE Puffer, 1:20 verdünnt mit autoklaviertem Aqua dest.)

10x TBE Puffer (s.u.) 100 ml

Autoklaviertes Aqua dest. 900 ml

b) 10x TBE Puffer

Sigma 7-9 107,80 g

Na-EDTA 7,44 g

Borsäure, pH 8,3 55,00 g

+ autoklaviertes Aqua dest. ad 1000 ml

c) 10x Orange G loading dye (Li-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg)

2.2.8. Klonierung

Klonierung bezeichnet die Integration eines DNA-Abschnittes in einen Vektor, welcher anschließend zur Vervielfältigung in eine Wirtszelle transformiert wird. Hierfür dienten PCR-Produkte, welche die unterschiedlichen Haplotypen der SNPs *FNTB-609*, *FNTB-173* und *FNTB-179* enthielten.

Ligation

Die Ligation des pGEM-T-easy Vektors mit dem vorbereiteten DNA Fragment erfolgte mittels der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase, die freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA durch Bildung einer Phosphodiesterbindung verknüpfen kann, analog des pGEM-T Easy Kits und Protokolls (Promega, 1993).

Transformation

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Die Plasmid-DNA kann folglich durch die Proliferation des Bakteriums *Escherichia coli* vermehrt werden. Es wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (DH5α, Life Technologies) verwandt. Es wurden 5µl des Ligationsansatzes (1:5

verdünnt in Tris EDTA Puffer, 10mM/1mM) mit 20µl der Bakterien im Medium für 30 Minuten auf Eis inkubiert, um die Anheftung des Plasmids an die Zellwand des Bakteriums zu ermöglichen. Um die Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Bakterien einem kurzen (40sec) Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend 2 min. auf Eis gelagert. Bei Raumtemperatur wurden anschließend jeweils 80µl SOC-Medium (Invitrogen) zugesetzt und die Bakterien eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden jeweils 50µl dieses Ansatzes gleichmäßig auf einer Nährplatte zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Ampicillin- und blau/weiß-Selektion

Da nicht alle ligierten Vektoren über ein fehlerfreies Insert verfügen oder erfolgreich in ein Bakterium transformiert werden bedient man sich zur Selektion zum einen der Eigenschaft der natürlichen Ampicillin-Resistenz des pGEM-T EasyVektors, welche DH5α-Zellen nicht aufweisen. Auf mit Ampicillin beimpften Nährplatten wachsen somit nur Bakterien, die erfolgreich transformiert wurden. Zum anderen wird eine erfolgreiche Ligation des Vektors mittels blau/weiß-Selektion visualisiert, hierbei verlieren diejenigen Plasmide, in welchen die mittels PCR amplifizierte DNA-Sequenz innerhalb der Multiple Cloning Site kloniert wurde durch Unterbrechung der Sequenz ihr funktionierendes β-Galactosidase-Gen. Solche Bakterien erscheinen konsequent weiß, da sie das im Medium vorhandene X-Gal nicht mehr umsetzen können. Bakterien, die ein „leeres“ Plasmid aufgenommen haben, bleiben blau. Die weißen Klone wurden selektiert, in 5ml flüssiges LB-Medium überführt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Eine geringe Menge selektierter Klone wurde zudem jeweils für eine Kontroll-PCR vorbereitet.

Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid DNA kamen die sogenannte „Miniprep“ (bis 20µg Plasmid DNA) für den analytischen Maßstab und für den präparativen Maßstab eine sogenannte „Maxiprep“ (bis 1mg Plasmid DNA) zum Einsatz. Für beide wurden kommerziell erhältliche Kits (QIAprep Miniprep bzw. Maxiprep, Qiagen) analog des entsprechenden Protokolls eingesetzt.

2.2.9 „Reporter Assay“

Der „Reporter Assay“ ist eine Methode, mit deren Hilfe regulatorische Elemente eines Gens identifiziert und analysiert werden können. Hierzu wird die regulatorische Region eines Gens mit einem sogenannten Reportergen in einem Vektor gekoppelt und in eine geeignete Zelllinie transformiert. In Abhängigkeit des verwendeten Reportergens ist es möglich anhand transkribierter mRNA, translatierter Proteine oder der katalytischen Aktivität eines Reporterenzym Rückschlüsse auf die Aktivität der regulatorischen Region des untersuchten Gens zu ziehen. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurde die Aktivität der Promotorregion im Gen *FNTB* untersucht. Die untersuchten Sequenzen wurden zunächst aus dem Klonierungsvektor pGEM-T Easy in den Vektor pGL4.10 umkloniert und mittels Dual Glo Luciferase Assay (Promega) analysiert. Der Dual Glo Luciferase Assay beruht auf einem dualen Messsystem. Hierbei wird die Aktivität zweier Reportervektoren in einem Zellsystem gemessen. Der experimentelle Reportervektor enthält das zu untersuchende Insert, der sog. Renilla-Vektor stellt einen Kontrollvektor dar, der unspezifische Störgrößen wie zum Beispiel Apoptose, Differenzen in der Anzahl transfizierter Zellen, Schwankungen der Gesamtzellzahl oder unterschiedliches Zellwachstum normieren soll. Somit können spezifische von unspezifischen Aktivitäten unterschieden werden und vergleichbare Messergebnisse erreicht werden. Um in diesem System gemessen werden zu können muss der das Insert enthaltende Vektor ein Firefly Luciferase Gen enthalten. Dessen Aktivität wird bei der ersten Messung durch das Dual Glo Luciferase Reagent detektiert. Bei der zweiten Messung wird die Renilla Aktivität durch Zugabe des Dual Glo Stop & Glo Reagent ermittelt. Hierfür ist das Vorhandensein eines Renilla Gens im Kontrollvektor vorausgesetzt. Dazu wurde der pGl 4.74 Vektor (Promega) eingesetzt. Nach Abzug des sog. Backgrounds (Hintergrundsignals), der durch die Negativkontrolle ermittelt wird, wird der Quotient der beiden Messergebnisse berechnet. Die erhaltenen Aktivitätswerte der verschiedenen Inserts sind durch die Normierung mittels Kontrollvektor miteinander vergleichbar und können genotypabhängige Unterschiede darstellen. Bei der Durchführung der Versuche wurde streng nach Protokoll des Herstellers (Promega) vorgegangen. Dabei wurde für die Transfektion 150ng des pGl 4.10 Reporterkonstrukts und 50ng des pGl 4.74 eingesetzt. Die Transfektion der PC3,

LNCaP und DU 145 Zellen erfolgte mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 96-Loch Platten. Lipofectamine sind kationische Lipide, die mit negativ geladenen DNA-Molekülen zu einem Liposomen-Polynukleotid Komplex interagieren. Dieser Komplex fusioniert schließlich mit der Zellmembran, die DNA gelangt somit ins Zellinnere und letztlich in den Zellkern. Das verwendete Transfektionsmedium RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) enthielt 10% FKS für PC3 und DU145 Zellen, 20% FKS für LNCaP. Nach 6 Stunden wurde das Transfektionsgemisch entfernt und die Zellen in neues Medium überführt. Zur Messung mittels Luminometer wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektion aus der 96-Loch Platte gelöst und in Messröhrchen überführt. Die Messung erfolgte jeweils 10 Minuten nach Zugabe der Reagentien Dual Glo Luciferase Reagent und Dual Glo Stop & Glo Reagent.

2.2.10 Arbeiten mit RNA und cDNA

Komplementäre DNA (engl. complementary DNA, cDNA) wurde mittels einer Reverse-Transkriptase-Reaktion mit Hilfe von RNA oder mRNA als Vorlage gewonnen. Im synthetisierten cDNA-Strang befinden sich nur die kodierenden Bereiche eines Gens. Die Isolation von RNA erfolgte je nach Ursprung der Zellen entsprechend der adäquaten Protokolle: Für die RNA-Gewinnung aus Vollblut gesunder 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- und Prostatakarzinomgewebe 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) entsprechend Protokoll (Invitrogen, 2003). Alle Proben wurden mit DNase behandelt um potentielle kontaminierende genomische DNA aus der RNA Probe zu beseitigen.

2.2.11 Quantitative Echtzeit-PCR - „Real-Time PCR“

Die quantitative Echtzeit-PCR oder „Real-Time PCR“ ist ein auf der konventionellen PCR basierendes Verfahren, welches neben der Amplifikation eines Genabschnitts simultan dessen Quantität erfasst. Durch die Messung fluoreszierender Signale während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion erfolgt eine Konzentrationsbestimmung eines definierten RNA- oder DNA-Abschnitts. Es wird jedoch nicht die absolute Menge des PCR-Produkts ermittelt, vielmehr nutzt man die Kinetik der PCR-Reaktion um die spezifische Menge an amplifiziertem Produkt zu ermitteln. Es wurde hier die SYBR-Green-Methode angewandt (Arya M et al., 2005), bei welcher der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) mit doppelsträngiger DNA interkaliert, wodurch ein Anstieg der Fluoreszenz des Farbstoffs entsteht. Zum Ende einer jeden Elongation eines Zyklus wird das Fluoreszenzsignal gemessen und gibt Aufschluss über die Menge eines vervielfältigten PCR-Produkts. Amplifikation und Detektion des Fluoreszenzsignals finden im selben Gerät, hier dem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), statt. Sämtliche Reaktionsansätze wurden analog des Protokolls im „Quantitect SYBR Green PCR Handbook“ (Qiagen, 01/2008) mit den entsprechenden Chemikalien des Kits (Qiagen) pipetiert. Zur Untersuchung kam cDNA aus verschiedenen Geweben unter Verwendung der unter 2.1.5. beschriebener Primer. Vor Etablierung der RT-PCRs wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe für jedes der untersuchten Gene durchgeführt, die eine Effizienz der PCR von > 94% bestätigen musste, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit dem so genannten „housekeeping gene“, hier *hβ-ACTIN* sicherstellt (Vandesompele J et al., 2002). Dieses wird als Standard eingesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Prozesse und somit Berechnung zu ermöglichen. Die relative Expression der untersuchten Gene im Vergleich zu *hβ-ACTIN* werden unter zu Hilfenahme der Formel: $Gen/\beta-ACTIN=2^{-[Ct(Gen)-Ct(\beta-ACTIN)]}$ errechnet, wobei Ct die Anzahl der Zyklen ist, bei der das Fluoreszenzsignal eine vordefinierte Intensität erreicht bzw. überschreitet.

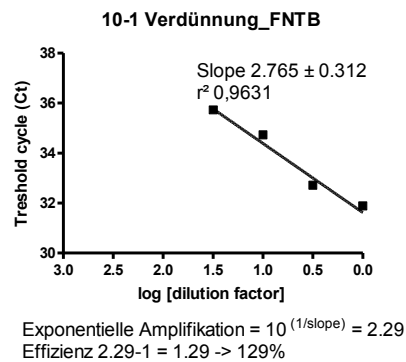
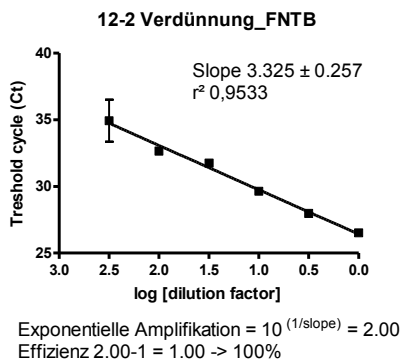
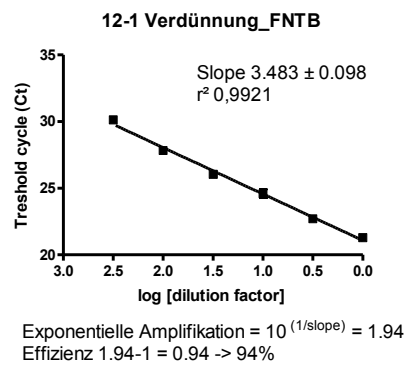
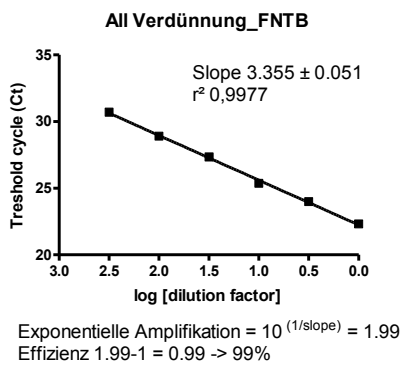


Abbildung 7: Verdünnungsreihen zur Etablierung der FNTB RT-PCRs. Es zeigt sich für alle vier Fälle ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Menge (x-Achse) und dem Zeitpunkt der Schwellenüberschreitung (y-Achse).

2.2.12 Statistische Methoden

Genotyp- / Allelfrequenz und ihre Analyse

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, Zu- oder Abwanderungen: eine Population, in welcher der Genpool konstant bleibt. Diese ideale Population ist in der Realität nicht vorzufinden, jedoch eignet sich das Konstrukt, 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.

Untersuchung der Patientenkollektive auf genotypabhängige Unterschiede

Die Patientenkollektive wurden auf klinische Parameter und deren Genotypenabhängigkeit hin untersucht. Kategoriale Variablen, wie z.B. das Tumorstadium wurden entsprechend der Genotypen der einzelnen Polymorphismen in Kreuztabellen verglichen. Abhängigkeiten wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests analysiert. Metrische Variablen wie 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 5 konnten die Verteilung der Genotypen vergleichend dargestellt werden.

Überlebensanalyse

Es wurde mit dem Statistikprogramm SPSS gearbeitet. Zur Untersuchung von Überleben in Abhängigkeit von einem definierten Faktor von Interesse innerhalb eines Tumorkollektivs wurde die Kaplan-Meier-Methode angewandt. Nach Genotypen separiert, konnten die Überlebenskurven auf signifikante Unterschiede mittels Log-Rank Test getestet werden. Für jedes Kollektiv wurde eine Cox-Regression durchgeführt, um mögliche Einflüsse verschiedener, klinischer Parameter auf das Überleben mit zu berücksichtigen. Hierbei wurde für jede Variable je eine univariate sowie eine multivariate Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Hazard Ratio (HR) mit 95%-Konfidenzintervall angegeben.

Signifikanzniveau

Als statistisch signifikant betrachtet wurden erhobene Daten, wenn der zugehörige p-Wert $< 0,05$ war.

Gewebespezifische Expression alternativer Transkripte

Zur Berechnung gewebespezifischer Expressionsmuster von Spleißvarianten wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt (Livak K, 2001). Hierbei wird die unterschiedliche Expression von Gen-Transkripten unter Zuhilfenahme des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes als n-fache Expression angegeben. Vereinfacht werden hierbei die Ct-Werte voneinander abgezogen (ΔCt), die beiden ΔCt -Werte einzelner Gruppen (Gruppe A: FNTBAll/Gruppe B: Actin) voneinander abgezogen ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert) und in die Gleichung $n\text{-fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = amount of target} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt.

3. Ergebnisse

3. 1. Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren

Mit einem „Electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) ist es möglich Interaktionen zwischen DNA und Proteinen darzustellen. Es wurde der Polymorphismus *FNTB-609* isoliert sowie die SNPs *FNTB-179* und *FNTB-173* aufgrund ihrer zueinander engen Lage innerhalb der Promotorregion des *FNTB*-Gens gekoppelt, auf die Bindungskapazität von Transkriptionsfaktoren hin analysiert. In einer sogenannten *in-silico* Analyse mit der Software ConSite konnte in Vorarbeiten (Lazik A, 2010) gezeigt werden, dass sich hypothetisch Unterschiede im Bindungsverhalten der einzelnen Polymorphismen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. dem Transkriptionsfaktor Thing1-E47 ergeben. Die Versuche zum Bindungsverhalten in Abhängigkeit der drei untersuchten Polymorphismen wurden mit Zellkernextrakten aus LNCaP-, PC3- sowie DU145- Zelllinien, wie unter 2.2.5 bis 2.2.7 beschrieben durchgeführt. Hierbei zeigten sich die in den Abbildungen 8-12 dargestellten Bandenmuster. Unter regelhaften Versuchsbedingungen kamen bei den Untersuchungen zum Polymorphismus *FNTB-609* (Abbildungen 8-10) jeweils in Probe 1 und 6 ohne den Zusatz von Zellkernextrakten erwartungsgemäß keine Bindungen zur Darstellung. Unspezifische Bindungen oder Verunreinigungen durch Proteine konnten somit ausgeschlossen werden. Unter Einsatz von 50fmol/ μ l gelabeltem Oligonukleotid (*FNTB* GG Dy 682 oder *FNTB* CC Dy 682) und ungelabeltem Oligonukleotid in 25-facher (1,25pmol/ μ l) und 200-facher Konkurrenz (10pmol/ μ l) sowie einer konstanten Konzentration von 5 μ g Zellkernextrakten pro Probe zeigten sich für die drei Prostatakarzinom-Zelllinien vergleichbare Bandenmuster. Der Komplex aus Oligonukleotid und Transkriptionsfaktor wandert langsamer durch das Gel als ungebundenes Oligonukleotid. Bei den Proben 2, 4, 5, 7, 9, 10 zeigt sich je am oberen Bildrand eine unspezifische Bande des markierten Oligonukleotid/Proteinkomplexes. Bei Probe 2, 5 und 9 zeigt sich je eine zusätzliche, retardierte Bande, welche bei Probe 2 auf die spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an das gelabelte Oligonukleotid GG und bei Probe 7 auf die spezifische CC- Bindung zurückzuführen ist. In Probe 5 kommt es bei einer Gegenkonkurrenz des markierten Oligonukleotids GG mit dem CC Oligonukleotid in 25fachen Überschuss zur Bandenbildung. In Probe 10 wobei gelabeltes Oligonukleotid CC mit ungelabeltem Oligonukleotid GG in 25-

fachem Überschuss kompetiert ist diese Bande nicht mehr darstellbar, was auf die spezifischere Bindung an das G Allel in Probe 5 schließen lässt (vergleiche Abbildungen 8-10) und hier eine Bindung von Transkriptionsfaktoren mit höherer Affinität an das G-Allel angenommen werden kann. In allen 3 verwendeten Prostatazelllinien konnten diese Ergebnisse dargestellt werden. In der DU145 Zelllinie ließ sich zusätzlich eine spezifische Bande für das C-Allel darstellen (Abbildung 8, Probe 7, oberste Bande), was sich in den anderen Zelllinien nicht vergleichbar reproduzieren ließ. Zusammenfassend scheint die Ausprägung der Bindungen in den drei Prostatakarzinomzelllinien an Stärke zu variieren, was auf individuelle Eigenschaften bzw. Veränderungen in den tumorösen Geweben hindeutet. In der Gesamtheit zeigen diese Ergebnisse die Funktionalität der Zellkernextrakte, veranschaulichen aber auch die erwartete Heterogenität des Bindungsverhaltens von Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelllinien beim Polymorphismus *FNTB-609*.

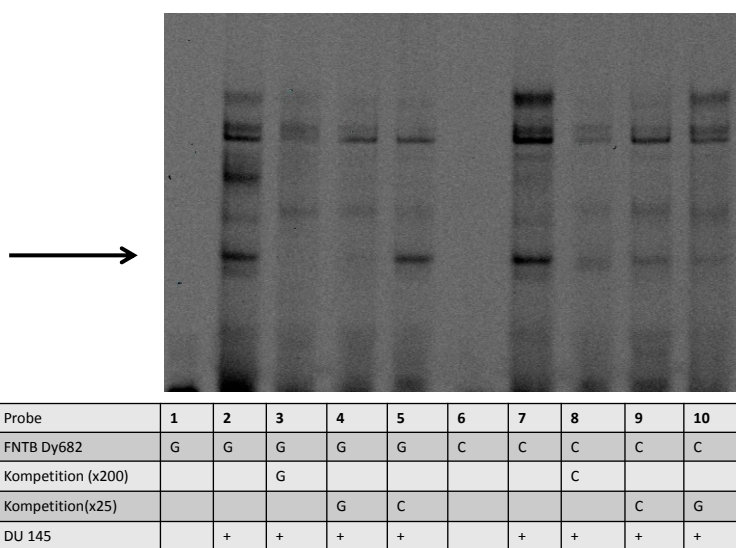
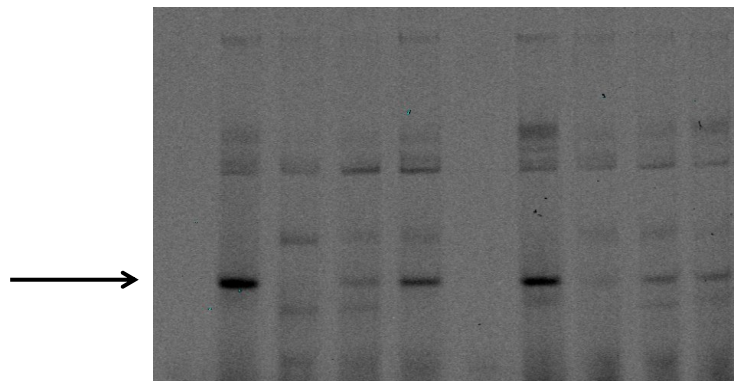


Abbildung 8 : EMSA des SNP *FNTB-609* mit Zellkernextrakten aus DU 145 (Prostatakarzinom-) Zellen

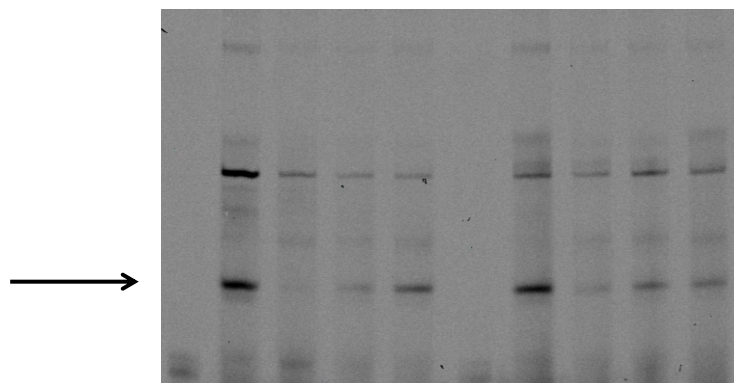
In Probe 1 und 6 kommen ohne den Zusatz von Zellkernextrakten keine Bindungen zur Darstellung. Bei den Proben 2,4,5,7,9,10 zeigt sich je am oberen Bildrand eine (fett schwarze) unspezifische Bande des markierten Oligonukleotid/Proteinkomplexes. Bei Probe 2,5 und 9 zeigt sich je eine zusätzliche, retardierte Bande (Pfeil), welche bei Probe 5 auf die spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an das Oligonukleotid GG hinweist. Zudem zeigt sich am obersten Bildrand bei Probe 7 eine spezifische Bande für das CC Oligonukleotid.



Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FNTB Dy682	G	G	G	G	G	C	C	C	C	C
Kompetition (x200)			G					C		
Kompetition(x25)				G	C				C	G
PC3		+	+	+	+		+	+	+	+

Abbildung 9 : EMSA des SNP *FNTB-609* mit Zellkernextrakten aus PC3 (Prostatakarzinom-) Zellen

In Probe 1 und 6 kommen in Abwesenheit von Zellkernextrakten ebenfalls keine Bindungen zur Darstellung. Bei den Proben 2,4,5,7,9,10 zeigt sich je am oberen Bildrand eine schwach ausgeprägte unspezifische Bande des markierten Oligonukleotid/Proteinkomplexes. Bei Probe 2,5 und 9 zeigt sich je die zusätzliche, spezifische Bande (Pfeil), die auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren an das Oligonukleotid GG zurückzuführen ist.



Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FNTB Dy682	G	G	G	G	G	C	C	C	C	C
Kompetition (x200)			G					C		
Kompetition(x25)				G	C				C	G
LNCAP		+	+	+	+		+	+	+	+

Abbildung 10 : EMSA des SNP *FNTB-609* mit Zellkernextrakten aus LNCaP (Prostatakarzinom-) Zellen

In Probe 1 und 6 kommen in Abwesenheit von Zellkernextrakten keine Bindungen zur Darstellung. Bei den Proben 2,4,5,7,9,10 zeigt sich je am oberen Bildrand eine schwach ausgeprägte unspezifische Bande des markierten Oligonukleotid/Proteinkomplexes. Bei Probe 2,5 und 9 zeigt sich eindeutig eine zusätzliche, spezifische Bande (Pfeil), die auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren an das Oligonukleotid GG zurückzuführen ist. Die schwach sichtbaren Banden in 9 und 10 sind a.e. auf Artefakte zurückzuführen.

Bei den Untersuchungen zum Polymorphismus *FNTB-173* und *FNTB-179* (Abbildungen 11 und 12) zeigten sich bei Verwendung der Zellkernextrakte aus LNCaP und DU145 Zellen ebenfalls vergleichbare Bandenmuster für beide Prostatazelllinien. Es wurden 50fmol/ μ l gelabeltes Oligonukleotid (FNTB 5G Dy 682, FNTB 6G Dy 682 oder FNTB 6GA Dy 682), ungelabeltes Oligonukleotid in 25-fachem Überschuss (1,25pmol/ μ l) und eine konstante Konzentration von 5 μ g Zellkernextrakten pro Probe eingesetzt. Beim Einsatz von Zellkernextrakten aus DU145-Zellen zeigten sich keine Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den Genotypen des Polymorphismus *FNTB-173* (Abbildung 11, Pfeile 1-3). Bei der gekoppelten Analyse des Genotyps *FNTB 6G/179A* ergibt sich eine Verschiebung des Bandenmusters (Abbildung 11 und 12, Pfeil 3), was auf eine spezifische Bindung mehrerer und möglicherweise auch anderer Transkriptionsfaktoren als bei *FNTB -173* hinweisen könnte.

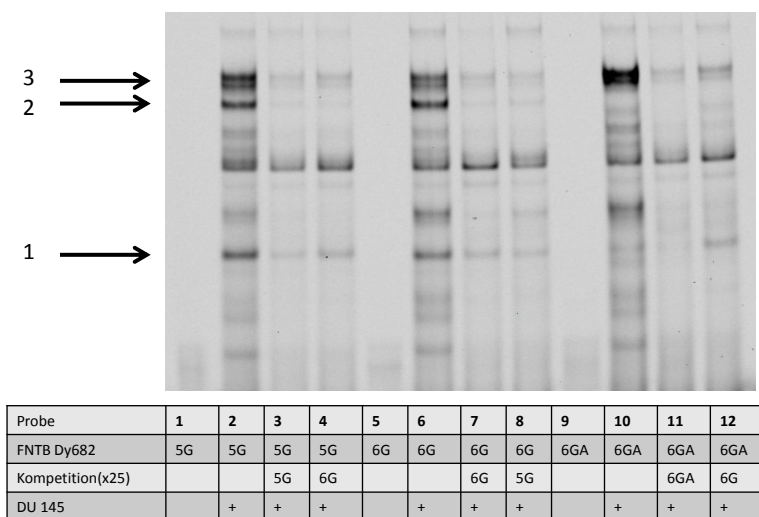


Abbildung 11: EMSA der SNPs *FNTB-173* und *FNTB-179* mit Zellkernextrakten aus DU145 (Prostatakarzinom-) Zellen

In Probe 1,5 und 9 kommen in Abwesenheit von Zellkernextrakten keine Bindungen zur Darstellung. Bei den Proben 2 ,6 und 10 zeigen sich je spezifischen Banden des markierten Oligonukleotid/Proteinkomplexes (Pfeile 1-3), die bei der Kompetition bei Probe 3,4,7,8, 11 und 12 werden diese unterdrückt. Die Transkriptionsfaktoren binden sowohl an das 5G- als auch an das 6G-Allel.

Bei der Verwendung von LNCaP-Zellen (Abbildung 12, Pfeil 1) konnte eine im Vergleich zum 5G-Genotyp (Probe 2) stärkere Bindung des 6G-Genotyps (Probe 6) an Transkriptionsfaktoren festgestellt werden. Zudem wurde durch Gegenkompetition

mit ungelabeltem 5G-Oligonukleotid im Überschuss diese Bande nicht vollständig aufgehoben (Abbildung 12, Probe 8, Pfeil 1), was auf eine spezifischere Bindung von Transkriptionsfaktoren an den FNTB-173 6G Genotyp in dieser Zelllinie hinweist.

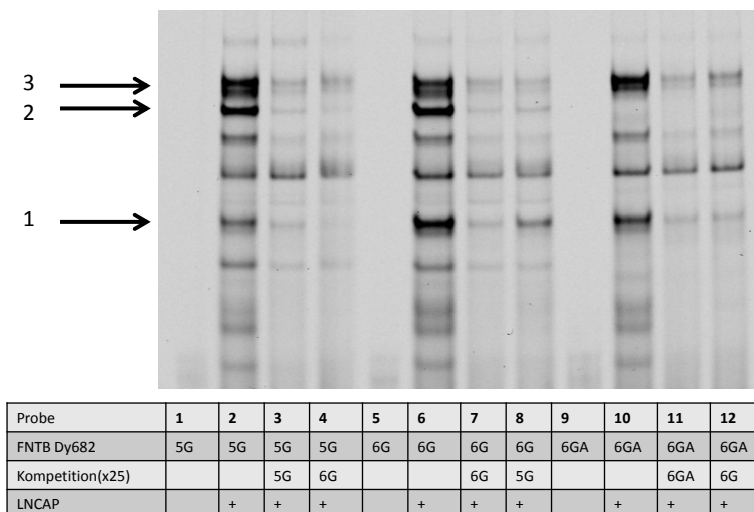


Abbildung 12: EMSA der SNPs *FNTB-173* und *FNTB-179* mit Zellkernextrakten aus LNCaP (Prostatakarzinom-) Zellen

In Probe 1,5 und 9 kommen in Abwesenheit von Zellkernextrakten keine Bindungen zur Darstellung. Bei den Proben 2 ,6 und 10 zeigen sich je die ausgeprägtesten spezifischen Banden des markierten Oligonukleotid/Proteinkomplexes (Pfeile 1-3), die bei der jeweiligen Konkurrenz bei Probe 3,4,7, 11 und 12 unterdrückt werden. Bei Probe 8 zeigt sich eindeutig eine zusätzliche, spezifische Bande (Pfeil 1), die auf eine stärkere Bindung von Transkriptionsfaktoren an das Oligonukleotid 6G zurückzuführen ist.

3.2 Einfluss der Genotypen auf die Promotoraktivität (Reporter Assay)

In Reporter Assays wurde die Promotoraktivität des *FNTB*-Gens in Abhängigkeit vom Haplotyp in den 3 Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, PC3 und DU145 untersucht. Hierbei wurden die Polymorphismen *FNTB -609 (G/C)*, *FNTB -173 (5G/6G)* und *FNTB -179 (T/A)* der *FNTB* Promotorregion analysiert (vergleiche auch Abbildung 14) indem die in relevanter Häufigkeit vorkommenden (Lazik A, 2010) Allelkombinationen CT5G, GT5G, GT6G, CT6G und GA6G in den Vektor pGL4.10 kloniert wurden. In Abhängigkeit der Promotoraktivität wird die entsprechende Kopienzahl an mRNA transkribiert und letztlich in das Enzym Luciferase translatiert. Die gemessene enzymatische Aktivität lässt somit indirekt Rückschlüsse auf die Promotoraktivität zu. Diese kann als Vielfaches der Basic-Aktivität des Vektors angegeben werden. Es konnten für LNCaP und DU145 Zelllinien signifikante

Unterschiede bezüglich der Haplotypen dargestellt werden (LNCaP: $p=0,004$; DU 145 0,028). Auch die Aktivitätsverteilung verhielt sich gleich für diese beiden Zelllinien. Am schwächsten war die Promotoraktivität für den Haplotyp CT5G. Die Haplotypen GT5G und CT6G nahmen eine intermediäre Stellung ein, während der Haplotyp GT6G und GA6G die stärkste Promotoraktivität besaß (Abbildung 13). In der Zelllinie PC3 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,6733$). Auch die haplotypenabhängige Promotoraktivität verhielt sich die abweichend: Der Haplotyp CT6G besaß die stärkste Promotoraktivität während der Haplotyp GGT 6G am schwächsten exprimiert wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Polymorphismen die Promotoraktivität des *FNTB*-Gens und so die Expression der β -Untereinheit der FTase beeinflussen können, hierbei aber auch ein interindividuell heterogenes Aktivitätsmuster beobachtet werden kann.

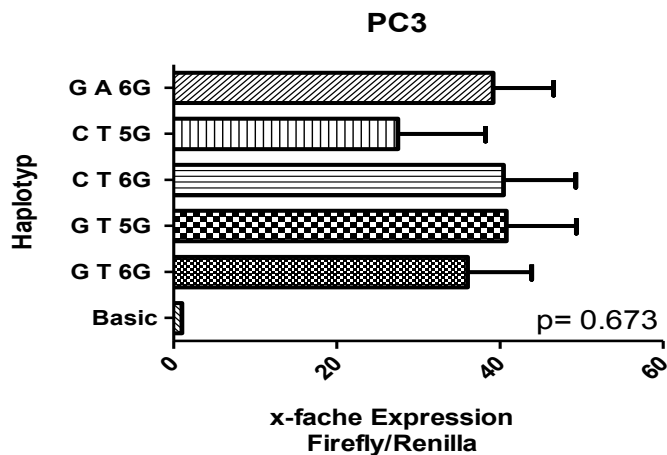
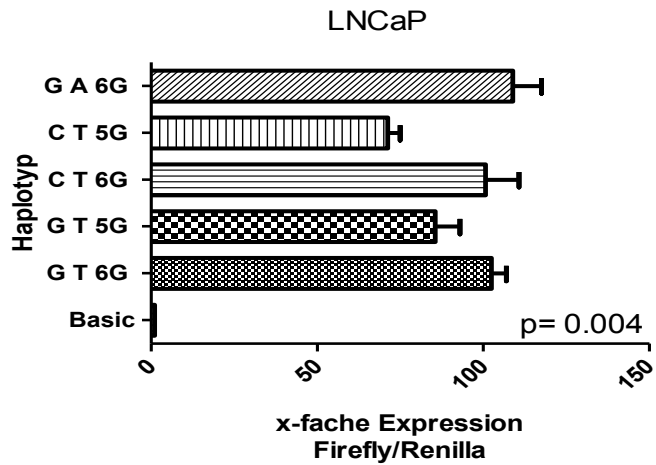
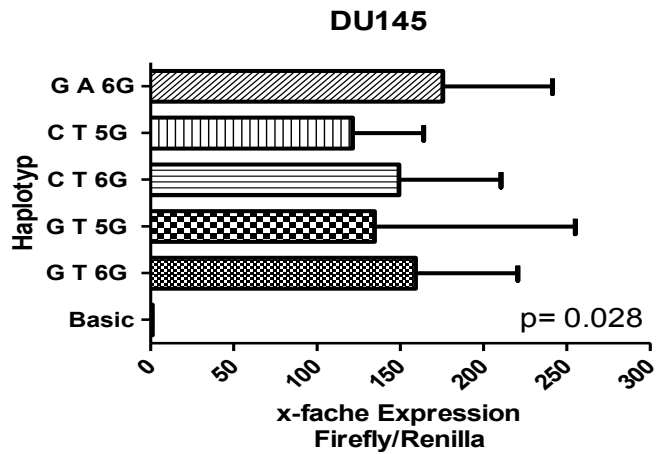


Abbildung 13: Darstellung der haplotypenabhängigen Promotoraktivität

In Abhängigkeit vom Haplotyp (GA6G, CT5G, CT6G, GT5G, GT6G) ist in den Prostatakarzinomzelllinien DU145 und LNCaP eine signifikant unterschiedliche Promotoraktivität ($p=0,028$ und $p=0,004$) des FNTB-Gens mittels Reporter Assays detektierbar. In PC3 Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied der Promotoraktivität darstellen.

3.3. Verteilung der Polymorphismen *FNTB* -609, -179 und -173 beim Prostatakarcinom

Die untersuchten Polymorphismen im *FNTB* Promotor waren bereits in der SNP-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) registriert und unabhängig validiert was auch in Vorarbeiten (Lazik A, 2010) bestätigt werden konnte.

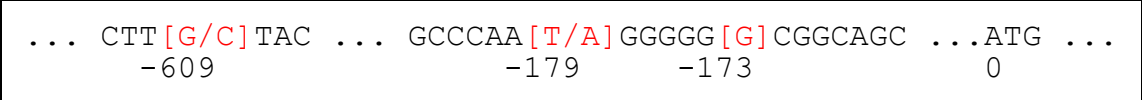


Abbildung 14 : Schematische Darstellung der Bezeichnung und Lage der Polymorphismen im Promoter des *FNTB* Gens

Die Verteilung der Genotypen und die Allelfrequenzen der Polymorphismen *FNTB* -609, *FNTB* -179 und *FNTB* -173 wurde in zwei unabhängigen Prostatakarcinomkollektiven untersucht. Ergebnisse der Genotypisierungen sind jeweils in den Tabellen 4 bis 9 dargestellt. Die Verteilung der Genotypen befand sich jeweils im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Allelfrequenzen bei den Genotypen -609 und -173 verteilten sich auf einem ähnlichen Niveau. Der Polymorphismus *FNTB* -179 war mit einer Allelfrequenz für das A-Allel entsprechend der tabellarischen Aufführung von 0,01 und 0,02 respektive in beiden Kollektiven relativ selten.

Prostatakarcinom (Essener Kollektiv)

Das Gesamtkollektiv der Essener Prostatakarcinome betrug $n=223$, es konnten nur die jeweils angegebenen Fälle pro entsprechenden SNP ausgewertet werden, da einige Proben trotz mindestens dreimaliger Versuchswiederholung nicht oder nicht eindeutig zu genotypisieren waren.

Tabelle 4: Genotypen und Allelfrequenz des SNPs -609 beim Prostatakarcinom

Genotyp	Absolute Häufigkeit /n=222	Relative Häufigkeit (%)
GG	80	36
GC	114	41,4
CC	28	12,6
Allelfrequenz G=0,62		
Allelfrequenz C=0,38 p=0,19		

Tabelle 5: Genotypen und Allelfrequenz des SNPs -179 beim Prostatakarzinom

Genotyp	Absolute Häufigkeit/n=213	Relative Häufigkeit (%)
TT	207	97,2
TA	6	2,8
AA	0	0
Allelfrequenz T=0,99		
Allelfrequenz A=0,01 p=0,83		

Tabelle 6: Genotypen und Allelfrequenz des SNPs -173 beim Prostatakarzinom

Genotyp	Absolute Häufigkeit/n=217	Relative Häufigkeit (%)
6G/6G	123	56,7
6G/5G	87	40,1
5G/5G	7	3,2
Allelfrequenz 6G= 0,77		
Allelfrequenz 5G= 0,23 p= 0,07		

Prostatakarzinom (Bonner Kollektiv)

Das Gesamtkollektiv der Bonner Prostatakarzinome betrug n= 238. Auch in diesem Kollektiv waren einige Proben trotz mindestens dreimaliger Versuchswiederholung nicht oder nicht eindeutig zu genotypisieren. Es sind entsprechend nur die auswertbaren, absoluten Fälle pro SNP angegeben.

Tabelle 7: Genotypen und Allelfrequenz des SNPs -609 beim Prostatakarzinom

Genotyp	Absolute Häufigkeit/n=168	Relative Häufigkeit (%)
GG	37	22,4
GC	85	49,9
CC	46	27,7
Allelfrequenz G=0,53		
Allelfrequenz C=0,47 p= 0,84		

Tabelle 8: Genotypen und Allelfrequenz des SNPs -179 beim Prostatakarzinom

Genotyp	Absolute Häufigkeit/n=156	Relative Häufigkeit (%)
TT	149	95,5
TA	7	4,5
AA	0	0
Allelfrequenz T=0,98		
Allelfrequenz A=0,02 p= 0,77		

Tabelle 9: Genotypen und Allelfrequenz des SNPs -173 beim Prostatakarzinom

Genotyp	Absolute Häufigkeit/n=159	Relative Häufigkeit (%)
6G/6G	87	54,7
6G/5G	60	37,7
5G/5G	12	7,5
Allelfrequenz 6G= 0,74		
Allelfrequenz 5G= 0,26 p= 0,71		

3.4 Bedeutung und Auswirkung der Polymorphismen *FNTB* -609, -179 und -173 beim Prostatakarzinom

Um den Stellenwert der *FNTB* Promotorpolymorphismen beim Prostatakarzinom zu untersuchen, erfolgte eine Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern Alter, PSA-Wert, TNM-Stadium, Tumorgrading und Gleason-Score der zwei unabhängigen Patientenkollektive aus Essen und Bonn. Zudem wurde die prognostische Wertigkeit der einzelnen Polymorphismen im Hinblick auf Rückfallrisiko und krankheitsfreiem (Bonner Kollektiv) bzw. Gesamtüberleben (Essener Kollektiv) analysiert.

Tabelle 10. Klinisch-pathologische Eigenschaften bei Erstdiagnose und Genotypenverteilung des Polymorphismus *FNTB-609* bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Essen)

	Alle	<i>FNTB-609</i>			p
		CC	GC	GG	
n (%)	222	28	114	80	
Alter (Mittelwert +/-SD)	63,1 +/- 6,7	64,6 +/- 5,0	63,0 +/- 7,2	62,7 +/- 6,5	0,833
PSA (Mittelwert +/- SD (ng/ml, n= 196))	20,4 +/- 28,7	14,6 +/- 13,3	22,7 +/- 3,6	18,4 +/- 22,3	0,718
T- Stadium (n=222)		28	114	80	0,258
T1	14 (6,3)	3(10,7)	6(5,3)	5(6,3)	
T2	107 (48,2)	11(39,3)	59(51,8)	37(46,3)	
T3	88 (39,6)	13(46,4)	44(38,6)	31(38,8)	
T4	13 (5,9)	1(3,6)	5(4,4)	7 (8,8)	
N- Stadium (n=206)		24	105	77	0,413
N0	183 (88,8)	21(87,5)	96(91,4)	66(85,9)	
N1	16 (7,8)	3(12,5)	4(3,8)	9(11,7)	
N2	4 (1,9)	-	3(2,9)	1(1,3)	
N3	3 (1,5)	-	2(1,9)	1(1,3)	
M- Stadium (n=206)		25	108	73	0,811
M0	198 (96,1)	24(96)	103(95,4)	71(97,3)	
M1	8 (3,9)	1(4)	5(4,6)	2(2,7)	
Grading (n=220)		27	113	80	0,486
G1	36 (16,4)	4(14,8)	15(13,3)	17(21,3)	
G2	140 (63,6)	17(63,0)	72(63,7)	51(63,7)	
G3	44 (20,0)	6(22,2)	26(23,0)	12(15,0)	

Tabelle 11. Klinisch-pathologische Eigenschaften bei Erstdiagnose und Genotypenverteilung des Polymorphismus *FNTB-179* bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Essen)

	Alle	<i>FNTB-179</i>			p
		AA	TA	TT	
n (%)	222	-	6	207	
Alter (Mittelwert +/-SD)	63,1 +/- 6,7	-	63,8 +/- 8,1	63,3 +/- 6,6	0,572
PSA (Mittelwert +/- SD (ng/ml, n= 196))	20,4 +/- 28,7	-	20,7 +/- 8,4	20,5 +/- 29,3	0,715
T- Stadium (n=222)		-	6	207	0,057
T1	14 (6,3)	-	-	14(6,8)	
T2	107 (48,2)	-	2(33,3)	100(48,3)	
T3	88 (39,6)	-	2(33,3)	83(40,1)	
T4	13 (5,9)	-	2(33,3)	10(4,8)	
N- Stadium (n=206)		-	6	191	0,115
N0	183 (88,8)	-	4(66,7)	171(89,5)	
N1	16 (7,8)	-	2(33,3)	13(6,8)	
N2	4 (1,9)	-	-	4(2,1)	
N3	3 (1,5)	-	-	3(1,6)	
M- Stadium (n=206)		-	5	193	0,642
M0	198 (96,1)	-	5(100)	185(95,1)	
M1	8 (3,9)	-	-	8(4,1)	
Grading (n=220)		-	6	205	0,487
G1	36 (16,4)	-	-	35(17,1)	
G2	140 (63,6)	-	5(83,3)	129(62,9)	
G3	44 (20,0)	-	1(16,7)	41(20,0)	

Tabelle 12. Klinisch-pathologische Eigenschaften bei Erstdiagnose und Genotypenverteilung des Polymorphismus *FNTB-173* bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Essen)

	Alle	<i>FNTB-173</i>			p
		5G/5G	5G/6G	6G/6G	
n (%)	222	7	87	123	
Alter (Mittelwert +/-SD)	63,1 +/- 6,7	63 +/-7,2	64,4 +/- 6,1	62,2+/- 7,0	0,579
PSA (Mittelwert +/- SD (ng/ml, n= 196))	20,4 +/- 28,7	13,9 +/- 8,0	18,3 +/- 22,6	20,8 +/- 30,1	0,960
T- Stadium (n=222)		7	87	123	0,470
T1	14 (6,3)	-	8(92,0)	6(4,9)	
T2	107 (48,2)	3(42,9)	43(49,4)	60(48,8)	
T3	88 (39,6)	4(57,1)	34(39,1)	47(38,2)	
T4	13 (5,9)	-	2(2,3)	10(8,1)	
N- Stadium (n=206)		7	80	115	0,283
N0	183 (88,8)	5(71,4)	74(92,5)	101(87,0)	
N1	16 (7,8)	2(28,6)	3(3,8)	11(9,6)	
N2	4 (1,9)	-	2(2,5)	1(0,9)	
N3	3 (1,5)	-	1(1,3)	2(1,7)	
M- Stadium (n=206)		7	83	112	0,650
M0	198 (96,1)	7(100)	81(97,6)	107(95,5)	
M1	8 (3,9)	-	2(2,4)	5(4,5)	
Grading (n=220)		6	86	123	0,383
G1	36 (16,4)	1(16,7)	9(10,5)	26(21,1)	
G2	140 (63,6)	4(66,7)	59(68,6)	74(60,2)	
G3	44 (20,0)	1(16,7)	18(20,9)	23(18,7)	

Tabelle 13. Klinisch-pathologische Eigenschaften bei Erstdiagnose und Genotypenverteilung des Polymorphismus *FNTB-609* bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Bonn)

	Alle	<i>FNTB-609</i>			p
		CC	GC	GG	
n (%)	119	28	61	30	
T- Stadium (n=119)		28	61	30	0,957
T1	1(0,8)	-	1(1,6)	-	
T2	73 (61,3)	16(57,1)	37(60,7)	20(66,7)	
T3	41 (34,5)	11(39,3)	21(34,4)	9(30,0)	
T4	4 (3,4)	1 (3,6)	2(3,3)	1(3,3)	
N- Stadium (n=118)		28	60	30	0,745
N0	113 (95,8)	27(96,4)	58(96,7)	28(93,3)	
N1	5(4,2)	1(3,6)	2(3,3)	2(6,7)	
N2	-	-	-	-	
N3	-	-	-	-	
Gleason Score (n=119)		28	61	30	0,306
2-6	57 (47,9)	12(42,9)	27(44,3)	18(60,0)	
7-10	62 (52,1)	16(57,1)	34(55,7)	12(40,0)	

Tabelle 14. Klinisch-pathologische Eigenschaften bei Erstdiagnose und Genotypenverteilung des Polymorphismus *FNTB-179* bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Bonn)

n (%)	Alle	<i>FNTB-179</i>			p
		AA	TA	TT	
	107	-	5	102	
T- Stadium (n=107)		-	5	102	0,815
T1	1(0,9)	-	-	1(1,0)	
T2	64 (59,8)	-	4(80,0)	60(58,8)	
T3	39 (36,4)	-	1(20,0)	38(37,3)	
T4	3 (2,8)	-	-	3(2,8)	
N- Stadium (n=106)		-	5	101	0,612
N0	101 (95,3)	-	5(100,0)	96(95,0)	
N1	5(4,7)	-	-	5(,0)	
N2	-	-	-	-	
N3	-	-	-	-	
Gleason Score (n=107)		-	5	102	0,236
2-6	49(45,8)	-	1(20,0)	48(47,1)	
7-10	58 (54,2)	-	4(80,0)	54(52,9)	

Tabelle 15. Klinisch-pathologische Eigenschaften bei Erstdiagnose und Genotypenverteilung des Polymorphismus *FNTB-173* bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Bonn)

n (%)	Alle	<i>FNTB-173</i>			p
		5G/5G	5G/6G	6G/6G	
	119	8	41	70	
T- Stadium (n=119)		8	41	70	0,516
T1	1(0,8)	-	1(2,4)	-	
T2	73 (61,3)	3(37,5)	26(63,4)	44(62,9)	
T3	41 (34,5)	5(62,5)	13(31,7)	23(32,9)	
T4	4 (3,4)	-	1(2,4)	3(4,3)	
N- Stadium (n=118)		8	40	70	0,174
N0	113 (95,8)	7(87,5)	40(100)	66(94,3)	
N1	5(4,2)	1(12,5)	-	4(5,7)	
N2	-	-	-	-	
N3	-	-	-	-	
Gleason Score (n=119)		8	41	70	0,691
2-6	57 (47,9)	5(62,5)	19(46,3)	33(47,1)	
7-10	62 (52,1)	3(37,5)	22(53,7)	37(52,9)	

Bei allen 3 untersuchten Polymorphismen zeigten sich im Essener Patientenkollektiv keine signifikanten Unterschiede bezüglich der klinisch-pathologischen Charakteristika zwischen den verschiedenen Genotypen (Tabellen 10-12). Auch im Bonner Kollektiv zeigten sich bei allen 3 untersuchten Polymorphismen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten klinisch-pathologischen Parameter (Tabellen 13-15). Zusammenfassend ist somit von zwei homogenen Patientenkollektiven auszugehen, da sich die Verteilung der untersuchten klinisch-pathologischen Parameter nicht innerhalb

der verschiedenen Genotypen der analysierten Polymorphismen unterschieden. Bezüglich der prognostischen Bedeutung beeinflusste der *FNTB*-609 Polymorphismus das krankheitsfreie Überleben im Essener Patientenkollektiv. Patienten mit dem *FNTB*-609 CC Genotyp hatten ein signifikant ($p=0,006$) verkürztes krankheitsfreies medianes Überleben im Vergleich zu Patienten mit dem GC Genotyp oder dem GG Genotyp (Abbildung 15). Aufgrund fehlender Daten für die Zeitspanne bis zum Auftreten von Metastasen im Bonner Kollektiv konnte eine vergleichende Analyse nicht erfolgen.

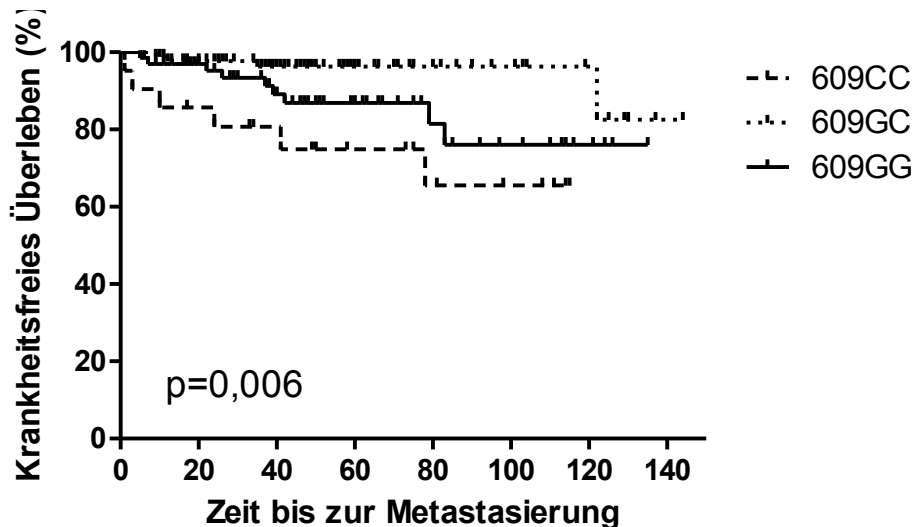


Abbildung 15: Krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Essen). Der -609 CC Genotyp ist mit dem kürzesten krankheitsfreien Überleben assoziiert.

Tabelle 16: Univariate und multivariate Analyse für den *FNTB* -609 Polymorphismus (Kollektiv Essen)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% CI)	p- Wert	HR (95% CI)	p- Wert
-609 C>G				
CC	1 ¹		1 ¹	
GC	0,117 (0,03-0,47)	0,003	0,08 (0,01-0,42)	0,003
GG	0,503 (0,17-,41)	0,194	0,50 (0,16-1,56)	0,238
Stadium				
T1+2	1 ¹		1 ¹	
T3	4,62 (1,49- 14,43)	0,008	2,95 (0,90-9,70)	0,074
T4	14,9 (3,17-68,96)	0,001	13,11 (0,455-377,593)	0,135
Nodalstatus				
N0	1 ¹		1 ¹	
N+	0,84 (0,19-3,75)	0,823	1,24 (0,25-5,941)	0,789
Grading				
G1	1 ¹		1 ¹	
G2	37,80 (0,142-100081,62)	0,209	522461,78 (n.a.)	0,976
G3	65,13 (0,21-19362,19)	0,154	44492,68 (0,00-3,40x10 ¹⁶⁷)	0,955

¹ Referenzgruppe. Faktoren die das Rückfallrisiko beeinflussen

In der univariaten Cox-Regressions-Analyse stellt sich der Polymorphismus *FNTB*-609 GC als günstiger prognostischer Faktor bezüglich des krankheitsfreien Überlebens mit einer Risikoreduktion von 88% gegenüber dem *FNTB*-609 CC Genotyp dar. Auch in der multivariaten Analyse bestätigt sich der Faktor als unabhängige Einflussgröße. Darüber hinaus bestätigt sich, dass ein höheres T- Stadium mit einem erhöhten Risiko einhergeht (Tabelle 16). Die Polymorphismen *FNTB*-173 oder *FNTB*-179 beeinflussten weder das krankheitsfreie Überleben noch das Gesamtüberleben in beiden Prostatakarzinomkollektiven. In der kombinierten Analyse der Polymorphismen *FNTB*-609 und *FNTB*-173 in dem in Bonn generierten Prostatakarzinomkollektiv (n=119 auswertbare Fälle) konnte gezeigt werden, dass Patienten mit dem *FNTB*-609 CC Genotyp (n=28) ein verkürztes krankheitsfreies Überleben grenzwertiger Signifikanz hatten, wenn sie zusätzlich den *FNTB*-173 5G/5G Genotyp trugen (p= 0,05 (Abbildung 16)).

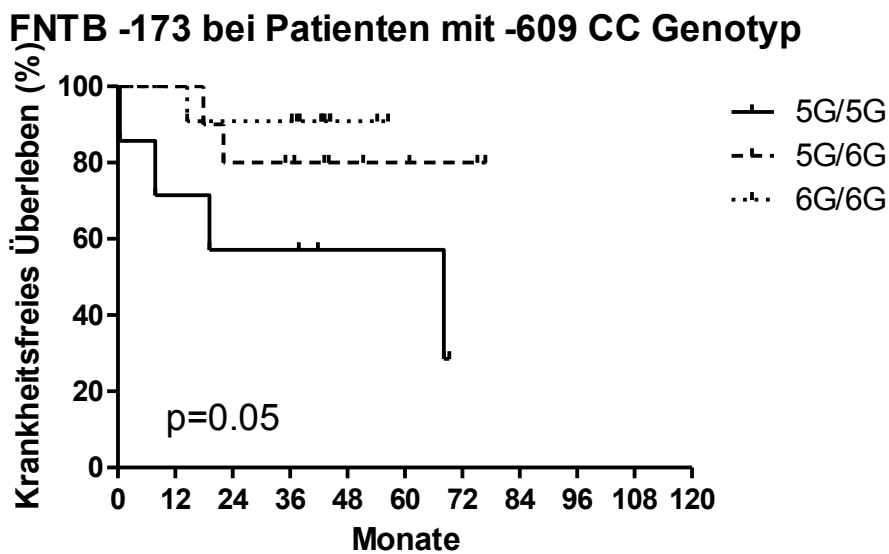


Abbildung 16: Krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Bonn) und kombiniertem *FNTB* -173 und -609 CC Genotyp, Kaplan -Meyer Analyse

Tabelle 17: Univariate und multivariate Analyse für den *FNTB-609CC* Genotyp (Kollektiv Bonn)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% CI)	p- Wert	HR (95% CI)	p- Wert
Rückfallrisiko				
<i>FNTB -173</i>				
5G/5G	1 ¹		1 ¹	
5G/6G	0,30 (0,06- 1,67)	0,169	0,43 (0,06- 2,84)	0,378
6G/6G	0,18 (0,02-1,70)	0,133	0,28 (0,02-4,29)	0,363
Stadium				
T1+2	1 ¹		1 ¹	
T3	3,96 (0,72- 21,84)	0,115	1,85 (0,29-11,93)	0,517
T4	1 (0.004-145,78)	1,0	1 (0-4752,03)	1,0
Gleason				
2-6	1 ¹		1 ¹	
7-10	0,824 (0,18-3,725)	0,802	1.11 (0,18-6,79)	0,909
Nodalstatus				
N0	1 ¹		1 ¹	
N+	6,23 (0,70-55,81)	0,102	1,79 (0,14- 23,44)	0,657

¹ Referenzgruppe. Faktoren die das Rückfallrisiko beeinflussen

Interessanterweise zeigte sich jedoch bei Patienten mit dem *FNTB-609* GG oder GC Genotyp (n=91) das längste krankheitsfreie Überleben, wenn die Patienten zusätzlich den *FNTB-173* 5G/5G Genotyp trugen, jedoch ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz (p= 0,11 (Abbildung 17)).

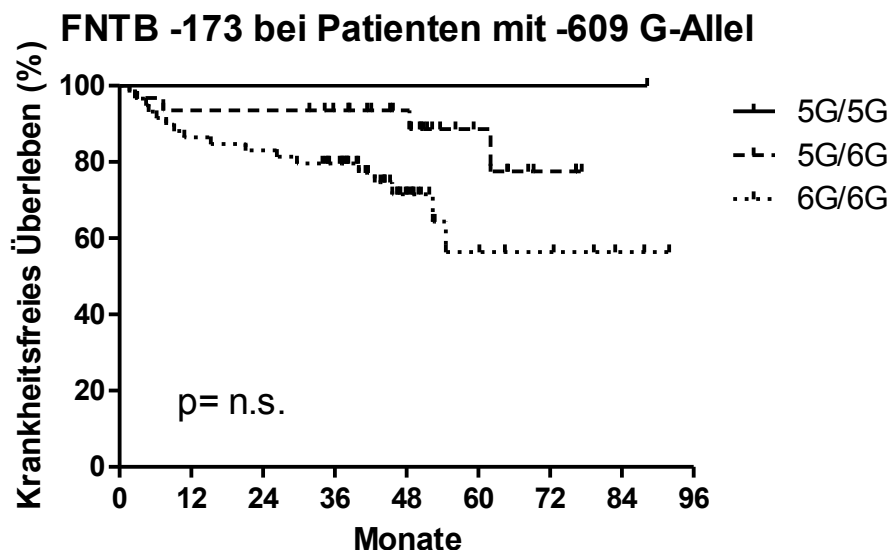


Abbildung 17: Krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Bonn) und kombiniertem *FNTB -173* und -609 G Allel

Tabelle 18: Univariate und multivariate Analyse für *FNTB* -609G Allelträger (Kollektiv Bonn)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% CI)	p- Wert	HR (95% CI)	p- Wert
Rückfallrisiko				
<i>FNTB</i> -173				
5G/5G	1 ¹		1 ¹	
5G/6G	22.64 (0.00-3.96x10 ⁹)	0.747	2,16x10 ⁴ (0.00-4.62x10 ²⁷⁰)	0.957
6G/6G	0.85 (0.08-9.24)	0.893	0.867 (0.074-10.193)	0.910
Stadium				
T1+2	1 ¹		1 ¹	
T3	2.436 (1.007-5.895)	0.048	2.32 (0.93-5.826)	0.0724
T4	5.001 (1.054-23.730)	0.043	4.9 (0.58--41.43)	0.1451
Gleason				
2-6	1 ¹		1 ¹	
7-10	2.197 (0.8445-7.21)	0.107	2.32 (0.89-6.10)	0.086
Nodalstatus				
N0	1 ¹		1 ¹	
N+	1.607 (0.328-7.872)	0.558	0.4 (0.06-2.61)	0.338

¹ Referenzgruppe. Faktoren die das Rückfallrisiko beeinflussen

Für die univariate Cox-Regressions-Analyse ergibt sich für *FNTB*-609G Allelträger (-609GG und -609GC) ein erwarteter signifikanter Einfluss des T-Stadiums auf das krankheitsfreie Überleben. In der multivariaten Analyse bestätigt sich lediglich das T-Stadium als unabhängiger Prognoseparameter bezüglich des Rezidivrisikos, der Gleasonscore bleibt mit p= 0.086 knapp oberhalb des Signifikanzniveaus (vergleiche Tabelle 18). In dem unabhängigen Prostatakarzinomkollektiv aus Essen (mit n= 159 auswertbaren Fällen) zeigten sich ähnliche Ergebnisse in Bezug auf das Gesamtüberleben, jedoch nicht mit Erreichen einer statistischen Signifikanz (siehe Abbildung 18). Dennoch zeigt sich ein klarer Trend, dass Patienten mit dem Polymorphismus *FNTB* -173 5G /5G in Verbindung mit dem *FNTB* -609 G Allel (-609 GG und GC n=194) ein verlängertes Gesamtüberleben haben.

FNTB -173 bei Patienten mit -609 G-Allel

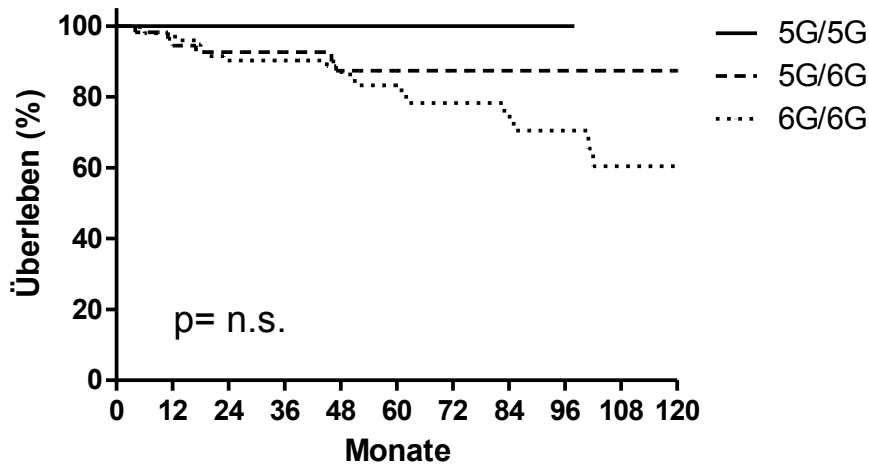


Abbildung 18: Gesamtüberleben bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Essen) und kombiniertem *FNTB* -173 und -609 G Allel

Tabelle 19: Univariate und multivariate Analyse für -609G Allelträger (Kollektiv Essen)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% CI)	p- Wert	HR (95% CI)	p- Wert
Sterberisiko				
<i>FNTB</i> -173				
5G/5G	1 ¹		1 ¹	
5G/6G	1,95 (0,23-16,63)	0,542	1,77 (0,18-17,84)	0,629
6G/6G	1,86 (0,13-25,72)	0,644	0,70 (0,01-51,10)	0,873
Stadium				
T1+2	1 ¹		1 ¹	
T3	1,72 (0,94-17,47)	0,060	0,58 (0,18-1,70)	0,346
T4	9,74 (3,70-25,64)	<0,001	12,15 (1,38-106,78)	0,024
Grading				
G1	1 ¹		1 ¹	
G2	4,06 (0,94-17,47)	0,063	3,14 (0,58- 16,78)	0,182
G3	6,23 (3,70-25,64)	0,019	1,53 (0,14-16,57)	0,723
Nodalstatus				
N0	1 ¹		1 ¹	
N+	2,04 (0,81- 5,16)	0,133	1,54 (0,59-4,74)	0,456
Fernmetastasen				
M0	1 ¹		1 ¹	
M1	8,06 (3,17- 20,41)	<0,001	7,68 (1,53-38,67)	0,013

¹ Referenzgruppe. Faktoren die das Rückfallrisiko beeinflussen

In der univariaten Cox-Regressions-Analyse zeigten sich das Tumorstadium (T3 $p=0,06$, T4 $<0,001$), das Grading (G2 $p=0,06$, G3 $p=0,02$) und die Fernmetastasierung ($p<0,001$) als Prognosefaktoren bezüglich des Sterberisikos. In der multivariaten Analyse zeigten sich das T4-Stadium und die Fernmetastasierung als unabhängige Prognosefaktoren bezüglich des Gesamtüberlebens (vergl. Tabelle 19).

FNTB -173 bei Patienten mit -609 CC Genotyp

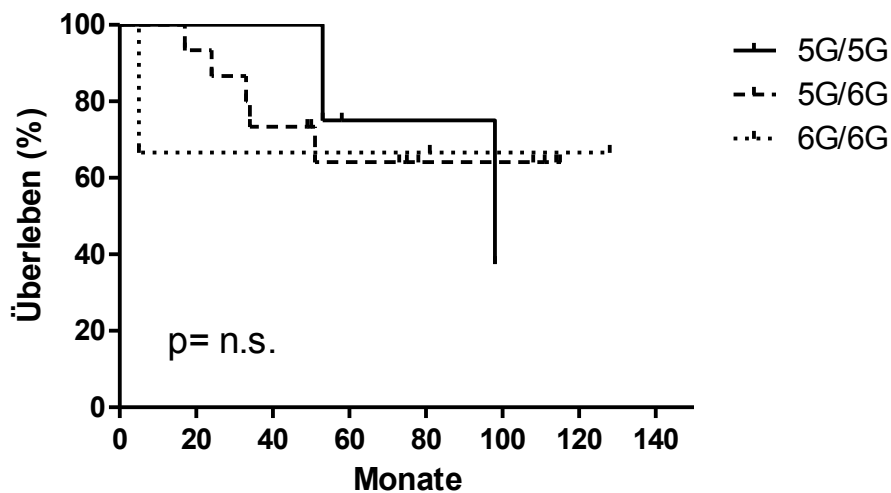


Abbildung 19: Gesamtüberleben bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Essen) und kombiniertem *FNTB* -173 und -609 CC Genotyp

Für den *FNTB*-609 CC Genotyp ($n=28$) zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf das Gesamtüberleben im Essener Kollektiv, wenn die Patienten zusätzlich den *FNTB*-173 5G/5G Genotyp trugen (Abbildung 19). Es zeigt sich eine relativ heterogene Verteilung der *FNTB* -173 Genotypen ohne signifikanten Einfluss auf das Überleben.

Tabelle 20: Univariate und multivariate Analyse für den -609CC Genotyp (Kollektiv Essen)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% CI)	p- Wert	HR (95% CI)	p- Wert
Sterberisiko				
<i>FNTB</i> -173				
5G/5G	1 ¹		1 ¹	
5G/6G	1,22 (0,12-11,96)	0,862	0,00 (0,00-1,83x10 ¹⁹⁶)	0,963
6G/6G	0,02 (0,000-939855,09)	0,681	1 (1-1,50x10 ²⁵)	1,0
Stadium				
T1+2	1 ¹		1 ¹	
T3	73,46 (0,02-235491,33)	0,297	1,69x10 ⁹ (0,00-3,92x10 ²⁸⁸)	0,948
T4	-	-	-	-
Grading				
G1	1 ¹		1 ¹	
G2	35,72 (0,000-12449759,48)	0,583	1(0,00-6,12x10 ²⁰)	1,0
G3	211,40 (0,001-88844857,71)	0,418		
Nodalstatus				
N0	1 ¹		1 ¹	
N+	1,65 (0,14- 18,51)	0,683	0 (0,00-1,08x10 ¹⁶⁵)	0,959
Fernmetastasen				
M0	1 ¹		1 ¹	
M1	16,49(1,03-263,75)	0,048	-	-

¹ Referenzgruppe. Faktoren die das Rückfallrisiko beeinflussen

In der uni- und multivariaten Analyse des *FNTB*-609 CC Genotyps zeigte sich nur die Fernmetastasierung als unabhängiger prognostischer Faktor, der das Gesamtüberleben beeinflusst (p= 0.048). Bezüglich des krankheitsfreien Überlebens zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede bei Patienten mit dem *FNTB*-609 CC Genotyp, wenn sie zusätzlich den *FNTB*-173 5G/5G Genotyp trugen (Abbildung 20).

FNTB -173 bei Patienten mit -609 CC Genotyp

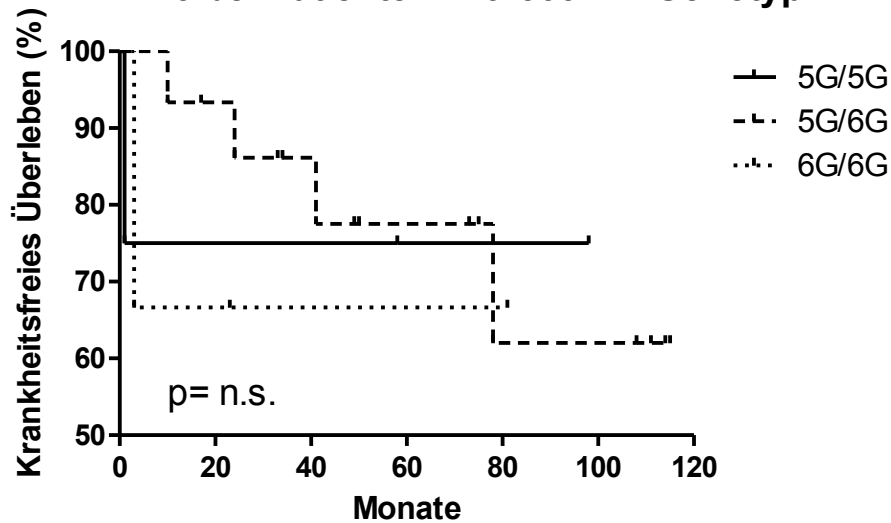


Abbildung 20: Krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Essen) und kombiniertem *FNTB* -173 und -609 CC Genotyp

Tabelle 21: Univariate und multivariate Analyse zum Rezidiv/Metastasierungsrisiko für den -609CC Genotyp (Kollektiv Essen)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% CI)	p- Wert	HR (95% CI)	p- Wert
Risiko Rezidiv/ Metastasierung				
<i>FNTB</i> -173				
5G/5G	1 ¹		1 ¹	
5G/6G	1,10 (0,12-9,98)	0,929	0,00 (0,00-1,43x10 ⁸⁹)	0,919
6G/6G	1,15 (0,07-18,59)	0,919	1 (0,0-1,50x10 ²⁵)	1,0
Stadium				
T1+2	1 ¹		1 ¹	
T3	77,44 (0,05-109101,526)	0,240	1,36 x10 ⁹ (0,00-1,191x10 ¹⁷⁹)	0,915
T4	162845,77(0,00-5,20x10 ¹¹⁹)	0,294	0,00(0,00-n.a.)	0,995
Grading				
G1	1 ¹		1 ¹	
G2	37,79 (0,00-11650599,39)	0,573	0,95(0,00-n.a.)	1,0
G3	76,73 (0,02-253570,94)	0,294	n.a.	
Nodalstatus				
N0	1 ¹		1 ¹	
N+	4,01 (0,66- 24,15)	0,128	1,29(0,12-13,08)	0,826

¹ Referenzgruppe. Faktoren die das Rückfallrisiko beeinflussen

Unabhängige Faktoren, die das krankheitsfreie Überleben beeinflussen ergaben sich in der uni- und multivariaten Analyse für dieses Kollektiv nicht. Auch beim

krankheitsfreien Überleben im Essener Patientenkollektiv, bei Patienten, die das *FNTB*-609 G Allel (GG oder GC) trugen zeigte sich kein Unterschied, wenn die Patienten gleichzeitig den *FNTB*-173 5G/5G Polymorphismus trugen (Abbildung 21). Die uni- und multivariate Cox-Regressions-Analyse zeigte lediglich das Tumorgrading als unabhängigen Risikofaktor für ein Rezidiv (Tabelle 22).

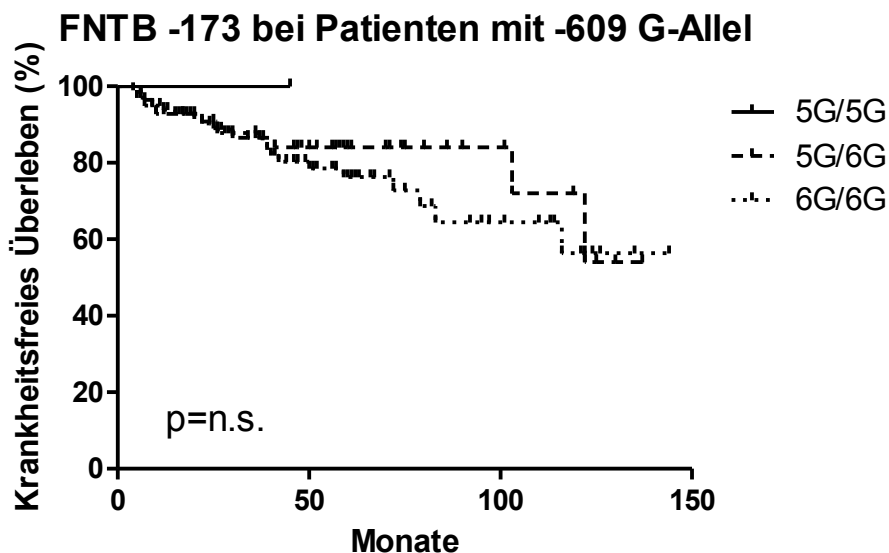


Abbildung 21: Krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv Essen) und kombiniertem *FNTB* -173 und -609 G- Allel

Tabelle 22: Univariate und multivariate Analyse zum Rezidiv/Metastasierungsrisiko für -609G Allel-Träger (Kollektiv Essen)

Variable	Univariate Analyse		Multivariate Analyse	
	HR (95% CI)	p- Wert	HR (95% CI)	p- Wert
Risiko Rezidiv/ Metastasierung				
<i>FNTB</i> -173				
5G/5G	1 ¹		1 ¹	
5G/6G	20,75 (0,00-4,88x10 ¹⁰)	0,783	2843993,57 (0,00-n.a.)	0,997
6G/6G	20,51(0,00-3,93x10 ⁹)	0,756	303389,97 (0,00-n.a.)	0,990
Stadium				
T1+2	1 ¹		1 ¹	
T3	3,15 (1,51-6,56)	0,02	1,74 (0,76-3,99)	0,185
T4	3,34 (0,72-15,47)	0,123	5,26 (0,51-53,68)	0,161
Grading				
G1	1 ¹		1 ¹	
G2	4,04 (0,92-17,60)	0,063	5,14(1,00- 26,31)	0,049
G3	6,13 (1.35-27,86)	0,019	2,33 (0,22-16,49)	0,397
Nodalstatus				
N0	1 ¹		1 ¹	
N+	1,20 (0,42- 3,45)	0,728	0,87(0,25-2,97)	0,827

¹ Referenzgruppe. Faktoren die das Rückfallrisiko beeinflussen

3.5 Expression alternativer Transkripte des *FNTB*- Gens in verschiedenen Geweben

Innerhalb der Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) sind verschiedene Spleißvarianten des *FNTB*-Gens beschrieben, die in der Promotorregion lokalisiert sind (Abbildung 22). Die Expression aller hier untersuchten Spleißvarianten wurde anhand von cDNA verschiedener Tumorzelllinien (Hela, A431, Hek, PC3, LNCaP und Jar) mittels PCR untersucht (Abbildung 23). Hierbei konnten die Transkripte TK12-1, TK12-2, sowie Exon 6B nachgewiesen werden, während der Nachweis einer TK-1-1 Variante, sowie des alternativen TK10-1, welches Exon 6B beinhaltet, nicht gelang.

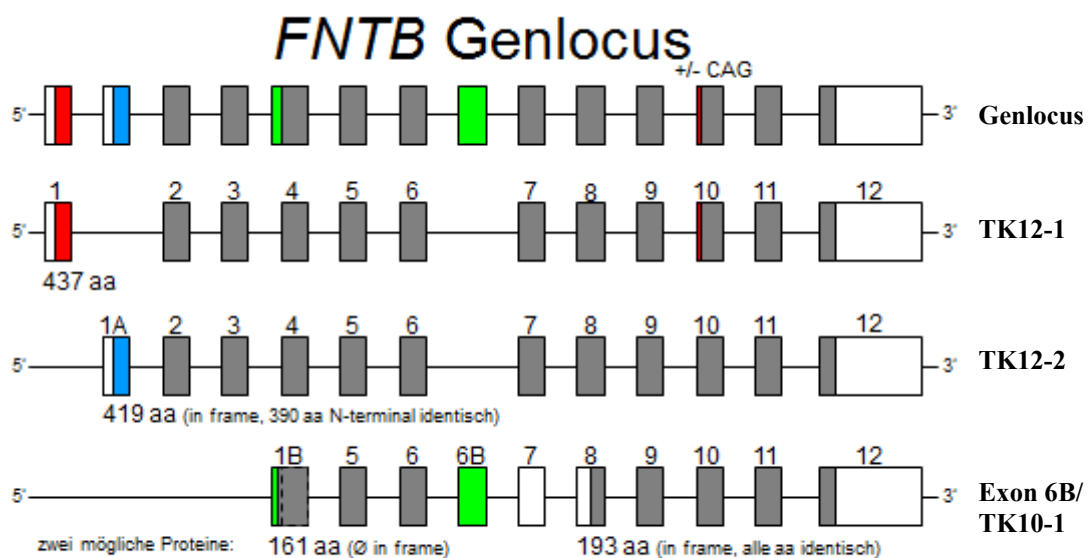


Abbildung 22: Schematische Darstellung der untersuchten Spleißvarianten des *FNTB* Genlocus

Es zeigte sich eine große Homogenität in der Expression der verschiedenen Spleißvarianten, insbesondere Exon 6B, welches sich innerhalb der Spleißvariante TK 10-1 befindet und sich hier in allen 6 verwendeten Zelllinien nachweisen ließ (Abbildung 23). Die Variante TK 10-1 selbst wurde nicht exprimiert. Das alternative Transkript TK 12-1 zeigte ebenfalls eine deutliche Expression, wobei die beiden Prostatakarzinomzelllinien PC3 und LNCaP eine heterogene Expression aufwiesen mit deutlich schwächerer Expression in PC3-Zellen gegenüber LNCaP-Zellen. Eine deutliche Expression der alternativen Spleißvariante TK12-2 zeigte sich in JAR- und Hela- Zellen.

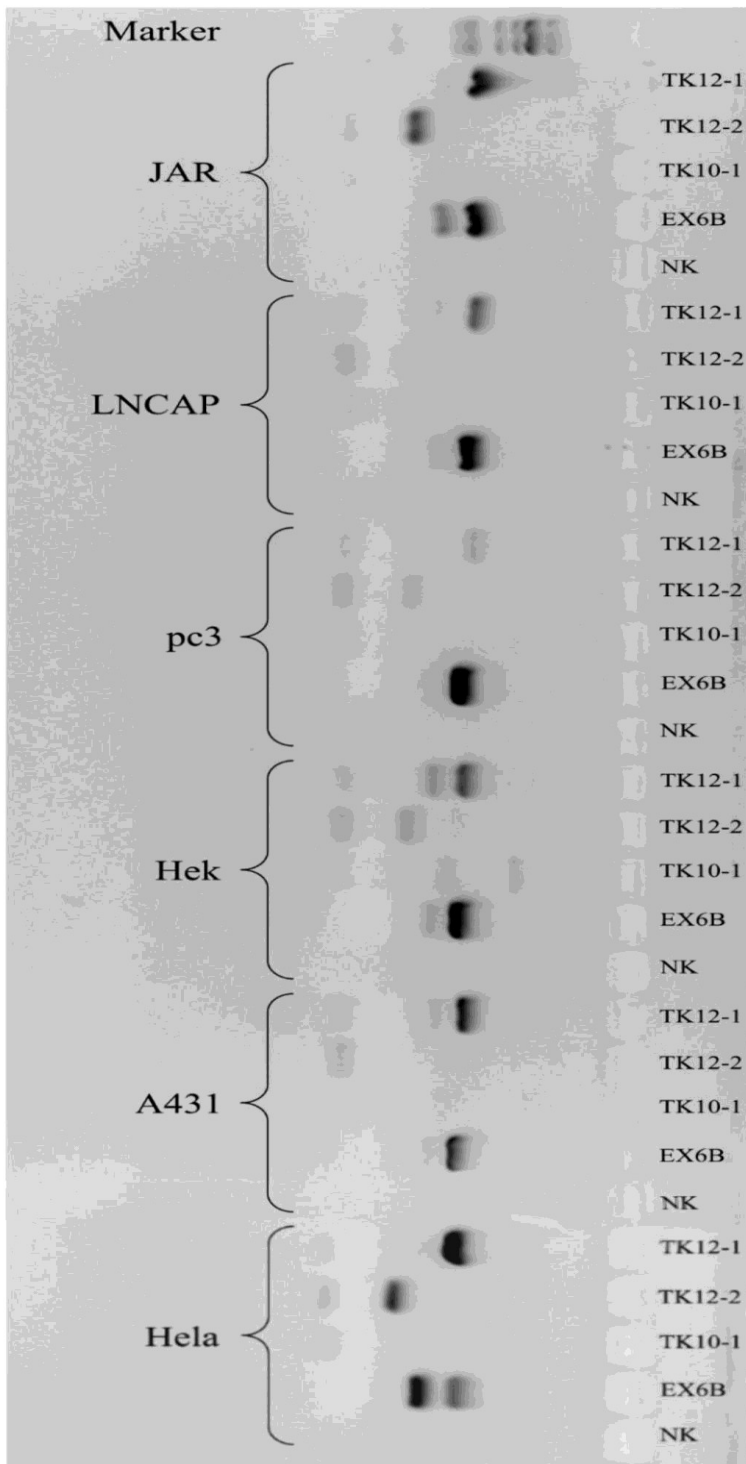


Abbildung 23: Gelelektrophorese der PCR zur Detektion der verschiedenen Spleißvarianten (TK-12-1, TK 12-2 sowie des Exon6B innerhalb der Variante TK10-1) des *FNTB* Gens in den Tumorzelllinien HeLa, A431, Hek, PC3, LNCaP und JAR. Die Expression der verschiedenen Varianten weicht zwischen und innerhalb der Zellen stark voneinander ab. (Marker= DNA ladder 1000bp, NK= Negativ Kontrolle)

3.6 Relative Quantifizierung der gewebespezifischen Expression der verschiedenen Spleißvarianten des *FNTB*- Gens

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die relative Expressionsstärke der mRNA der alternativen Transkripte TK 12-1, TK12-2, sowie der das EX6B enthaltenden Variante TK10-1, analysiert. Als nicht reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen („house keeping gene“) diente *βACTIN*. Die relative Expression der Spleißvarianten wurde auf die Expression des *βACTIN* Gens bezogen. Zudem wurde für die spätere, vergleichende Berechnung eine RT-PCR zur Quantifizierung aller Spleißvarianten, hier als *FNTB* All benannt, etabliert. Die Primer für diese RT-PCR wurden so gewählt, dass sie eine Sequenz flankieren, die potentiell alle alternativen Transskripte beinhaltet. Es wurde cDNA aus Leukozyten (n=17) gesunder Probanden, aus Nierenzellkarzinomgewebe (n=19) sowie Prostatakarzinomgewebe (n=12) eingesetzt und die relative Expressionsstärke der verschiedenen Spleißvarianten untereinander verglichen (Abbildung 24). Die Spleißvariante TK12-2 zeigte sowohl in Leukozyten gesunder Probanden sowie im Prostatakarzinomgewebe die höchste Expression gefolgt von dem Transkript TK10-1, welches sich hier auf mRNA Ebene nachweisen ließ. Die geringste Expression zeigte die Variante TK12-1 in diesen Geweben. In Nierenzellkarzinomen hingegen wurde die Variante TK12-1 am stärksten exprimiert gefolgt von TK12-2 und TK10-1.

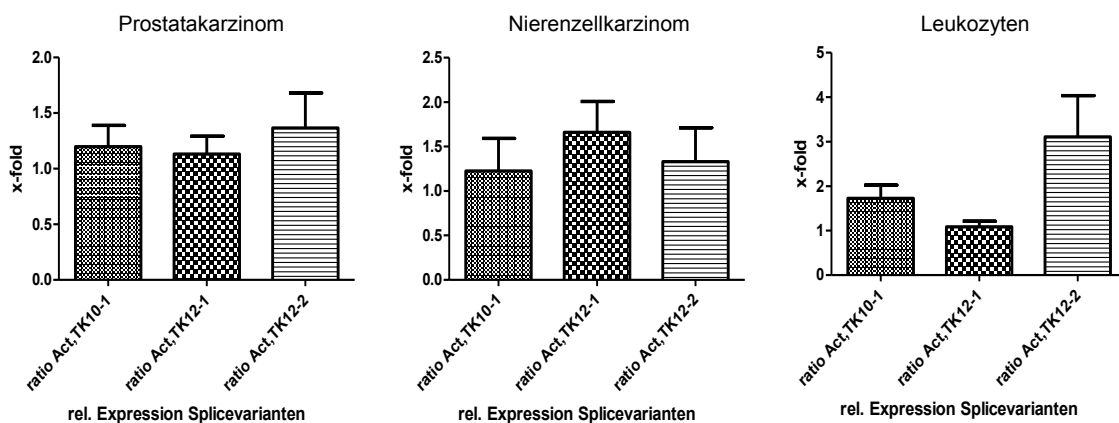


Abbildung 24: Relative Expressionsstärke der Spleißvarianten TK10-1, TK12-1 und TK12-2. Mittelwert und Standardabweichung (Mean with SEM (Standard Error of the MEAN)) der rel. Expression der Spleißvarianten in Bezug auf das „house keeping gene“ *βACTIN* in Prostatakarzinom- und Nierenzellkarzinomgewebe sowie in Leukozyten gesunder Probanden.

Vergleicht man die relative Expression der Spleißvarianten zwischen den einzelnen Geweben, zeigen sich signifikant unterschiedliche Expressionslevel ($p = 0,02$ und $p < 0,01$ in ANOVA) (Abbildung 25).

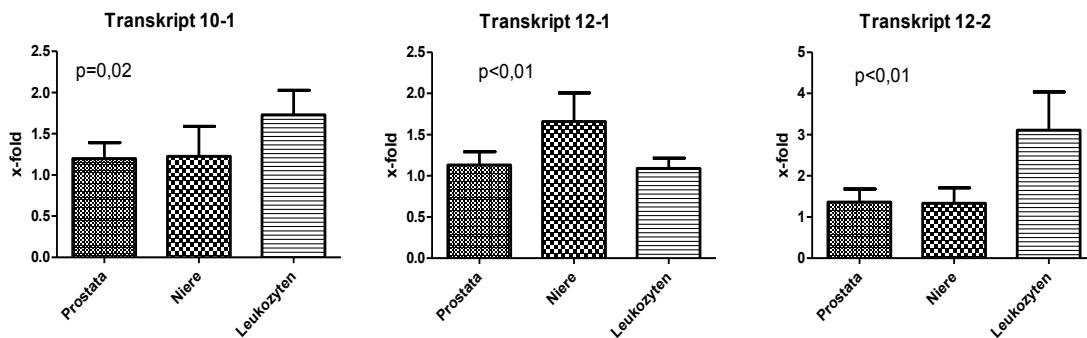


Abbildung 25: Vergleich der relativen Expression der Isoformen zwischen den untersuchten Geweben: Mittelwert und Standardabweichung (Mean with SEM (Standard Error of the MEAN)) der rel. Expression der Spleißvarianten in Bezug auf das „house keeping gene“ β ACTIN in Prostatakarzinom- und Nierenzellkarzinomgewebe sowie in Leukozyten gesunder Probanden.

Die relative Expression bewegt sich für alle Transkripte der verschiedenen Gewebe zwischen 1 und 3. Die höchste Expression kommt dem Transkript 12-2 innerhalb der Leukozyten zu. Auch scheint in den Leukozyten der stärkste intraindividuelle Unterschied vorzuliegen mit einer relativ niedrigen Expression von Transkript 12-1. In den erkrankten Geweben zeigt sich, dass vor allem das Transkript 12-1 in Nierenzellkarzinomen stark exprimiert wird. Im Prostatakarzinom liegt eine relativ konstante Expression aller 3 Transkripte vor.

3.7 Explorative Analyse des Einflusses der Polymorphismen *FNTB*-173 und *FNTB* -609 auf die Expression alternativer Spleißvarianten des *FNTB*-Gens beim Prostatakarzinom

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Polymorphismen in der *FNTB*-Promotoregion einen potenziellen Einfluss auf die Expressionsstärke des *FNTB*-Gens bzw. der unterschiedlichen Spleißvarianten haben, wurden die Genotypen der 12 Prostatagewebeproben bestimmt und die relative Expression der Transkripte mit den Polymorphismen korreliert. Betrachtet man die Expression aller Spleißvarianten des *FNTB*-Gens (*FNTB* All) scheinen insbesondere Tumorproben mit mindestens einem G-Allel innerhalb des *FNTB*-609 Polymorphismus eine gesteigerte Expression zu haben. Patienten die den Polymorphismus *FNTB*-173 5G/5G und zu mindestens ein G-Allel

des *FNTB-609* Polymorphismus zusätzlich trugen, zeigten neben einer relativ hohen Expression der Spleißvariante 12-1 die stärkste Expression der Variante 12-2 unter allen untersuchten Gewebeproben. Diese Patienten hatten sowohl im Bonner Patientenkollektiv das längste krankheitsfreie Überleben als auch im Essener Patientenkollektiv das längste Gesamtüberleben. Interessanterweise zeigten Tumorproben mit dem *FNTB-609* CC Polymorphismus eine tendenziell niedrigere Expression des *FNTB*-Gens. Dieser Polymorphismus war im Essener Patientenkollektiv mit dem kürzesten Krankheitsfreien Überleben assoziiert. Patienten, die zusätzlich den *FNTB-173* 5G/5G Polymorphismus trugen die niedrigste Expression des *FNTB*-Gens. Diese Patienten scheinen eine verringerte Expression der Spleißvarianten 12-1 und 12-2 zu haben, wobei hingegen die Spleißvariante 10-1 bei diesen Patienten tendenziell stärker exprimiert zu werden scheint. Patienten mit dieser Polymorphismuskombination hatten das kürzeste Krankheitsfreie Überleben im Bonner Patientenkollektiv (Abbildung 16).

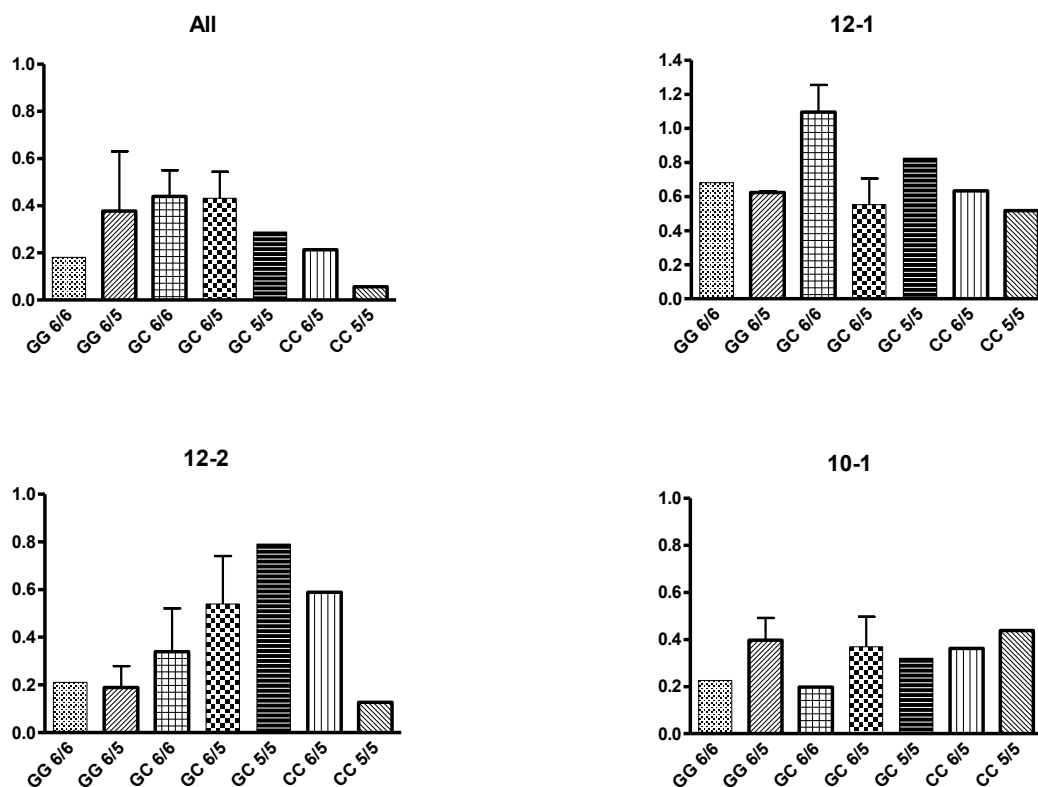


Abbildung 26: Expression der Spleißvarianten und der Polymorphismen *FNTB* -173 und *FNTB*-609 bei Patienten mit Prostatakarzinom: Mittelwert und Standardabweichung (Mean with SEM (Standard Error of the MEAN))

4. Diskussion

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signaltransduktion. So sind z.B. die Übertragung von Farnesyl- oder Geranylgeranylresten auf RAS Proteine entscheidend, um deren Sublokalisierung an Zellmembranen und deren Aktivierung zu ermöglichen. Diese Modifikation erfolgt durch die Enzyme FTase und GGTase. RAS-Proteine sind zentral an verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionsprozessen beteiligt und sind essentiell beteiligt an der Vermittlung und Weiterleitung von extrazellulären Signalen durch Wachstumsfaktoren in den Zellkern, wo sie u.a. die Transkription proliferationsfördernder und antiapoptotischer Gene regulieren. Diese RAS vermittelten Signale durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren oder durch Mutationen der *RAS* Onkogene *KRAS*, *NRAS* oder *HRAS*, die eine konstitutive Aktivierung bedingen, sind in der Tumorentstehung oder Tumorprogression zahlreicher solider und hämatologischer Malignome beteiligt, so dass sie vielversprechende Strukturen für zielgerichtete Therapiestrategien darstellen. Eine direkte pharmakologische Inhibition der RAS Proteine gelang bisher u.a. aufgrund ihrer komplexen Proteinstruktur und der Bildung von Heterodimeren innerhalb der RAS Proteinfamilie nicht. Daher gibt es Bestrebungen, die Funktion von RAS zu inhibieren, indem man die für die Aktivierung dieser Kinasen notwendige posttranslationale Modifikation wie die Farnesylierung beeinflusst. In präklinischen Tumormodellen zeigte die Blockade der FTasen durch spezifische Inhibitoren (FTIs) vielversprechende Ergebnisse (Kohl NE et al., 1995). In klinischen Studien in verschiedenen RAS abhängigen- und unabhängigen Tumorentitäten enttäuschte die Substanzklasse der FTIs jedoch (Adjei et al., 2003 und Cohen SJ et al., 2003). Dies legt nahe, dass die Interaktion der FTasen mit den zu modifizierenden Proteinen im Tumor weitaus komplexer ist als dies bisher in präklinischen Modellen postuliert wurde. U. a. scheint die Expressionsstärke der FTase-Untereinheiten alpha und beta direkten Einfluss auf die Tumorgenese und -progression sowie auf die Empfindlichkeit gegenüber Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin-like growth factor-I, platelet-derived growth factor (PDGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) zu haben (Nagase et al., 1999). Neben der reinen Expressionsstärke scheint sich auch die Aktivität der FTasen zwischen Normalgewebe und Tumoren sowie innerhalb verschiedener Subentitäten bestimmter Tumoren zu unterscheiden. So zeigt sich sowohl eine verstärkte Aktivität der FTase in

Darntumoren im Vergleich zur normalen Darmschleimhaut als auch innerhalb verschiedener Darntumoren mit einer verstärkten Aktivität in Tumoren, die im rechten Kolon lokalisiert sind, eine bestimmte histologische Differenzierung aufweisen oder eine Mutation innerhalb der *KRAS* Gens tragen (Caruso MG et al., 2003). Als Zielstruktur der FTIs wurde daher in dieser Arbeit die FTase beta Untereinheit (*FNTB*) an der Modellerkrankung des Prostatakarzinoms sowohl funktionell als auch hinsichtlich einer prognostischen Wertigkeit untersucht. Besonderer Schwerpunkt lag auf der Untersuchung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) innerhalb der Promotorregion des *FNTB*-Gens.

4.1 Funktionelle Bedeutung der SNPs innerhalb des Promotors des *FNTB* Gens

Am Beispiel des *FNTB-609* Polymorphismus konnten wir zeigen, dass in Abhängigkeit des Genotyps die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird. Möglicherweise spielt hier der durch *in silico* Analysen (Lazik A, 2010) identifizierte Transkriptionsfaktor Thing1-E47, der zur Familie der helix-loop-helix (HLH) Transkriptionsfaktoren gehört, in unserem Modell eine Rolle. HLH-Transkriptionsfaktoren haben einen fördernden Einfluss auf die Expression unterschiedlicher Gene (Murre C et al., 1994). Gemeinsam mit weiteren Transkriptionsfaktoren bildet Thing1-E47 eine Plattform für die RNAPolymerase II, welche daraufhin mit der Synthese von mRNA beginnt (Knippers R, 2006). In den durchgeführten EMSAs zeigte sich in allen Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP, PC3 und DU145) eine höhere Affinität der Zellkernextrakte einschließlich der darin enthaltenden Transkriptionsfaktoren zum *FNTB-609* GG Oligonukleotid im Vergleich zum *FNTB-609* CC Oligonukleotid. Interessanterweise zeigte sich bezüglich des *FNTB-173* Polymorphismus jedoch in den Zellkernextrakten von LNCaP und DU145 ein unterschiedliches Bindungsverhalten mit Transkriptionsfaktoren mit Hinweisen für eine spezifischere Bindung des *FNTB-173* 6G Genotyps in LNCaP Zellen, aber keinen Unterschieden im Bindungsverhalten in DU145 Zellen. Zusammenfassend ist daher zu sagen, dass die Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren einerseits von SNPs innerhalb der Promotorregion des *FNTB*-Gens als auch vom zellulären Hintergrund abhängig zu sein scheint. Da sich Unterschiede im Bindungsverhalten von

Transkriptionsfaktoren darstellen ließen, der Aktivität und Funktionalität der Promotoren aber auch eine entscheidende Rolle bei der Transkription eines Gens zukommt, erfolgten „Reporter-Assays“ mit den verschiedenen Allelkombinationen der Polymorphismen *FNTB-609*, *FNTB-179* und *FNTB-173*. Hier zeigte sich in DU145 und LNCaP Zellen die höchste Promotoraktivität, wenn die Polymorphismen *FNTB-609* GG und *FNTB-173* 6G kombiniert wurden. Bei zusätzlichem Vorliegen des *FNTB-179A* Polymorphismus war die stärkste Aktivität zu messen. Bei der Kombination des *FNTB-609* CC mit *FNTB-173* 5G hingegen war die Promotoraktivität am geringsten. Die anderen Haplotypkombinationen nahmen eine intermediäre Stellung ein. Bei der entsprechenden Untersuchung in PC3 Zellen ergab sich eine divergente Verteilung mit der stärksten Promotoraktivität für den Haplotyp CT6G, während der Haplotyp GT6G am schwächsten exprimiert wurde. Hierbei wurde jedoch keine Signifikanz erreicht. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine isolierte Betrachtung eines Polymorphismus innerhalb des Promotors nicht ausreicht, um dessen Aktivität vorherzusagen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die untersuchten Polymorphismen innerhalb der Promotorregion des *FNTB*-Gens sowohl die Bindung von Transkriptionsfaktoren als auch die Aktivität des Promotors beeinflussen. Dies legt eine unterschiedliche Expression des *FNTB*-Gens mit konsekutiv gesteigerter oder verringerter Aktivität der FTase in Abhängigkeit der Polymorphismen innerhalb des Promotors und des zellulären Hintergrundes nahe. Diese beobachtete Heterogenität im Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren und der Promotoraktivität des *FNTB*-Gens gibt eine Erklärungsmöglichkeit für die divergenten Ergebnisse klinischer Studien mit dem unstratifizierten Einsatz von FTIs in verschiedenen Tumorerkrankungen.

4.2 Prognostische Bedeutung der SNPs innerhalb des Promotors des *FNTB*-Gens

Die beobachteten funktionellen Unterschiede der verschiedenen Promotorpolymorphismen legen zudem eine prognostische Wertigkeit der SNPs nahe, da in Zellkulturmodellen eine transgene Überexpression der verschiedenen Untereinheiten der FTase eine gesteigerte Aktivität der RAS Proteine bedingte und das Tumorwachstum in *in vivo* Mausmodellen förderte (Nagase et al., 1999). Es erfolgte daher eine Genotypisierung bezüglich der Promotorpolymorphismen *FNTB-609*, *-179* und *-173* von zwei unabhängigen, bereits validierten Patientenkollektiven mit

Prostatakarzinom (Bachmann et al., 2011). Bezüglich der untersuchten klinisch-pathologischen Charakteristika wie Alter, PSA-Wert, TNM-Stadium, Gleason-Score und Tumordifferenzierungsgrad zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der drei Promotorpolymorphismen, so dass eine unabhängige Betrachtung prognostischer Parameter wie das krankheitsfreie- und Gesamtüberleben zulässig war, da von einem „Selection Bias“ innerhalb der Patientenkollektive primär nicht auszugehen war. Analysen zur prognostischen Bedeutung des SNP *FNTB-179* beim Prostatakarzinom waren aufgrund der sehr niedrigen Allelfrequenz nicht möglich. Für den SNP *FNTB-609* allein sowie in der kombinierten Analyse mit dem SNP *FNTB-173* konnte eine Auswirkung auf das krankheitsfreie bzw. Gesamtüberleben gezeigt werden. Der SNP *FNTB-609* beeinflusste als individueller Faktor bei Patienten mit einem Prostatakarzinom das krankheitsfreie Überleben bis zur Metastasierung. Patienten mit dem *FNTB-609* CC Genotyp hatten ein signifikant kürzeres krankheitsfreies Überleben als Patienten mit GC oder GG Genotyp im Essener Patientenkollektiv. In der kombinierten Betrachtung des *FNTB-609* und des *FNTB-173* Polymorphismus hatten diejenigen Patienten das kürzeste krankheitsfreie Überleben, die den *FNTB-609* CC Genotyp in Kombination mit dem *FNTB-173* 5G/5G Genotyp hatten (Bonner Kollektiv). Sobald diese Patienten-Subgruppe jedoch mindestens ein *FNTB-609* G-Allel trugen, hatten die Patienten mit dem *FNTB-173* 5G/5G Genotyp hingegen das längste Krankheitsfreie Überleben. Im Essener Kollektiv zeigten diese Patienten tendenziell auch das längste Gesamtüberleben ab Diagnosestellung, auch wenn die statistische Signifikanz verfehlt wurde. Es kann geschlussfolgert werden, dass das Vorhandensein zumindest eines G-Allels innerhalb der *FNTB-609* Polymorphismus als prognostisch günstig zu werten ist. Im Gegensatz scheint das Vorhandensein des Genotyps *FNTB-609* CC prognostisch ungünstig zu sein. Dies passt gut zu den funktionellen Analysen des *FNTB-609* GG Genotyps, da dieser Promotorpolymorphismus mit einer höheren Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren in Prostatakarzinomzelllinien einherging. Die geringere Promotoraktivität des Haplotyps *FNTB-609C/FNTB-1735G* weist auf eine möglicherweise ineffizientere Bildung eines funktionellen Enzyms und somit eingeschränkte Farnesylierung von Proteinen hin, was wiederum als Gen-Dosis Effekt den ungünstigen Verlauf dieser Patientensubgruppe erklären könnte. Die negative prognostische Wertigkeit des *FNTB-609* CC Polymorphismus wurde bereits in anderen

Tumorentitäten wie dem Nierenzellkarzinom und dem multiplen Myelom beobachtet (Lazik A, 2010). Aktuelle Ergebnisse einer retrospektiven Analyse von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom, die im Rahmen der AGO-OVAR-15 Studie mit dem FTI Lonafarnib behandelt wurden, unterstützen den potentiellen Nutzen der Analyse des *FNTB*-609G>C Polymorphismus als prädiktiven Biomarker für eine FTI- Therapie (Bachmann HS et al., 2015).

4.3 Bedeutung der Expression alternativer Transkripte des *FNTB*- Gens

Neben der absoluten Expression des *FNTB*- Gens scheint auch die relative Expression verschiedener Spleißvarianten in bestimmten Geweben eine Rolle zu spielen und die Funktion der FTase zu beeinflussen. Dies könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Wirkung von FTIs haben, da die Spleißvarianten möglicherweise zu Strukturveränderungen der FTase führen, die die Bindungsaffinität der Inhibitoren beeinflussen könnten. Daher wurde in dieser Arbeit die Expression alternativer Transkripte des *FNTB*-Gens zunächst in verschiedenen Geweben analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der untersuchten Gewebe relative inter- sowie intraindividuell unterschiedliche Expressionsmuster gibt. In Leukozyten gesunder Probanden zeigte sich eine prädominante Expression der Spleißvariante 12-2, während die anderen Varianten nur in geringem Maße exprimiert wurden. In Prostatakarzinom- und Nierenzellkarzinomgeweben hingegen zeigte sich eine deutliche Expression aller Spleißvarianten, wobei die Variante 12-2 am stärksten im Nierenzellkarzinom und die Variante 10-1 am stärksten im Prostatakarzinom exprimiert wurde. Es gelang der Nachweis des zur Variante 10-1 gehörenden Exons 6B, wobei ein Nachweis der kompletten Variante 10-1 in verschiedenen Tumorzelllinien nicht gelang. Dies legt nahe, dass weitere bisher nicht bekannte Transkriptvarianten existieren. Neben der differentiellen Expression der einzelnen Spleißvarianten in unterschiedlichem normalen und tumorösen Gewebe scheint es auch innerhalb der Gewebe Unterschiede zu geben. In verschiedenen Prostatakarzinomgeweben zeigte sich, dass sowohl das *FNTB*- Gen als auch insbesondere die einzelnen Spleißvarianten unterschiedlich exprimiert werden. Die Expressionsstärke der einzelnen Varianten schien abhängig von einzelnen Promotorpolymorphismen zu sein. Unter der Annahme, dass die Transkriptvarianten durch alternative Promotoren reguliert werden, in denen die untersuchten SNPs nicht

liegen, kann es möglich sein, dass die *FNTB*- Promotorpolymorphismen zu veränderten Verhältnissen in der Expression der Transkriptvarianten führen. Die vorliegenden Ergebnisse könnten einen Erklärungsansatz dafür liefern, dass Mammakarzinomzellen mit einer verringerten Expression und somit auch Aktivität der FTase besonders sensitiv gegenüber FTIs waren (Moasser MM et al., 2002). Beispiele für eine Assoziation zwischen Promotorstruktur und alternativem Spleißen konnten bereits für unterschiedlichste Moleküle dargestellt werden (Cramer P et al., 1997). Aufgrund der geringen Fallzahl sind die vorliegenden Ergebnisse jedoch mit Vorsicht zu betrachten. Zur Validierung sollte ein größeres Patientenkollektiv, idealerweise prospektiv analysiert werden.

4.4. Interpretation der Ergebnisse mit Bezug auf klinische Studien

Legt man die gewonnenen Ergebnisse als potentielle prognostische Marker zu Grunde, so ist zu konstatieren, dass der *FNTB-609* GG Genotyp mit dem *FNTB-173* GG Genotyp vergesellschaftet zu sein scheint. Bei einer potentiellen Analyse dieser Promotor-Polymorphismen im Rahmen eines individualisierten Therapieregimes kann diese Kombination daher als gegeben angesehen werden. Ein Nachweis der einzelnen Polymorphismen kann daher entfallen, insofern sich diese Ergebnisse bei weiteren Tumorerkrankungen bestätigen. Die Abhängigkeit der Promotoraktivität des *FNTB*-Gens vom jeweiligen Polymorphismus sowie die Existenz alternativer Spleißvarianten muss in der Beurteilung der divergenten Studienergebnisse zu FTIs Berücksichtigung finden. Sollte sich bestätigen, dass die unterschiedlichen Spleißvarianten auch die Funktion der FTase beeinflussen, könnte dies eine Erklärung für die divergenten Studienergebnisse sein. Möglicherweise reicht daher nicht die reine Proteinexpressionsstärke der FTase als Prädiktor für eine Wirksamkeit der FTIs. Da funktionelle Analysen in Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebeproben äußerst komplex und nicht für routinediagnostische Verfahren geeignet sind, wäre eine Bestimmung der Promotorpolymorphismen ein sehr gute Alternative und könnte als Surrogatmarker für die Funktion der FTase und nicht nur als prognostischer sondern auch als prädiktiver Marker (Bachmann HS, 2015) genutzt werden, wenn sich die Ergebnisse in anderen Geweben bestätigen.

4.5. Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis

Bisher bleibt der genaue molekulare Wirkmechanismus von FTIs ungeklärt. Es konnten zwar primär RAS und im Folgenden auch andere Zielstrukturen der FTase identifiziert werden, die potenziell in ihrer Funktion durch die FTI inhibiert werden. Dennoch liefern die bisherigen Untersuchungen keine suffiziente Erklärung für die divergenten Ergebnisse in klinischen Studien mit FTIs. Alle potenziellen prädiktiven Marker wie z.B. die Expressionsstärke der FTase oder der Mutationsstatus des *RAS* Onkogens konnten letztlich nicht validiert werden (Sepp-Lorenzino L et al., 1995). Potentielle Ursachen für die Unwirksamkeit der FTIs in klinischen Studien sind u.a. eine alternative Prenylierung und somit Aktivierung von RAS Proteinen durch die GGTase I. Es konnten Reaktionen identifiziert werden, bei denen Substrate mit der Erkennungssequenz für die FTase durch die GGTase I prenyliert wurden (Sousa SF et al., 2005). Es existieren jedoch auch Proteine, die keiner alternativen Geranylgeranylierung unterzogen werden können (Tabelle 23). Hierzu gehören unter anderem Signalmoleküle, Ko-Chaperone oder Zellzyklus-Mediatoren (Basso AD et al., 2006).

Tabelle 23: Zielstrukturen der Prenyltransferasen und alternative Prenylierung

Protein	Intrazelluläre Funktion	Alternative Prenylierung
CENP E	Kinesin-Motor-Protein	-
CENP F	Chromosom-Transport-Protein	-
HDJ-2	Ko-Chaperon	-
HRAS	GTPase	-
KRAS	GTPase	+
NRAS	GTPase	+
Prelamin A	Nukleares Membranprotein	-
PRL1, PRL2, PRL3	Tyrosinphosphatase	+
RHEB, RHEB 2	GTPase	-
RHOB, RHOD, RHO6,	GTPase	+

Trotz einer alternativen Prenylierung und somit Aktivierung scheinen jedoch FTIs eine gewisse Aktivität in diesen Zellen zu haben (Sun J et al., 1998). Bei weitgehender Unwirksamkeit der FTIs als Monotherapie in klinische Studien wäre ggf. eine duale Inhibition in Kombination mit Inhibitoren der GGTase I zu evaluieren (Schen M et al., 2015). Neben RAS müssen auch andere farnesylierte Proteine, beispielsweise PRL, RND und RHEB als mögliche Zielstrukturen von FTIs näher untersucht werden (Sebti

SM et al., 2003). Da an Surrogatproteinen wie HDJ-2 unter FTI-Therapie eine ausreichende Hemmung demonstriert werden konnte, scheint ein Nichtansprechen auf eine Therapie mit FTIs nicht auf dem Boden einer insuffizienten Blockierung der Farnesylierung zu fußen (Lancet JE et al., 2007). Ob eine suffiziente Inhibition der Farnesylierung der entscheidenden onkogenen Zielstrukturen in Tumorgeweben eintritt bleibt jedoch offen. Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Polymorphismen haben wahrscheinlich keinen direkten Einfluss auf das Bindungsverhalten von FTIs an die FTase, da sie den Promotor des *FNTB*-Gens betreffen. Die Polymorphismen beeinflussten jedoch deutlich die Aktivität des Promotors und somit die Expressionsstärke und vermutlich die Funktion der FTase, so dass möglicherweise Träger eines jeweils aktiveren Alleles eine höhere Dosis der FTIs benötigen, um eine vollständige Hemmung der FTase zu erreichen. Die Expression alternativer Spleißvarianten, die vermutlich ebenfalls durch die unterschiedlichen Promotorpolymorphismen beeinflusst werden, könnten jedoch das Bindungsverhalten der FTIs stören, da von einer strukturveränderten FTase ausgegangen werden muss. Zudem ist eine Funktionsbeeinträchtigung der FTase bei alternativen Spleißvarianten zu erwarten. Bestätigte sich diese Annahme an einem adäquat großen Patientenkollektiv wären Genotypisierungen sowie Überprüfung der Patienten auf Expression alternativer Transkripte sinnvoll, um eine individualisierte Tumorthherapie zu erreichen. Somit könnte man mittels molekularer Marker ein Voraussage über das Therapieansprechen treffen und Patienten identifizieren, die eine angepasst hohe oder niedrige Dosis an FTIs benötigen oder gar nicht profitieren würden. Die prognostische Bedeutung von Spleißisoformen konnte beispielsweise bereits erfolgreich für natural killer (NK) cell receptor (NKp30) Isoformen bei Patienten mit GIST gezeigt werden (Delahaye SF et al., 2011).

4.6 Ausblick

Die erhobenen Daten unterstützen die Rationale einer retrospektiven Analyse von Patientenkollektiven, die eine FTI-Therapie im Rahmen einer klinischen Studie erhalten haben hinsichtlich *FNTB*-Promotorpolymorphismen. Weiterführende Untersuchungen von *FNTB* Spleißvarianten sollten an einer größeren Fallzahl zur Validierung der vorgelegten explorativen Ergebnisse erfolgen. Eine ergänzende Analyse der

exprimierten Isoformen hinsichtlich möglicher, funktioneller Änderungen auf Proteinebene könnte zum weiteren Verständnis der FTase als therapeutischer Zielstruktur beitragen. Auch bei nicht malignen Erkrankungen konnte farnesylierten Proteinen eine entscheidende Rolle zugewiesen werden. Beispielsweise ist H-RAS als RAS-Proteinfamilienmitglied bei der Genese der kardialen Hypertrophie beteiligt (Thorburn A et al., 1993), chronische und akute Entzündungsreaktion erfordern farnesylierte Proteine (Abeles AM et al., 2007) wie auch bei der Hepatitis D gezeigt werden konnte (Gunsar F 2013). Im Mausmodell konnte bei inflammatorischer Hepatitis eine verbessertes Überleben unter Behandlung mit dem FTI Tipifarnib gezeigt werden (Shirozu K et al., 2014). Beim Progeroid Syndrom konnte die Farnesylierung als Pathomechanismus der Krankheitsentstehung identifiziert werden (Young SG, 2006 und Yang SH et al., 2006). Extrazellulär konnten der FTase entsprechende Enzyme erfolgreich bei Malaria und anderen Infektionserregern nachgewiesen werden (Eastman RT et al., 2006). Dementsprechend könnte es äußerst interessant sein die vorgelegten Untersuchungsergebnisse zum *FNTB*-Genlocus auf diese Bereiche zu transferieren.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulargenetische und funktionelle Analyse von Polymorphismen der Promotorregion des *FNTB*-Genlocus sowie deren potentielle Assoziation zur Expression alternativer Transkriptvarianten am Beispiel des Prostatakarzinoms. Das *FNTB*-Gen kodiert für die β -Untereinheit der Farnesyltransferase (FTase), einem Enzym, welches für die posttranslationale Modifikation diverser Proteine zuständig ist und als potentielle Zielstruktur („target“) für Farnesyltransferaseinhibitoren (FTIs) in verschiedenen Tumorentitäten in klinischen Studien evaluiert wurde. Die Existenz der drei Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) *FNTB*-609 G>C, *FNTB*-179 T>A und *FNTB*-173 6G>5G konnte in zwei unabhängigen Prostatakarzinomkollektiven validiert werden. Zudem konnte eine prognostische Wertigkeit dieser SNPs im Bezug auf das krankheitsfreie und Gesamtüberleben nach Prostatektomie mit einem Überlebensvorteil für *FNTB*-609 G sowie *FNTB*-173 5G Allelträger gezeigt werden. Funktionell zeigten die Polymorphismen Unterschiede bei der Transkriptionsfaktorbindung und bei der Promotoraktivität, die die Expression der FTase beeinflussen könnten. Desweiteren konnten drei Spleißvarianten TK 10-1, TK12-1 und TK12-2 validiert und ihre sowohl inter- als auch intraindividuell stark variierende Expression in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Insbesondere ließ sich eine verstärkte Expression aller Spleißvarianten in Prostatakarzinom- und Nierenzellkarzinomgewebe nachweisen, während Leukozyten gesunder Probanden präferentiell die Variante TK12-2 exprimierten. Es scheint tendenziell einen Zusammenhang zwischen Polymorphismus und der Expression verschiedener Spleißvarianten zu geben. Die teilweise divergenten Ergebnisse aus klinischen Anwendungsstudien mit FTIs könnten durch diese Untersuchungen zumindest teilweise erklärt werden, da die Funktion der FTase von zahlreichen Faktoren abzuhängen scheint, die bisher weitgehend nicht berücksichtigt wurden.

Die vorliegenden Ergebnisse tragen daher zum weiteren Verständnis der FTase und ihrer Funktion bei und die detektierte Variabilität könnte zukünftig als Marker bei der individualisierten medikamentösen Therapie sowie bei der Prognose von Tumorerkrankungen weitere Berücksichtigung finden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abeles, A. M., Marjanovic, N., Park, J., Attur, M., Chan, E. S., Al-Mussawir, H. E., Dave, M., Fisher, M. C., Stuchin, S. A., Abramson, S. B., Pillinger, M. H. (2007): Protein isoprenylation regulates secretion of matrix metalloproteinase 1 from rheumatoid synovial fibroblasts: effects of statins and farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors.
Arthritis Rheum. 56, 2840-53
2. 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
3. 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
4. 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.
5. 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., Sebti, 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

6. Andres, D.A., Milatovich, A., Ozcelik, 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
7. 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
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. Bachmann HS, Heukamp LC, Schmitz KJ, Hilburn CF, Kahl P, Buettner R, Nüchel H, Eisenhardt A, Rübber H, Schmid KW, Siffert W, Eggert A, Schramm A, Schulte JH. (2011):
Regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma.
International Journal of Cancer. 129, 2390-9
10. Bachmann HS, Meier W, du Bois A, Kimmig R, Kuhlmann JD, Siffert W, Sehoul J, Wollschlaeger K, Huober J, Hillemanns P, Burges A, Schmalfeldt B, Aminossadati B, Wimberger P (2015):
The FNTB promoter polymorphism rs11623866 as a potential predictive biomarker for lonafarnib treatment of ovarian cancer patients.
Br J Clin Pharmacol. 80, 1139-48
11. Basso, A.D., Kirschmeier, P., Bishop, W.R. (2006):
Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors.
J Lipid Res. 47, 15-31

12. Bernards, R., de Leeuw, M.G., Houweling, A., van der Eb, A. J. (1986):
Role of the adenovirus early region 1B tumor antigens in transformation and lytic
infection.
Virology. 150, 126-39
13. Black, D.L. (2003):
Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing.
Annu Rev Biochem. 72, 291-336
14. Bos, J. L. (1989):
ras oncogenes in human cancer: a review.
Cancer Res. 49, 4682-9
15. Brookes, A. J. (1999):
The essence of SNPs.
Gene. 234, 177-86
16. Caponigro, F., Casale, M., Bryce, J. (2003):
Farnesyl transferase inhibitors in clinical development.
Expert Opin Investig Drugs. 12, 943-954
17. Caruso MG, Notarnicola M, Bifulco M, Laezza C, Guerra V, Altomare DF, Memeo
V, Lorusso D, Demma I, Di Leo A. (2003):
Increased farnesyltransferase activity in human colorectal cancer: relationship with
clinicopathological features and K-ras mutation.
Scand J Gastroenterol. 38, 80-5

18. 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
19. Cox, A. D., M. M. Hisaka, et al. (1992): Specific isoprenoid modification is required for function of normal, but not oncogenic, Ras protein. *Mol Cell Biol.* 12, 2606-15
20. 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
21. Delahaye, N. F., S. Rusakiewicz, et al. (2011): Alternatively spliced NKp30 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Nat Med.* 17, 700-7
22. Downward, J. (2003): Targeting Ras signaling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3, 11-22
23. Druillennec, S., C. Dorard, C., Eychene, A. (2012): Alternative splicing in oncogenic kinases: from physiological functions to cancer. *J Nucleic Acids.* 2012, 639062

24. 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
25. Farnsworth C.C., Seabra M.C., Ericsson L.H., Gelb M.H., Glomset J.A. (1994):
Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A.
Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 11963-7
26. Giard, D. J., S. A. Aaronson, Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., Parks, W. P. (1973):
In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.
J Nat Cancer Inst. 51, 1417-23
27. 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
28. Girgert, R., Hohnecker, A., Wittrock, J., Schweizer, P. (1999):
Inhibition of farnesyl-protein-transferase in neuroblastoma cells by alphahydroxyfarnesylphosphonate.
Anticancer Res. 19, 2959-2962
29. Gruber F.X., Hjorth-Hansen H., Mikkola I., Stenke L., Johansen T. (2006):
A novel Bcr-Abl splice isoform is associated with the L248V mutation in CML patients with acquired resistance to imatinib.
Leukemia. 20, 2057–2060

30. Gunsar F. (2013):
Treatment of delta hepatitis.
Expert review of anti-infective therapy. 11, 489-98.
31. Guo, Y., Jamison, D.C. (2005):
The distribution of SNPs in human gene regulatory regions.
BMC Genomics. 6, 140
32. Hellman, L.M., Fried, M.G. (2007):
Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions.
Nat Protoc. 2, 1849-1861
33. Hölftke, 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
34. Horoszewicz, J. S., S. S. Leong, et al. (1983):
LNCaP model of human prostatic carcinoma.
Cancer Res. 43, 1809-18
35. Imai Y., Nakane M., Kage K., Tsukahara S., Ishikawa E., Tsuruo T., Miki Y., Sugimoto Y. (2002):
C421A Polymorphism in the Human Breast Cancer Resistance Protein Gene Is Associated with Low Expression of Q141K Protein and Low-Level Drug Resistance.
Mol Cancer Ther. 1, 611-6

36. 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
37. Kaighn M.E., Narayan K.S., Ohnuki Y., Lechner J.F., Jones L.W. (1979):
Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).
Invest Urol. 17, 16-23.
38. Knippers, R. (2006):
Molekulare Genetik. 9. Ed.
Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
39. 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, 18884-18888
40. 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
41. 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

42. Lazik A. (2010):
Polymorphismen im Promotor des Gens FNTB und deren mögliche Bedeutung bei malignen Neoplasien
<http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/servlets/DozBibEntryServlet?mode=show&id=30231>
43. Livak, K. J., Schmittgen, T .D. (2001):
Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.
Methods. 25, 402-8
44. 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
45. Moasser MM, Rosen N. (2002):
The use of molecular markers in farnesyltransferase inhibitor (FTI) therapy of breast cancer.
Breast Cancer Res Treat. 73, 135-44
46. Mullis, K. B. (1990):
Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction
Ann Biol Clin (Paris). 48, 579-82
47. Nagase T, Kawata S, Nakajima H, Tamura S, Yamasaki E, Fukui K, Yamamoto K, Miyagawa J, Matsumura I, Matsuda Y, Matsuzawa Y. (1999):
Effect of farnesyltransferase overexpression on cell growth and transformation.
Int J Cancer. 80, 126-33

48. 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
49. Pattillo, R.A., Ruckert, A.C., Hussa, R.O., Bernstein, R. and Delfs, E. (1971):
The JAR cell line, continuous human multihormone production and controls.
In Vitro. 6, 398
50. Raponi, M., Lancet, J.E., Fan, H., Dossey, L., Lee, G., Gojo, I., Feldman, E.J., Gotlib, J., Morris, L.E., Greenberg, P.L., Wright, J.J., Harousseau, J.L., Löwenberg, B., Stone, R.M., De Porre, P., Wang, Y., Karp, J.E. (2008):
A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia.
Blood. 111, 2589-96
51. Raz, T., Nardi, V., Azam, M., Cortes, J., Daley, G.Q. (2007):
Farnesyl transferase inhibitor resistance probed by target mutagenesis.
Blood. 110, 2102-2109
52. Ronaghi, M. (2001):
Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing.
Genome Res. 11, 3-11
53. 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

54. Rosenfeld, M. G., Amara, S. G., Roos, B. A., Ong, E. S., Evans, R. M. (1981):
Altered expression of the calcitonin gene associated with RNA polymorphism.
Nature. 290, 63-5
55. Rutherford, NJ (1992):
Journal für praktische Chemie **16**, 129 (1839 [as translated and excerpted in Mikulás
Teich, *A Documentary History of Biochemistry, 1770-1940* (Rutherford, NJ: Fairleigh
Dickinson University Press,))])
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/
56. Sadler, T.W. (2003):
Medizinische Embryologie. 10. Ed.
Stuttgart: Georg Thieme Verlag; s. bes. S. 43 – 50
57. Sambrook, J., Russel, D. (2000):
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. Ed.
New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
58. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977):
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 74, 5463-5467
59. Scherer, W. F., Syverton, J.T., Gey, G. O. (1953):
Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a
stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an
epidermoid carcinoma of the cervix.
J Exp Med. 97, 695-710
60. Sebti, S.M., Der, C.J. (2003):
Opinion: Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors.
Nat Rev Cancer. 3, 945-951

61. Sebti, S.M. (2005):
Protein farnesylation: Implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy.
Cancer Cell. 7, 297-300
62. 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
63. Shen M., Pan P., Li Y., Li D., Yu H., Hou T. (2015):
Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling.
Drug Discov Today. 20, 267-76
64. Shirozu K., Hirai S., Tanaka T., Hisaka S., Kaneki M., Ichinose F. (2014)
Farnesyltransferase inhibitor, tipifarnib, prevents galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure.
Shock. 42, 570-7
65. Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. (2005):
Unraveling the mechanism of the farnesyltransferase enzyme.
J Biol Inorg Chem. 10, 3-10
66. Stone K.R., Mickey D.D., Wunderli H., Mickey G.H., Paulson D.F. (1978):
Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).
Int. J. Cancer. 21, 274-81

67. 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
68. Thorburn, A., Thorburn, J., Chen, S. Y., Powers, S., Shubeita, H. E., Feramisco, J. R., Chien, K. R. (1993):
HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy.
J Biol Chem. 268, 2244-9
69. 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
70. Virtanen, S. S., Sandholm, J., Yegutkin, G., Kalervo Vaananen, H., Harkonen, P. L. (2010):
Inhibition of GGTase-I and FTase disrupts cytoskeletal organization of human PC-3 prostate cancer cells.
Cell Biol Int. 34, 815-26
71. 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

72. Young, S. G., M. Meta, et al. (2006):
Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes.
J Biol Chem. 281, 39741-5

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
Ct	Cycle threshold
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DIG	Digoxygenin
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	Growth factor (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
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
PPi	Pyrophosphat
PRL	Phosphatase of Regenerating Liver
PSQ	Pyrosequenzierung
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	Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. Hagen Sjard Bachmann für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Promotionsarbeit, sowie seine Geduld, sachkundigen Rat und stetige Bereitschaft zur Diskussion während der gesamten Zeit der Vorbereitung, Durchführung und kritischen Evaluation der Ergebnisse dieser Arbeit, bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. W. Siffert möchte ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut danken.

Auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft Siffert, insbesondere Frau Iris Manthey, die während der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit praktische Anregungen gaben und die Nutzung Ihrer Laborräume und Geräte erlaubten, gilt mein Dank.

Für die allzeit moralische Unterstützung während der Entstehungszeit dieser Promotionsarbeit bedanke ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern, Freunden und vor allen, Herrn Priv. Doz. Dr. med. Stefan Kasper.

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