Universität Ulm
Abteilung Humangenetik
Prof. Dr. Walther Vogel

Molekular-genetische Untersuchungen zum Caveolin-1-Gen beim Prostata-Karzinom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Jürgen Häusler
aus Augsburg

Ulm, 2005

Amtierender Dekan: **Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin**

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. Walther Vogel**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler**

Tag der Promotion: **18.07.2005**

Meinen Eltern, Ingrid und Josef,
den zwei Säulen meines Lebens, ohne die ich nicht sein könnte!
Und meiner Freundin Monja,
die mir Hilfe und Inspiration war und ist!

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung ..... - 1 -
- **1.1 Die Prostata ..... - 1 -**
- **1.2 Das Prostata-Karzinom ..... - 4 -**
- **1.3 Die Genetik des Prostata-Karzinoms ..... - 11 -**
- **1.4 DNA-Methylierung ..... - 13 -**
- **1.5 Caveolin-1 ..... - 16 -**
- **1.6 Zielsetzung ..... - 23 -**

2 Probanden, Material und Methoden ..... - 25 -
- **2.1 Probanden ..... - 25 -**
- **2.2 Materialien ..... - 27 -**
- **2.3 Experimentelle Methoden ..... - 34 -**
- **2.4 Statistische Verfahren zur Ermittlung von Assoziation ..... - 54 -**

3 Ergebnisse ..... - 59 -
- **3.1 Wie und wo ist das *CAV-1*-Gen exprimiert? ..... - 60 -**
- **3.2 Ist der *CAV-1*-Promoter methyliert? ..... - 68 -**
- **3.3 Was ist die Ursache der fehlenden *CAV-1*-Expression in LNCaP? - 77 -**
- **3.4 *CAV-1*, ein weiteres Gen mit Imprinting auf 7q3? ..... - 86 -**
- **3.5 Besteht eine Assoziation zwischen genetischen Varianten des *CAV-1*-Gens und dem Prostata-Karzinom bzw. seiner aggressiven Form? ... - 89 -**

4 Diskussion ..... - 94 -
- **4.1 Assoziation zwischen *CAV-1* und dem Prostata-Karzinom ..... - 95 -**
- **4.2 Funktionelle Untersuchungen zum *CAV-1*-Gen ..... - 101 -**
- **4.3 Epigenetische Modifikation der Transkription des *CAV-1*-Gens - 107 -**
- **4.4 Eingrenzung potentieller Mechanismen der *CAV-1*-Repression *in vitro* ..... - 109 -**
- **4.5 Mechanismen der Repression von *CAV-1* ..... - 116 -**

5 Zusammenfassung ..... - 118 -

6 Literaturverzeichnis ..... - 120 -

Abkürzungen

5-Aza-CdR	5-Aza-2´-Desoxycytidin
aa	Aminosäure (amino acid)
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BS	Natrium-Bisulfit
CAPB	Cancer of the Prostate and Brain
CAV-1	Caveolin-1
DNMT	DNA Methyl-Transferase
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
EMD	Enzymatische Mutationsdetektion
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
LD	Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LOH	Loss of heterozygosity (Heterozygotie-Verlust)
nt	Nukleotid (Position)
OR	Odds Ratio
ORF	Open Reading Frame
PCa	prostate carcinoma (Prostata-Karzinom)
PCaP	Predisposing carcinoma of the prostate
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD 98059	2´-Amino-3´-Methoxyflavone
PKI	Protein Kinase A Inhibitor (cAMP-Dependent Protein Kinase Inhibitor)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzel-Basen-Polymorphismus)
TSA	Trichostatin A
TSG	Tumor suppressor gene
UTR	Untranslated Region

1 Einleitung

Die Aufklärung genetischer Krankheitsursachen ist ein wichtiger Teil der medizinisch-biologischen Forschung. Sie ist entscheidend für das Verständnis der Ätiologie und damit Voraussetzung für verbesserte Prävention, gezielte Therapie und genetische Beratung. Außerdem liefern Untersuchungen fehlerhafter biologischer Prozesse immer Erkenntnisse über den ungestörten Prozess und tragen auf diese Weise zu unserem Verständnis der Biologie des Menschen bei.

Um Krankheiten und deren Ursachen bekämpfen zu können, muss man deren Genetik verstehen können. Auf der Suche nach genetischen Defekten muss man sich deshalb den Auslösern dieser Defekte widmen. Kandidaten-Gene sind Gene, bei denen aufgrund einer bekannten Eigenschaft (Funktion, Expressionsmuster, chromosomale Lokalisation, Strukturmotiv) eine Beteiligung an der Pathogenese verschiedener Krankheiten vermutet werden kann. Diese Gene werden gezielt untersucht. Mutationsscreenings in Kandidaten-Genen haben das Ziel, Sequenz-Veränderungen zu finden, die ausschließlich oder gehäuft bei Patienten auftreten. Eine Assoziation von Genotyp und Phänotyp/Krankheit deutet auf eine ursächliche Beteiligung des Gens hin. Ein Kausalzusammenhang wird wahrscheinlicher, wenn die Mutation zu einer Aminosäure-Veränderung führt, insbesondere in konservierten und daher vermutlich funktionell wichtigen Bereichen des Proteins.
Eine andere Möglichkeit, Kandidaten-Gene zu identifizieren, sind Assoziationsstudien mit polymorphen Markern, die entweder nahe am oder im Kandidaten-Gen liegen. Stellt sich eine Assoziation von Markern mit dem Krankheitsphänotyp heraus, deutet dies auf eine ursächliche Mutation in der Nähe hin, die mit dem polymorphen Marker im Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) steht (100).
Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Ansätze für das *CAV-1*-Gen verfolgt, um seine Relevanz für das Prostata-Karzinom zu prüfen.

1.1 Die Prostata

1.1.1 Struktur der Prostata

Die Vorsteherdrüse (Prostata, griech. προστατη = Vorsteher, Vordermann; προστεναι = sich voranstellen) ist die größte androgenabhängige, exokrine, akzessorische Geschlechtsdrüse des

Mannes. Im Erwachsenenalter erreicht dieses Organ ein Gewicht von ca. 20 bis 25 Gramm und hat einen Durchmesser von durchschnittlich 3,5 x 1,8 cm. Die Prostata liegt zwischen Harnblasengrund und *Diaphragma urogenitale*. Sie wird von einer festen bindegewebigen *Capsula prostatica* umhüllt.

Die Zonen-Anatomie der normalen Prostata wurde von *McNeal 1965* erstmals beschrieben und unterscheidet wie in Abbildung 1 dargestellt, eine periphere Zone, eine Übergangs- oder Transitionalzone und eine zentrale Zone (124).

Die normale Prostata eines Erwachsenen besteht aus peripherem Drüsenepithel und fibromuskulärem Stroma. Der Drüsenteil setzt sich aus einer großen peripheren Zone und einer kleinen zentralen Zone zusammen, die beide etwa 95% der Drüse ausmachen. Der Rest baut sich aus Transitionszone und periurethralen Drüsen auf. Das Wachstumsverhalten der Prostata ist einzigartig. Es ist wahrscheinlich das einzige menschliche Organ, das im Laufe des Lebens weiter wächst, so dass die Prostata eines 65-jährigen Mannes im Schnitt 2-3mal so groß ist wie die eines 20-Jährigen. So wurde von *Berry et al.* 1984 (9) entdeckt, dass diese Drüse zwischen 0.4 und 1.6 g pro Jahr wächst. Die Faktoren, die zu diesem Wachstum führen, sind gänzlich unbekannt. Während der größte Teil der Alters-bedingten Zunahme der prostatischen Masse häufig auf eine Hyperplasie der periurethralen oder Übergangszone der Drüse zurückzuführen ist, werden Läsionen, die histologisch als Prostata-Karzinom identifizierbar sind, mit der gleichen Häufigkeit gefunden. Obwohl nur wenige dieser Läsionen letzten Endes zu einer klinisch manifesten Krankheit fortschreiten, heben diese Eigenschaften die enorme Prädisposition der Prostata hervor, in ein abnormes Wachstum überzugehen. Das Verständnis dieser charakteristischen Eigenschaften der Prostata auf molekularer, genetischer Ebene stellt ein wichtiges Ziel der Studie der molekularen Biologie der Prostata dar.

1.1.2 Physiologie der Prostata

Die Aufgabe der Prostata besteht in der Produktion eines hochwertigen biologischen Sekretes, das im Rahmen der Ejakulation in das Seminalplasma abgegeben wird. Das Prostata-Sekret wird von dem sekretorischen Epithel der Prostata gebildet. Es setzt sich außerdem aus den Sekretionen der Samenblasen, der Cowper und Littreschen Drüsen zusammen.

Das von den oben genannten Drüsen produzierte schwach saure Sekret der Prostata wird während der Ejakulation in einzelnen Fraktionen sequentiell der Samenflüssigkeit zugeführt und dient unter anderem der Regulation der Spermien-Motilität (6).

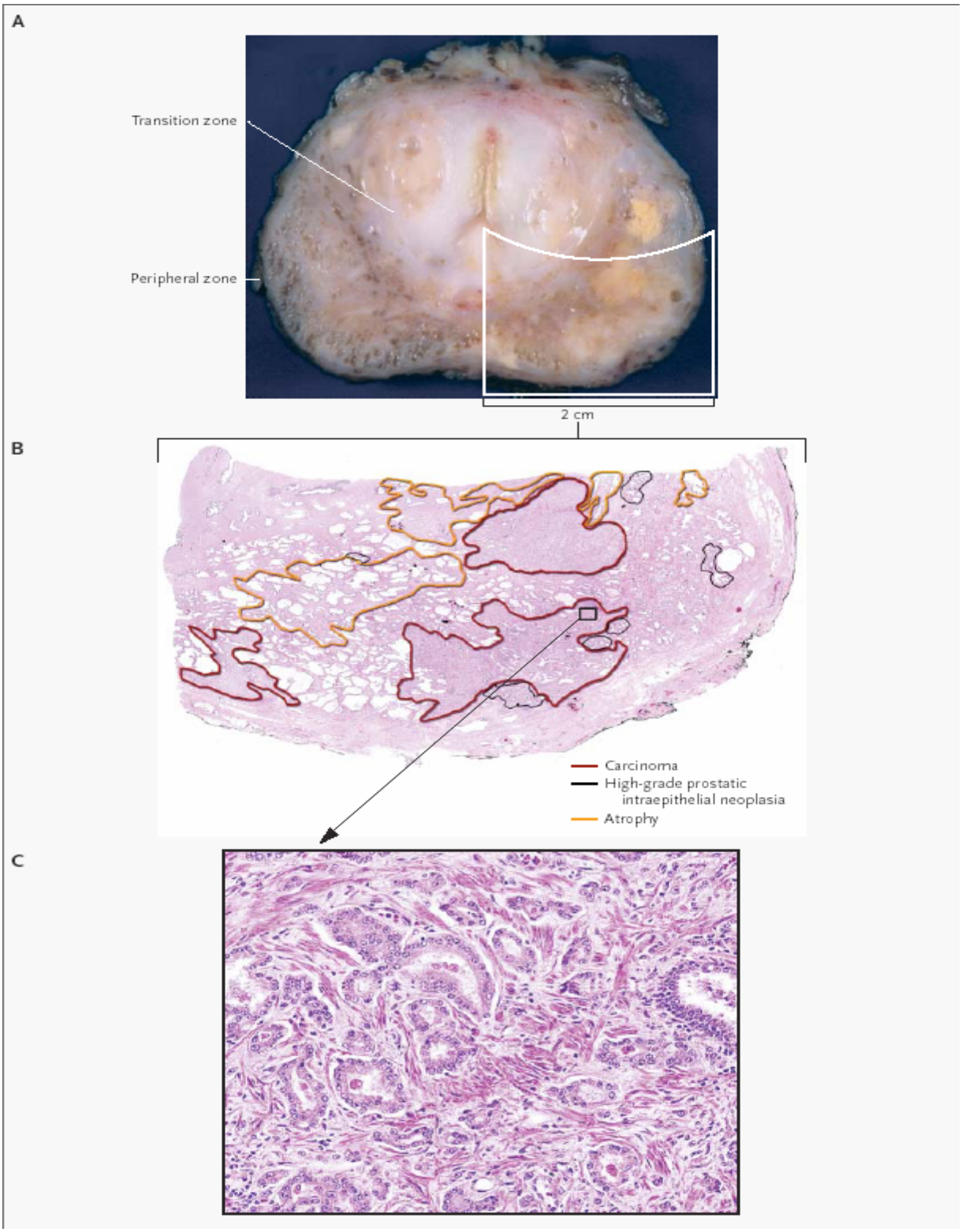


Abb. I-1: Die humane Prostata. A) Anatomische Zonenunterteilung der Prostata. B) Flächenschnitt durch die Transitionalzone der Prostata mit Karzinomen, High Grade PIN und atrophen Arealen. C) Hämatoxilin-Eosin-Färbung eines Karzinoms.

1.2 Das Prostata-Karzinom

Die Prostata ist trotz intensiver weltweiter Forschung in ihrer Physiologie und Pathologie ein bis heute weitgehend unverstandenes Organ. Die Drüse ist der Entstehungsort der häufigsten benignen und malignen Proliferationsprozesse beim Mann, der benignen Prostata-Hyperplasie (BPH) bzw. des Prostata-Karzinoms (PCa).

Äußerst wichtige Fragen vom klinischen Standpunkt aus betrachtet sind: Was sind die für die Initiation und Progression des Prostata-Karzinoms verantwortlichen molekularen Ereignisse? Warum und wie entwickelt sich das Prostata-Karzinom von einer inzidentiellen zu einer lebensbedrohlichen Krankheit? Ist diese Entwicklung unausweichlich oder gibt es Karzinome, die zeitlebens nicht zu einer bedrohlichen Form fortschreiten?

Das Prostata-Karzinom (MIM 176807) gehört zu den häufigsten malignen Tumor-Erkrankungen bei Männern in vielen Industrie-Nationen und stellt damit ein großes Problem für das Gesundheitswesen dar. In den meisten Fällen handelt es sich bei PCa um androgen-abhängig wachsende, kleine, gut differenzierte Adenokarzinome, die meist multifokal und nur selten unifokal auftreten.

In Deutschland werden derzeit jährlich etwa 31.500 Prostata-Karzinome diagnostiziert. Damit ist die Prostata mit 18.7% inzwischen die häufigste Lokalisation bösartiger Neubildungen beim Mann und hat damit 1998 erstmals das Bronchial-Karzinom als führenden Tumor der Männer abgelöst (5).

1.2.1 Ätiologie und Inzidenz des Prostata-Karzinoms

Das PCa ist eine Erkrankung mit genetischen und umweltbedingten Faktoren. Epidemiologische Studien bestätigen immer wieder diese genetische Komponente, die etwa 36-57% der Ursachen ausmacht (2; 138). Dennoch sind die Mechanismen der Tumor-Initiation und -Progression dieses ätiologisch multifaktoriellen und komplexen Karzinoms nur ungenügend verstanden.

Die Inzidenz dieses Karzinoms variiert weltweit sehr stark. So ist sie in den USA, Kanada, Schweden, Australien und Frankreich (48.1-137.0 Fälle/100000Personen/Jahr zwischen 1988-1992) besonders hoch. Viele andere europäische Länder haben mittlere Inzidenzen (23.9-31.0 Fälle/100000Personen/Jahr), während sie in asiatischen Ländern besonders niedrig ist (2.3-9.8 Fälle/100000 Personen/Jahr) (79; 163). Die deutliche ethnische Variation in der Inzidenz des PCa zwischen Asiaten bzw. Kaukasieren und Schwarzen in den USA ist u.a. mit unterschiedlichen umweltbedingten Risikofaktoren wie Ernährungsgewohnheiten in Zusammenhang

gebracht worden (23; 97). Des Weiteren werden hormonelle Faktoren und Populationsunterschiede in den Häufigkeiten genetischer Polymorphismen als Ursache für die Inzidenz-Unterschiede diskutiert (79; 174; 202).

Eine positive Familiengeschichte ist sicher einer der stärksten epidemiologischen Risikofaktoren für das Prostata-Karzinom. Schätzungsweise 10-15% aller Männer mit PCa haben mindestens einen Verwandten, der ebenfalls betroffen ist (75; 202).
Dass erbliche Faktoren beim Prostata-Karzinom eine herausragende Rolle spielen, belegen Studien, die an Zwillingen durchgeführt wurden. Unterschiede in den Konkordanz-Raten zwischen mono- und dizygoten Zwillingen geben Aufschluss über die Höhe des erblichen Beitrags zum Krankheitsrisiko. Die Heritabilität bezeichnet dabei die genetische Varianz anteilig an der gesamten Varianz in der Merkmalsausprägung.
Zahlreiche Zwillingsstudien belegten, dass das Prostata-Karzinom in monozygoten Zwillingspaaren vier- bis fünfmal häufiger gemeinsam auftritt als in dizygoten Paaren (2; 67; 138). *Lichtenstein et al.* konnten in ihrer bislang größten Zwillingsstudie zu erblichen Krebserkrankungen, die anhand von 44788 Zwillingspaaren aus dem schwedischen Zwillings- und Krebsregister durchgeführt wurde, für das Prostata-Karzinom einen signifikanten genetischen Beitrag finden und eine Heritabilität von 42 % errechnen (111).
In den USA hat man ebenfalls aus einer Zwillings-Datenbank über 1000 Zwillingspaare verglichen, von denen mindestens einer ein PCa hatte. Unter den monozygoten Zwillingen gab es mehr konkordante Paare, also beide Brüder hatten ein PCa, während es bei den dizygoten deutlich weniger waren.

Auch einige Fall-Kontroll-Studien, in denen das Erkrankungsrisiko für Verwandte von Männern mit Prostata-Karzinom mit dem Risiko Verwandter gesunder Kontrollpersonen verglichen wurden, zeigten, dass eine positive Familien-Vorgeschichte für das Prostata-Ca einen wichtigen Risikofaktor darstellt (**zur Übersicht siehe** (37). Bestätigt werden die Hinweise auf die Bedeutung genetischer Faktoren durch die Beobachtung, dass das relative Risiko für Prostata-Krebs mit der Zahl der betroffenen Verwandten und mit einem jüngeren Erkrankungsalter des Betroffenen ansteigt (107). Während einige Studien jedoch zeigten, dass das relative Risiko für Väter und Brüder eines Probanden gleich hoch ist (61), was für ein autosomal-dominant vererbtes Suszeptibilitätsgen spricht, zeigten andere, dass das Risiko zum Teil deutlich höher war, wenn der Bruder ein Prostata-Karzinom hatte. Letzteres deutet eher auf einen autosomal-rezessiven oder X-gebundenen Erbgang hin (90). Diese unterschied-

lichen Befunde lassen bereits erahnen, dass es sich beim Prostata-Karzinom um eine genetisch heterogene Erkrankung handelt, wobei die einzelnen Suszeptibilitätsgene unterschiedlichen Erbgängen folgen. Dies hat sich mittlerweile in molekular-genetischen Untersuchungen (Kopplungsanalysen) bestätigt.
Um detaillierte Vorhersagen über die Vererbung von möglichen Suszeptibilitätsgenen machen zu können, wurden in der Vergangenheit Segregationsanalysen durchgeführt.
Eine von *Carter et al*. 1992 an 691 Familien durchgeführte Analyse postulierte ein autosomal-dominantes Modell mit einem seltenen Suszeptibilitätsgen bei hoher Penetranz (88% der Genträger erkranken bis zum 85. Lebensjahr) (17). Die Frequenz des prädisponierenden Gens wird in verschiedenen Studien auf etwa 0.003 bis 0.006 geschätzt. Dieses Gen könnte für 43% der Prostata-Karzinom-Erkrankungen, die bis zum Alter von 55 Jahren, bzw. 9% der Erkrankungen, die bis zum Alter von 80 Jahren auftreten, verantwortlich sein.
Eine Vielzahl prädisponierender Loci sind in der Vergangenheit über Kopplungsanalysen (Linkage-Analysen) entdeckt worden. Bei dieser Art Studien werden polymorphe Mikrosatelliten-Marker genutzt, um in geeigneten Familien nach Kopplung (d.h. gemeinsame Vererbung von Phänotyp/Krankheit mit Allelen) zwischen einem oder mehreren Markern und einem potentiellen Krankheitslocus zu suchen. In der Regel werden solche Linkage-Studien zunächst über das ganze Genom durchgeführt, was einerseits die tatsächliche Existenz eines prädisponierenden Genes beweist und andererseits eine Aussage über die ungefähre chromosomale Lokalisation des Krankheitslocus ermöglicht. Nach Identifizierung einer möglichen Kandidaten-Region kann dann durch Assoziationsstudien und Mutationsanalysen das verantwortliche Gen gesucht werden.

1.2.2 Klinik des Prostata-Karzinoms

Nach sonographischen und morphologischen Analysen entwickeln sich etwa 70% der Prostata-Karzinome in der peripheren Drüsenzone, etwa 20% der Tumoren finden sich in der Transitionszone, insbesondere hochdifferenzierte inzidentielle Karzinome (Transitionszonen-Karzinome), und etwa 10% in der zentralen Zone der Prostata (125). 95% der Prostata-Karzinome sind Adeno-Karzinome, die häufig multifokal auftreten und sich in der peripheren Zone entwickeln. Ein Vorläufer ist die prostatische intraepitheliale Neoplasie (PIN), die zwar die zytologischen Charakteristika eines Prostata-Karzinoms aufweist, bei der jedoch im Gegensatz zum Karzinom die Basal-Membran erhalten ist. Eine hochgradige PIN (HGPIN) ist in 80% der Fälle mit einem invasiven PCa assoziiert. Das Tumor-Wachstum erfolgt meist in Richtung Apex, wobei die Organkapsel zunächst eine Barriere darstellt. Bei weiterem

Progress des Tumors wird die Prostatakapsel penetriert und die Samenblasen infiltriert. Charakteristisch ist das Wachstum entlang der Nervenscheiden. Die Metastasierung erfolgt lymphogen in die pelvinen Lymphknoten und hämatogen v.a. in Skelett, Leber und Lunge.
Die benigne prostatische Hyperplasie (BPH) entwickelt sich hauptsächlich aus dem periurethralen Stroma und den Drüsen der Transitionszone. Ein Zusammenhang mit dem Karzinom bzw. ein Übergang von BPH in ein Karzinom wird heute nicht mehr vermutet.

1.2.3 Manifestationsformen des Prostata-Karzinoms

Nach den verschiedenen klinischen Entwicklungsstadien des Prostata-Karzinoms werden vier Manifestationstypen unterschieden:

- *Inzidentielles Prostata-Karzinom:* präsentiert sich als Zufallsbefund ohne klinischen Verdacht; z.B. im Rahmen einer transurethralen Resektion (TURP) bei einer bestehenden benignen Prostata-Hyperplasie. Der Palpationsbefund ist unauffällig, die PSA-Serum-Konzentration liegt im Normbereich.
- *Latentes Prostata-Karzinom (klinisch inapparentes Karzinom):* wird zu Lebzeiten nicht diagnostiziert und erst im Rahmen einer histologischen Aufarbeitung der Prostata bei einer Autopsie gefunden, ohne je klinisch manifest geworden zu sein.
- *Okkultes Prostata-Karzinom*: primärer Nachweis von schon vorhandenen Metastasen, wird erst im Rahmen der Primärtumorsuche diagnostiziert.
- *Klinisch manifestes Prostata-Karzinom*: rektal palpabler Tumor und/oder Erhöhung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA). In den meisten Fällen hat der Patient bei Diagnosestellung keine klinischen Symptome und Beschwerden.

Ausgangspunkt der malignen Proliferation sind die azinären Zellen des Drüsenepithels in der äußeren Zone des Prostatagewebes. 70% der Karzinome entstehen in der peripheren Zone, ca. 20% in der Übergangs- oder Transitionalzone. Die zentrale Zone spielt in der Karzinom-Lokalisation im Gegensatz zur BPH kaum eine Rolle. Die prostatische intraepitheliale Neoplasie (PIN) wird in eine „high-grade“ und eine „low-grade“ PIN unterteilt. Während sich die high-grade PIN zu einem Prostata-Karzinom entwickeln kann, wird der low-grade PIN kein Entartungspotential zugesprochen. Histologisch dominieren Adenokarzinome verschiedener Differenzierungsstufen, von hochdifferenzierten bis anaplastischen Graden mit zum Teil unterschiedlichen Wachstumsmustern, wie zum Beispiel die kribiforme, trabekuläre oder tubuläre Form (70; 76)

1.2.4 Diagnostik und Beurteilung

Das PCa verursacht in den frühen Stadien keine Symptome. Wenn Symptome auftreten, meist Miktitionsbeschwerden, Dysurie, evtl. Hämaturie, Kreuz- und Rückenbeschwerden, sind dies Hinweise auf ein lokal fortgeschrittenes bzw. bereits metastasiertes Karzinom. Die Diagnostik erfolgt mittels digitaler rektaler Untersuchung (DRU), der Bestimmung saurer Phosphatasen und des prostata-spezifischen Antigens (PSA) (siehe unten) und transrektaler Ultraschall-untersuchung (TRUS), ggf. ergänzt durch sog. Sextantenbiopsien oder transrektale Feinnadel-biopsien. Weitere Untersuchungen dienen der Abklärung der Stadien (Staging). Das Staging erfolgt nach dem TNM-System, bei dem der primäre Tumor (Tumor), der regionäre Lmyphknotenbefall (Noduli) und Fernmetastasen (Metastasen) bewertet werden. Der Grad der Malignität (Grading) wird histomorphologisch und anhand von Zellkern-Atypien beurteilt. Im Gleason-System (62) wird die glanduläre Architektur, also die kontinuierliche Entdifferenzierung des Gewebes bei geringer mikroskopischer Vergrößerung bewertet und in die Grade 1–5 unterschieden.



Muster	Drüsenform	Drüsengröße	Drüsenabstand	Herdgrenze	Stroma-invasion
1	Einzeln, rund	Mittel	Dicht gepackt	Scharf	Minimal
2	Einzeln, gerundet, variabler als in Muster 1	Mittel	Bis zu 1 Drüsen-durchmesser von-einander entfernt	Weniger scharf	Mild
3	Einzeln, unregelmäßig	Klein, mittel, groß	Mehr als 1 Drüsen-durchmesser von-einander entfernt	Schwer erkennbar	Mäßig
	oder				
	papilläres oder kribriformes Epithel	Mittel oder groß	Rundliche Massen mit glattem scharfen Rand	Schwer erkennbar	Ausgedehnt
4	Verschmolzene glanduläre Massen oder "hypernephroid"	Klein	Verschmolzen	Unscharf infiltrierend	Stark
5	Einige winzige Drüsen oder Siegelringzellen	Klein	Anaplastische Epithelmassen	Unscharf infiltrierend	Sehr stark
	oder				
	wenige kleine Lumina in solidem Epithel, zentrale Nekrose	Klein	Rundliche Massen und Stränge mit glatten scharfen Rändern	Schwer erkennbar	Ausgedehnt

Abb. I-2: Histologische Kriterien des Grading (nach Gleason 1992). Aus: (159)

Da häufig unterschiedliche Differenzierungsgrade in verschiedenen Tumor-Anteilen vorliegen, wird der am häufigsten und der am zweit häufigsten beschriebene Grad zum Gleason-Score (2-10) addiert. Ein Gleason-Score von 2-4 entspricht einem gut differenzierten, von 5-7 einem mäßig differenzierten und von 8-10 einem schlecht oder entdifferenzierten Karzinom. Der Gleason-Grad misst also die Aggressivität der Erkrankung.

1.2.5 Therapie

Die Besonderheit des PCa besteht darin, dass ein Großteil der Patienten wegen der langsamen Progression nicht am Tumor, sondern an tumorunabhängigen Erkrankungen stirbt. Die optimale Therapie des PCa ist schwierig festzulegen. Somit ist die Frage des Urologen *Whitmore* mehr als verständlich: „Ist die Behandlung des PCa nötig, wenn sie möglich ist? Ist sie möglich, wenn sie nötig ist?“ (201). Leitlinien zur Therapie von Prostata-Karzinomen liegen von der deutschen Gesellschaft für Urologie vor (127). Die Wahl der Behandlungsverfahren ist abhängig vom klinischen Stadium und histologischen Differenzierungsgrad des Tumors, dem Gesundheitszustand und der Lebenserwartung des Patienten und der Effizienz des Verfahrens, und damit sehr individuell. Zur Verfügung stehen bei kurativer Zielsetzung die radikale Prostatektomie mit regionaler Lypmhknoten-Ausräumung, eine Strahlentherapie sowie palliativ der Entzug der männlichen Sexual-Hormone (operativ durch Orchidektomie, medikamentös durch GnRH-Analoga oder Anti-Androgene). Allerdings entwickeln Patienten mit bereits metastasierten Karzinomen häufig hormonunabhängig wachsende Tumoren. Bei älteren Patienten mit kleinen und gut differenzierten Karzinomen kann auch eine abwartende Strategie (watchful waiting) angemessen sein.

1.2.6 Früherkennung

Die Bemühungen, das PCa zu erkennen und zu behandeln, haben in den letzten Jahren weltweit zugenommen. Neben der rektalen Palpation (Untersuchen durch Tasten) hat die Bestimmung des Serum-PSA-basierten Screenings asymptomatischer Männer immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dies führte v.a. in den Ländern, in denen PSA als Standard-Screening eingesetzt wird, zu einem Anstieg der Inzidenz des Prostata-Karzinoms in den 1990ern Jahren (8; 46; 66; 145; 183).

PSA, ein Mitglied der humanen Kallikrein-Familie, ist eine 33 kDa Glykoprotein-Serin-Protease, die vom Prostata-Epithel und der Epithel-Grenze der periurethralen Drüsen produziert wird. Das prostata-spezifische Antigen wird nahezu ausschließlich vom Gewebe der Prostata gebildet (Ausnahmen: Mamma-Karzinom, Pankreas, Speicheldrüsen, periurethrale Drüsen) und als klinisch nutzbarer Tumormarker in das Serum abgegeben. PSA kann im Zytoplasma von epithelialen Zellen der Prostata innerhalb der endoplasmatischen Vesiculae und Vakuolen nachgewiesen werden. Es spielt eine bedeutende Rolle bei der Verflüssigung des Ejakulats und dem Freisetzen der Spermatozoen (112).

Der präoperative PSA-Level spiegelt sowohl Tumor-Grad als auch Tumor-Volumen wider und eignet sich besonders zur Erkennung eines Tumor-Progresses. Die Empfehlung der deutschen Krebsgesellschaft von 1999 (127) lautet: Bei negativem Tastbefund wird das weitere Vorgehen vom PSA-Wert abhängig gemacht. Bei einem PSA <4 ng/ml wird jährlich kontrolliert, während bei einem PSA von 4-10 ng/ml eine Kontrolle alle 4-6 Wochen erfolgt. Bei einem Wert > 10 ng/ml wird biopsiert. Bei Karzinomverdacht wird eine 2. Biopsie unter Einschluss der Transitionszone vorgenommen. Allerdings ist PSA nicht Prostata-Karzinom-spezifisch, da das Gen zwar selektiv in der Prostata aber auch in gesundem Gewebe exprimiert wird. PSA ist ein gewebe- und organspezifischer, nicht jedoch tumor-spezifischer Marker. Es kann zum Anstieg des PSA-Wertes nicht nur im Karzinom, sondern auch in der BPH, der benignen Prostata-Hyperplasie, bei akuter Prostatitis, bei einem Trauma der Prostata oder unter anderen Bedingungen, die die Intaktheit der Drüse beeinträchtigen (183), wie z.B. nach diagnostischen und therapeutischen Eingriffen (bei Zystoskopien, Urethroskopien, der digital rektalen Untersuchung) kommen (133). Deshalb scheint der Serum-PSA-Level nicht spezifisch genug zu sein, um eine akkurate Vorhersage über den pathologischen oder klinischen Zustand treffen zu können (8; 145).

Ein Dilemma, dem Urologen heute gegenüberstehen, ist die Frage, ob alle Patienten, die aggressiv durch eine Operation behandelt wurden, auch von dieser Behandlung, die mit einer signifikanten Morbidität assoziiert ist, profitieren. Bis zu 16% der radikal Prostatektomierten haben nur kleine und gut differenzierte Tumoren, die wohl niemals klinische Signifikanz im Laufe des Lebens des Patienten erreicht hätten. Andererseits werden mehr als 50% der Tumoren, die vor der OP als klinisch beschränkt galten, daraufhin als nicht auf die Prostata beschränkt befundet und stellen daher ein hohes Progressionsrisiko dar. Einige präoperative und pathologische Kriterien, einschließlich PSA-Wert und der Grad des Tumors, zeichnen sich als wichtige Vorhersage-Kriterien für das pathologische und klinische Resultat aus. Allerdings ist die prädiktive Power für den im mittleren Teil dieser Kriterien liegenden Tumoren reduziert. Da sich eine Steigerung der Spezifität durch Bestimmung der PSA-Dichte (PSA/Prostatavolumen), der PSA-Velozität (PSA-Veränderung/Zeit), des freien und gebun-denen PSA oder durch den Bezug auf die altersabhängige PSA-Referenz nicht eindeutig erreichen lässt (13), scheinen zusätzliche oder bessere Biomarker notwendig, die spezifisch für Prostata-Tumoren und/oder Metastasen sind.

1.3 Die Genetik des Prostata-Karzinoms

Entstehung und Progression von Tumoren werden durch Funktionsstörungen von spezifischen Genen gesteuert. Obwohl das PCa zu den häufigsten Tumoren gehört, ist über die bei diesem Tumor involvierten Gene wenig bekannt.

Molekular-zytogenetische und -genetische Studien konnten zahlreiche, nicht-zufällige genetische Veränderungen in Prostata-Karzinomen identifizieren. Nichtsdestotrotz wird die genetische Basis der Initiation und Progression dieser Krankheit bis heute nicht vollständig verstanden. Die schrittweise Akkumulation genetischer Veränderungen in Onkogenen, Tumor-Suppressor-, Metastasis-Suppressor-, Metastasis-auslösenden und DNA-Mismatch-Reparatur-Genen führt schließlich zur Karzinogenese und Tumor-Progression, lässt aber z.B. im Unterschied zum Kolon-Karzinom keine einheitliche Abfolge von Ereignissen erkennen.

1.3.1 Tumor-Progression

Tumor-Zellen durchlaufen wie in Abbildung I-3 gezeigt verschiedene Stadien.

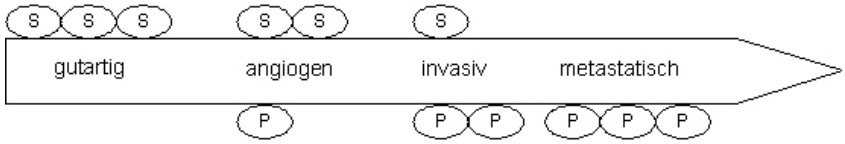


Abb. I-3: Die verschiedenen Stadien zur Tumorzelle.

Tumor-Zellen entwickeln sich von gutartig, über angiogen (sie beginnen ihre eigene Blutversorgung zu etablieren), über invasiv (sie können umliegendes Gewebe infiltrieren) zu metastasierend (sie breiten sich auf andere Organe aus). Auf genetischer Ebene ist diese Progression durch den letztendlich funktionellen Verlust von Metastasis-Suppressor-Genen (S) bei gleichzeitigem Gewinn von aktiven Tumor- oder Metastasis-fördernden Genen (P) charakterisiert.

1.3.2 Genetische Veränderungen im PCa

Mutationen kennzeichnen Gene, die signifikant dazu beitragen, dass eine Zelle entartet. Inaktivierende (loss-of-function) Mutationen definieren Tumor-Suppressor-Gene (TSG), wohingegen aktivierende (gain-of-function) Mutationen Onkogene charakterisieren. Für viele Neoplasien sind die prädisponierenden Gene und deren Funktion bekannt. Das Prostata-Karzinom stellt hier jedoch eine Ausnahme dar. Mittels Linkage-Analysen und Genom-weiten

Scans sind aber mittlerweile eine Reihe von potentiellen Loci und Suszeptibilitätsgene identifiziert worden. Eine Übersicht gibt Abbildung I-4.

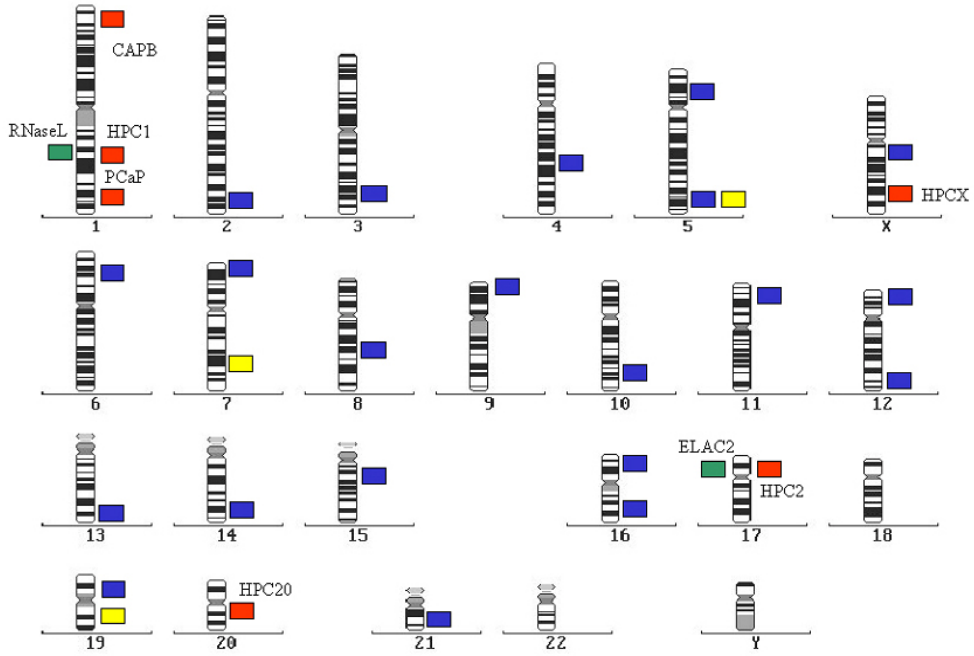


Abb. I-4: Ideogramm des humanen Karyotyps. Jeweils links neben den Chromosomen sind die Lokalisationen von Suszeptibilitätsgenen für das PCa eingezeichnet. Rechts der Chromosomen sind Suszeptibilitätsregionen dargestellt (rot: Konsensus Regionen; blau: Potentielle Regionen aus Kopplungsanalysen; gelb: Aggressivitätsloci).

Die genetischen Veränderungen, die im PCa beobachtet werden, sind hauptsächlich Verluste von chromosomalen Regionen, wobei Verluste etwa fünfmal häufiger beschrieben sind als Zugewinne. Zytogenetische Daten aus Chromosomen-Analysen (129) und CGH-(comparative genome hybridization)-Untersuchungen (87; 196) berichteten von einem Zugewinn von 7q. Häufige DNA-Sequenz-Amplifikationen von Chromosom 7, 8q und 11q deuten möglicherweise auf die Lokalisation von Onkogenen hin.

Daneben wurden diverse molekular- und zytogenetische Untersuchungen, wie Allelotypisierungs-, Chromosomen-Deletions-, und Verlust der Heterozygotie-(LOH)-Studien, spezifischer chromosomaler Regionen durchgeführt, um Stellen im Genom zu identifizieren, in denen für das Prostata-Karzinom Tumor-Suppressor-Gene lokalisiert sind. Diese Untersuchungen konnten häufige allelische Deletionen und Imbalanzen auf vielen Chromosomen-Segmenten, einschließlich 7q, aufzeigen (15; 33; 82; 101). Von chromosomalen Deletionen sind besonders häufig das Y-Chromosom, 7q, 8p, 10q, 13q, 16q und 17p betroffen. Diese Loci dürften für das PCa relevante TSGs enthalten. Im Detail wurden genetische Veränderungen in der Bande q22-q32 von Chromosom 7 in Prostata-Karzinomen berichtet (80; 82; 83; 186; 219). Deletionen dieser Region sind ebenfalls an der Pathogenese zahl-

reicher humaner Karzinome anderer Organe beteiligt, einschließlich Brustkrebs (114; 216), Ovarialkarzinom (220), Pankreas-Karzinom (1), Kolorektalkarzinom (218) und PCa (33).
Zahlreiche spezifische polymorphe Mikrosatelliten-Marker (D7S523, D7S486, D7S522, D7S2460 und D7S480) auf 7q31 dienten der LOH-Analyse dieser Region. Von diesen Markern war D7S522 der Informativste. Man fand eine starke Korrelation zwischen allelischer Imbalanz von D7S522 und der Prostata-Karzinom-Progression und Tod durch PCa. In dieser 7q31 Region werden zahlreiche, potentielle Tumor-Suppressor-Gene, die auch mit dem PCa assoziiert sind, vermutet (20; 114; 192; 217-220). Eines dieser putativen TSG könnte eine entscheidende Rolle für die klinische Aggressivität und Progression einiger Tumoren spielen (186). Nahe dieser Position konnte durch Linkage-Analysen ein Aggressivitätslocus lokalisiert werden (207). Die Kopplung zu Chromosom 7q31-33 konnte schließlich in der eigenen Arbeitsgruppe in 10 Familien mit einer aggressiven Form der Krankheit bestätigt werden (139).
Zusätzlich zu Deletionen, Mutationen und Chromosomen-Translokationen, können auch Veränderungen der DNA-Methylierung die Expression eines Gens beeinflussen.

1.4 DNA-Methylierung

Methylierung ist eine Enzym-vermittelte chemische Modifikation, die Methyl-(CH_3)-Gruppen an ausgewählte Stellen in Proteinen, DNA und RNA hinzufügt. Die Methylierungsmuster der DNA werden früh in der Embroygenese gelöscht und früh in der Entwicklung wieder hergestellt.

1.4.1 Mechanismen der DNA-Methylierung

Die Methylierungsmaschinerie umfasst zahlreiche Methyl-Transferasen, De-Methylasen, Methylierungszentren, die die Methylierung triggern, sowie Methylation-Protection-Centers, die Proteine beinhalten, die an CpG-Inseln binden und diese frei von Methylierung halten. Drei Methyl-Transferasen (DNMTs) katalysieren zwei unterschiedliche Reaktionen: den Erhalt der Methylierung und die *de novo*-Methylierung. DNMT1 hat eine hohe Affinität für neu-synthetisierte, hemi-methylierte DNA und hält das Methylierungsmuster aufrecht, indem es die Methylierung vervollständigt. DNMT3a und 3b als *de novo*-Methyl-Transferasen setzen neue Methylierungsmuster, indem sie eine Methyl-Gruppe vom Methyl-Donor S-adenosyl-L-Methionin (SAM) auf die 5´-C-Position von Cytosin übertragen (Abbildung II-4).

Generell sind nur etwa 3-4% der Cytosin-Reste in der Säuger-DNA methyliert und die meisten dieser Methyl-Cytosine treten in CG-Dinukeotiden auf (156). Ursprünglich wurden CpG-Inseln (60) als Regionen größer als 200 bp mit einem hohen GC-Gehalt und einem beobachteten/erwarteten Verhältnis für das Vorkommen von CpGs > 0.6 definiert. Aufgrund der hohen Mutabilität von 5-Methyl-C sind CpGs in der Säuger-DNA mit 1-2% stark unterrepräsentiert, ein Phänomen das als CG-Suppression bezeichnet wird. Dennoch finden sich zu etwa 1% im Genom Cluster dieser CpGs, die sogenannten CpG-Inseln, vorwiegend in den 5´-regulatorischen Regionen und den ersten Exons zahlreicher Gene. Hypermethylierte Cytosine sind in repetetiven Regionen (29; 171) konzentriert, während die CpG-Inseln in Promotoren von Genen in normalen Zellen unmethyliert sind (84).

1.4.2 Methylierung als eine Ursache der Karzinogenese

Aberrante DNA-Methylierung ist nicht nur direkt mit der Entwicklung einiger Krankheiten wie dem ICF- (Immunodeficiency Centromere Instability and Facial Anomalies) und dem fragilen X-Syndrom verknüpft (72; 157; 209), sondern auch mit der Entwicklung verschiedener Karzinome. Es konnte durch Vergleichen mit Normalgewebe und normalen Zelllinien gezeigt werden, dass globale genomische Hypomethylierung eine Eigenschaft von Tumoren und Tumor-Zellen-Linien ist (28; 38; 180), wobei der Grad der Gesamt-Hypomethylierung mit dem Grad des Tumors, dem progressiven Tumor-Stadium und dem Ausmaß am Metastasen assoziiert ist (58; 113; 173; 193). Durch Methylierung in normalen Zellen stillgelegte Onkogene könnten in Tumor-Zellen re-exprimiert werden und daher zum Karzinom führen.

In menschlichen Tumoren treten zwei verschiedene Veränderungen der DNA-Methylierung auf. Mit „Hypermethylierung“ wird die verstärkte Methylierung bestimmter CpG-reicher Promotoren bezeichnet. Unter „globaler Hypomethylierung“ wird eine Verringerung der DNA-Methylierung verstanden, die vor allem repetitive Sequenzen betrifft. Hypomethylierte DNA dürfte eine direkte Ursache der Genom-Instabilität sein. In vielen Tumoren konnten spezifische Veränderungen von DNA-Methylierungsmustern identifiziert werden, die zur Diagnostik und Klassifikation geeignet erscheinen. Hypermethylierung wird heute als wichtiger Mechanismus zur Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen betrachtet. Hypomethylierung repetitiver Sequenzen während der Tumor-Progression trägt zur Destabilisierung von Chromosomen bei (**zur Übersicht siehe** (169).

Bei Prostata-Karzinomen zeichnet globale Hypomethylierung eine besonders aggressive Untergruppe aus. Diese Veränderung wurde besonders häufig in metastasierten Karzinomen

beobachtet und korrelierte hoch signifikant mit Veränderungen auf Chromosom 8, die ebenfalls mit einem aggressiven klinischen Verlauf assoziiert sind. Wie bei Harnblasen-Karzinomen (92), besteht auch bei Prostata-Karzinomen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Häufigkeit chromosomaler Veränderungen und dem Ausmaß der Hypo-methylierung (170).

Aberrante Methylierung von CpG-Inseln und damit die transkriptionelle Repression von Promotor-Sequenzen gilt auf der anderen Seite als ein alternativer Mechanismus für die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen in einer Vielzahl von Tumoren.

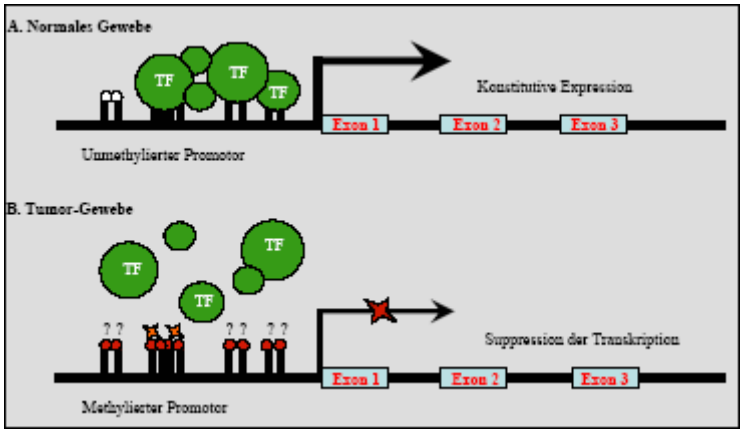


Abb. I-5: Veränderung der DNA-Methylierung in menschlichen Tumoren. A) Ein im Normal-Gewebe unmethylierter Promotor erlaubt eine konstitutive Expression seines Gens. B) Im Tumor auftretende aberrante Methylierung reprimiert die Expression, indem sie das Binden von Transkriptionsfaktoren inhibiert.

Dieser Mechanismus setzt keine Punktmutationen oder genomische Deletionen voraus. Es gibt zahlreiche Beispiele von putativen TSG, die die Korrelation zwischen hypermethylierten Promotor-Regionen dieser Gene, transkriptioneller Repression und der Entwicklung von Karzinomen deutlich machen. Beispiele hierfür wären *CDKN2A*, das $p16^{INK4a}$ kodiert, dessen epigenetische Abschaltung zu Lungen-Karzinomen (137; 222), Gliomen (27), sporadische Melanome (64), familiäre Melanome (121) sowie nasopharygeale Karzinome (117) führt; *BMP3B* in humanen Lungen-Tumor-Zellen (34), HLTF im Kolon-Karzinom (130) oder *TMS1* in humanen BRCA-Zellen (26).

1.5 Caveolin-1

1.5.1 Caveolae

Caveolae, zum ersten Mal in den 1950ern von *Palade* und *Yamada* beschrieben, erscheinen morphologisch als 50–100 nm kleine Ω-förmige Einstülpungen der Plasma-Membran (140; 210). Caveolae existieren in zwei Formen: (i) als Invaginationen der Plasma-Membran; und (ii) als Vesikel, die nahe der Membran als plasmalemmale Vesikel vorkommen. Sie sind Orte von wichtigen dynamischen und regulatorischen Ereignissen in der Plasma-Membran. In ihnen findet Trans- und Potocytose, die Aufnahme von atherogen oxidierten LDL-Partikeln, die Aufnahme von Cholera-Toxin und DNA-Tumor-Viren und das Prozessieren des Amyloid-Precursor-Proteins APP und des Scrapie-Prionen-Proteins statt (136). Zudem sind Caveolae über CAV-1 an der Signal-Transduktion beteiligt (siehe unten).

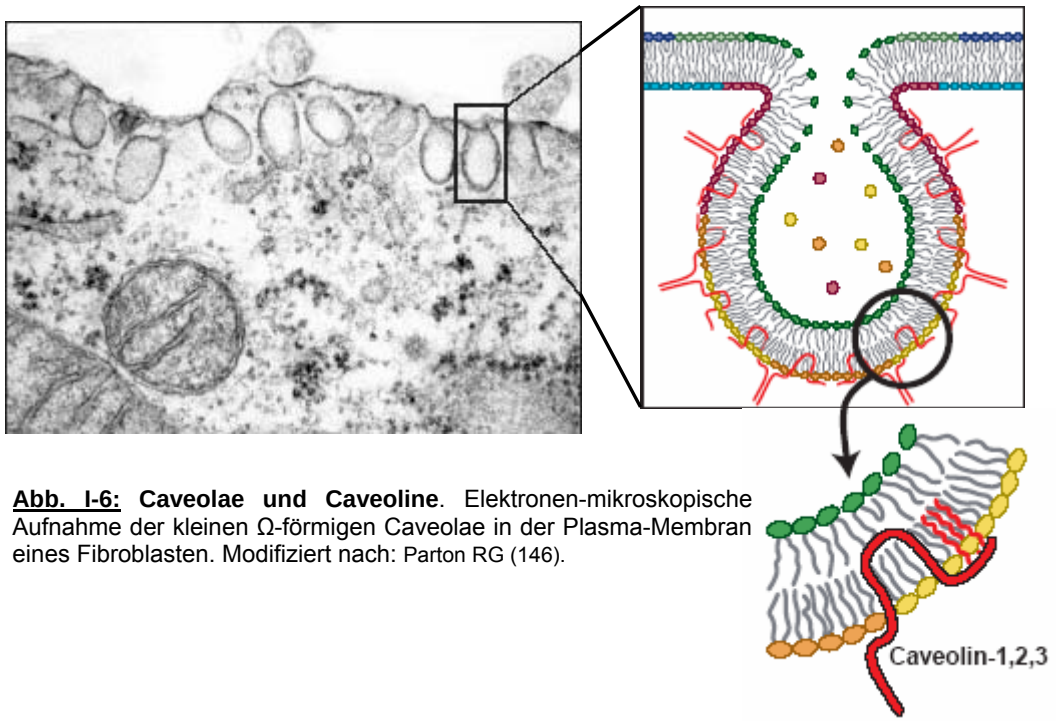


Abb. I-6: Caveolae und Caveoline. Elektronen-mikroskopische Aufnahme der kleinen Ω-förmigen Caveolae in der Plasma-Membran eines Fibroblasten. Modifiziert nach: Parton RG (146).

1.5.2 Die Caveolin-Gen-Familie und ihre Evolution

In Vertebraten gibt es drei Mitglieder der Caveolin-Gen-Familie: *CAV-1*, *-2* und *-3*. Caveolin-1 oder *VIP21*, ab hier als *CAV-1* bezeichnet, war das erste Mitglied dieser Gen-Familie, das identifiziert wurde. Es wurde als Hauptstruktur-Komponente von Caveolae und Transport-Vesikeln, die vom Trans-Golgi-Netzwerk stammen, entdeckt (98; 158). Als zytoplasmatisches Coat-Protein wurde es zum Marker-Protein für Caveolae. *CAV-2* wurde durch Mikro-Sequenzieren eines 20-kDa Proteins, das mit caveolären Membranen von Adipozyten

mitisoliert wurde, entdeckt (167). Die weitere Charakterisierung von CAV-2 zeigte, dass dieses Protein mit CAV-1 zusammen in Caveolae vorkommt, mit diesem Hetero-Oligomere bildet, in vielen gleichen Zellen und Geweben ko-exprimiert und für eine korrekte Membran-Lokalisierung von CAV-1 benötigt wird (144; 165). *CAV-3*, auch als M-CAV bezeichnet, wurde auf der Suche nach *CAV-1*-Homologen durch Datenbank-Suche und traditioneller cDNA-Bank-Screening identifiziert (188; 200). Die Expression von *CAV-3* ist muskel-spezifisch und das Protein wird in allen Typen von Muskeln gefunden, also sowohl in glatter als auch quergestreifter Muskulatur (181). Die drei Säuger-Caveoline zeigen deutliche Sequenz-Homologie (Tabelle I-1).

Tabelle I-1: Genomische Organisation der Säuger-*CAV*-Gen-Familie und Eigenschaften ihrer Protein-Produkte. Modifiziert nach: Engelman *et al*. (42)

Gen	Lokalisation		Exons	Exon-Größe (bp)	Introns	Intron-Größe (kp)	AS kodiert durch Exon	Protein-Größe (AS)	% Homologie zum		Expressionsmuster
	Maus	Mensch							humanen Cav-1	humanen Cav-2	
Cav-1	6A2	7q31.1	1	30	1	1,47	1 - 10	178	100 (100)	59 (40)	Ubiquitär; höchste Levels in Adipozyten, Endothel, Epithel, glatte Muskelzellen, Typ I Pneumozyten
			2	165	2	31,80	11 - 65				
			3	342			66 - 178				
Cav-2	6A2	7q31.1	1	150	1	0,33	1 - 50	162	58 (38)	100 (100)	Zusammen mit Cav-1 exprimiert
			2a	188	2	5,76	51 - 112				
			2b	151			113 - 162				
Cav-3	6E1	3p25	1	114	1	?	1 - 38	151	85 (65)	60 (39)	Muskel-spezifisch; vorwiegend in Skelett- und Herz-Myozyten
			2	342			39 - 151				

Abkürzungen: AS, Aminosäuren; bp, Basenpaare; kb, Kilobasen; ?, unbekannt.

Bei Vertebraten ist das Vorkommen dieser Gen-Familie im Menschen, der Kuh, der Maus, *Xenopus* und *Fugu rupripes* bereits nachgewiesen worden. Auch in *Caenorhabditis elegans* wurde eine *CAV*-Gen-Familie gefunden (164; 187), die jedoch phylogenetisch nur wenig mit der der Vertebraten verwandt ist. Diese Daten liefern Hinweise auf die evolutionäre Geschichte der Caveoline. Die Tatsache, dass das *C. elegans CAV-1*-Gen zwei Exons besitzt, die Region aber, die homolog zum Säuger-*CAV-1* ist, nur von einem Exon kodiert wird, lässt vermuten, dass die Mammalier-Caveoline von diesem speziellen Exon abstammen (187). Zudem lassen zwei Beobachtungen aus den humanen genomischen Sequenzen schließen, dass einige Mitglieder dieser Gen-Familie durch Gen-Duplikations-Ereignisse entstanden sind: die Exon-Intron-Übergänge in den letzten Exons von *CAV-1*, *-2* und *-3* besitzen einen analoge Position, und zweitens, ist Exon 2 von *CAV-2* durch ein zusätzliches Intron in Exon 2a und 2b geteilt, während die beiden homologen Teile der *CAV-1*- und *-3*-Sequenz fusioniert sind und ein Exon bilden (43; 44). Dies könnte bedeuten, dass *CAV-2* als genomischer Precursor von *CAV-1* und *-3* diente.

1.5.3 Genomische Organisation der Caveoline

CAV-1 und *CAV-2* haben je 3 Exons, während *CAV-3* nur 2 besitzt. Die murinen Gene liegen zusammen in der A2-Region des Maus-Chromosoms 6 (6A2). Diese chromosomale Region ist synthän mit dem menschlichen *CAV-1* und *CAV-2*. Das humane *CAV-1* und *CAV-2* liegen auf 7q31.1 in enger Nachbarschaft und sind nur etwa 19 kb von einander getrennt (43; 44), während das humane *CAV-3* auf Chromosom 3p25 liegt, das der murinen Region 6E1 entspricht.

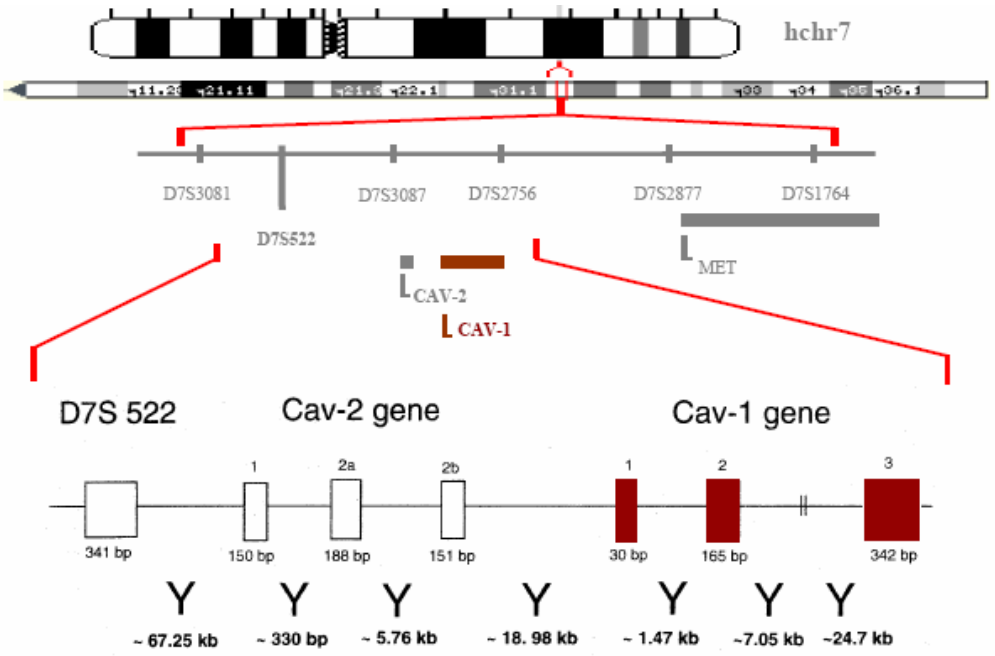


Abb. I-7: Lokalisation des humanen *CAV-1*- und *CAV-2*-Gens am Locus D7S522 (7q31.1). Dargestellt ist eine detaillierte Organisation des humanen *CAV1/2*-Locus im Bezug auf den Marker D7S522. Der Mikrosatelliten-Marker D7S522 liegt ~67 kb upstream von *CAV-2* und *CAV-2* ist ~19 kb upstream von *CAV-1* gelegen. D7S522 liegt im Zentrum kleinsten gemeinsamen deletierten Region, d.h. dass, da *CAV-1* and *CAV-2* <100 kb davon entfernt sind, diese beiden Gene, die am nächsten bis jetzt bekannten Gene dieser häufig deletierten Region sind.

Das *CAV-1*-Gen besitzt einen 924 bp umfassenden Promotor ohne TATA-Box, der einen GC-Gehalt von 40.2% besitzt und 38 CpG-Nukleotide umfasst. Die detaillierte Analyse des *CAV-1*-Promotors zeigte, dass die Transkriptionsstart-Punkte 62 bzw. 106 bp 5´ des ATG-Translationsstarts liegen. An Position -84 (Translationsstart wurde als +1 definiert; die beiden Transkriptionsstart-Punkte als -62 bzw. -106) findet sich eine CAAT-Sequenz. Neben den CpG-Nukleotiden gehören als potentielle regulatorische Sequenzmotive eine G+C-reiche Box mit einer der SP1-Consensus-Sequenz (CCGCCC) ähnlichen Struktur an Position -148 sowie drei Stellen im *CAV-1*-Promotor an den Positionen -646, -395 und -287 upstream des Translationsstarts, die 50-60% Homologie zu einer zehn Basen SRE (sterol regulatory element) des LDL-Rezeptors haben (11).

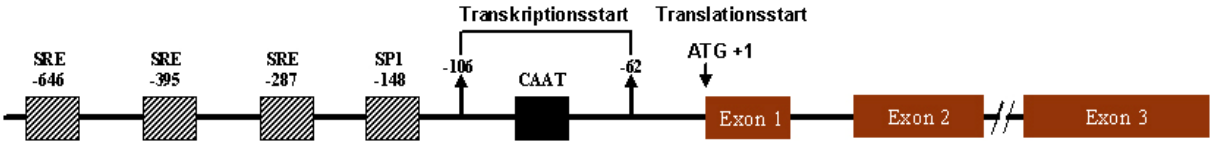


Abb. I-8: Ein Teil des 5´-Promotors sowie Exon 1-3 des humanen *CAV-1*-Gens. Im Promotor befinden sich drei potentielle Sterol Regulatory Elements (SRE), eine CAAT-Box und eine SP1-Konsenus Sequenz. Zwei Transkriptionsstartstellen finden sich an Position -106 und -62 relativ zum Translationsstart 1, der als ATG+1 bezeichnet wird. Modifiziert nach: Bist A *et al.* (11)

1.5.4 Die *CAV*-Gen-Produkte

Bei den Caveolinen handelt es sich mit 18-24 kDa um relativ kleine Membran-Proteine, deren NH_2- und C-terminale Domänen ins Zytosol der Zelle ragen, während sich ein hairpin loop als Membran-Domäne durch die Plasma-Membran zieht (Abbildung I-9).

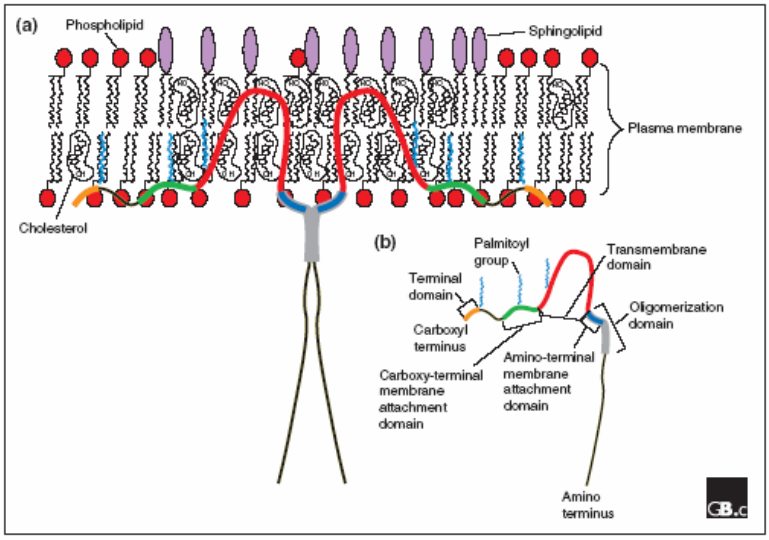


Abb. I-9: Primäre Struktur und Topologie von CAV-1. **(a)** Die mutmaßliche Membran-Topologie von CAV-1. Zwei CAV-1-Monomere bilden vereinfacht dargestellt ein Dimer, aber *in vivo* assoziieren 14-16 Monomere, um ein einzelnes CAV-1-Homo-Oligomer zu bilden. Sowohl die Amino- als auch Carboxy-terminalen Domänen ragen ins Zytosol der Zelle, während ein hairpin loop sich durch die doppelschichtige Plasma-Membran zieht. **(b)** Die Domänen von CAV-1. Die Amino-terminale membrane-attachment domain wird auch als caveolin scaffolding domain (CSD) bezeichnet. Modifiziert nach: Razani *et al*. (153)

Es konnten zwei CAV-1-Protein-Isoformen (α und β) identifiziert werden. Beide Isoformen besitzen einen identischen hydrophoben Abschnitt an AS, die scaffolding Domäne und den acetylierten C-Terminus, während die N-terminalen 31 AS nur in *CAV-1α* zu finden sind. Es wurde gezeigt, dass sie durch alternierende Translationsinitiation gebildet werden (168). Da das Gen eine einzige mRNA kodiert, ist es unwahrscheinlich, dass diese beiden Isoformen aufgrund differentiellen Splicings entstehen (168). Beide Isoformen sind sofort nach der CAV-Synthese präsent, so dass es scheinbar keine Precursor-Produkt-Beziehung gibt. Auch ist die β-Isoform kein Produkt einer Degradation und kein Artefakt, da diese Isoform *in vivo* selektiv phosphoryliert wird (168). Weitere Untersuchungen belegen, dass beide Isoformen aus einer einzigen cDNA entstehen und sich aufgrund post-translationaler Modifikation nur in

ihrem N-Terminus unterscheiden. Dennoch ist über die Entstehung beider Isoformen relativ wenig bekannt. Die gängige Hypothese zur Entstehung war, dass *CAV-1* einer schnellen co- oder post-translationalen proteolytischen Prozessierung durch eine spezifische Amino-peptidase oder einer Endopeptidase unterliegt, was zur β-Isoform führt. Diese Überlegung würde durch eine Vorläufer-Produkt-Beziehung zwischen α und β unterstützt. Diese Möglichkeit ist zwar unwahrscheinlich, da beide *CAV-1*-Isoformen direkt nach der CAV-Synthese präsent sind, kann aber dennoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Alle drei Proteine besitzen fast die gleiche Anzahl AS: die NH_2-terminale Domäne wird beim CAV- 1α von den ersten 101 AS gebildet und bei CAV-1β, CAV-2 und -3 von den ersten 70-86 AS, wobei die putative Transmembran-Domäne aus 33 AS und der Carboxy-Terminus aus 43-44 AS besteht. Die Oligomerisierungsdomäne wird von den AS 61-101 kodiert (Abbildung I-9). CAV-1 bildet Oligomere, die aus 14-16 Monomeren zusammensetzen können, und kann somit Komplexe mit einer Größe von 200-400 kDa erreichen. CAV-2 benötigt für die Bildung dieser hoch-molekularen Komplexe CAV-1 (165). Auch CAV-3 bildet große, oligomere Komplexe von bis zu 400 kDa *in vivo* (188). CAV-3 wird während der Differenzierung der (Skelett-)Myoblasten (der Skelett-Muskeln) induziert und findet sich im Sarcolemma, wo es einen Komplex mit Dystrophin und dessen assoziierten Glyco-proteinen bildet (181).

1.5.5 Die Funktion des CAV-1-Proteins

CAV-1 findet sich in der Plasma-Membran von Caveolae, im Golgi-Apparat und in vom trans-Golgi-Apparat stammenden Transport-Vesikeln. CAV-1 ist nicht nur die Hauptstruktur-Protein-Komponente von Caveolae, sondern es ist auch ein Shuttle-Protein im biosynthetischen Verkehr von Cholesterin zur Plasma-Membran. Außerdem spielt CAV-1 bei der Signal-Transduktion eine entscheidende Rolle, indem es spezifisch mit einer Vielzahl von Signal-Molekülen und deren Bindungspartnern interagiert. In vielen Fällen kommt es durch diese spezifische Interaktion zu einer Inaktivierung dieser Moleküle (z.B. Repression der Kinase-Aktivität). Diese Interaktion wird durch die sog. caveolin-scaffolding domain (CSD) vermittelt, die von den Aminosäuren der Position 82-101 des CAV-1-Proteins gebildet wird (110). Funktionelle CAV-Binde-Motive finden sich sowohl in Tyrosin- als auch in Serin/Threonin-Kinasen (30; 40; 135; 136)**.** In allen untersuchten Fällen befindet sich das CAV-Binde-Motiv innerhalb der katalytischen Domäne des jeweiligen Signal-Moleküls. Zu diesen gehören u.a. Signal-Moleküle wie die MEK-1 (MAP kinase/ERK kinase-1). Es konnte

gezeigt werden, dass das Ausschalten von *CAV-1* zu einer konstitutiven Hyper-Aktivierung der p42/44 MAP-Kaskade führt (55). Durch Bindung an CAV-1 können Mitglieder eines Signal-Transduktionsweges in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden. Auch Aktivierung von Signal-Molekülen ist bekannt. Durch eine selektive Interaktion mit verschiedenen Signal-Molekülen könnte sowohl Cross-Talking zwischen funktionell nicht-verwandten Botenstoffen verhindert, als auch auf der anderen Seite ein direkter Cross-Talk durch das Zusammenführen verwandter Moleküle vermittelt werden.

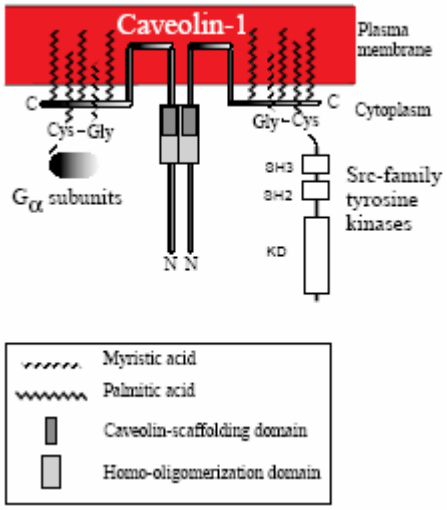


Abb. I-10: Der CAV-1-Signal-Komplex. CAV-1 ist an drei Stellen seiner C-terminalen Domäne palmitoyliert. Gezeigt sind die Oligomerisierungsdomäne (AS 61-101) und die caveolin scaffolding domain (AS 82-101) (CSD). Des Weiteren sind zwei für Caveolae typische Signal-Moleküle (die Lipid-modifizierten Proteine Gα und eine zur Src-Familie gehörende Kinase) gezeigt (Razani B et al. (152)).

1.5.6 *CAV* und Tumoren

Die beiden Gene *CAV-1* und *-2* liegen in der Region von Chromosom 7q31.1. LOH-Analysen (Loss of Heterozygosity) unter Verwendung spezifischer polymorpher $(CA)_n$-Repeat Mikrosatelliten-Marker konnten sehr häufig Deletionen dieser Region und damit eine Beteiligung an der Pathogenese vieler verschiedener Formen von humanen Tumoren aufzeigen (s.o.) (1; 10; 19; 80; 82; 95; 103; 122; 175; 186; 198; 216; 218-220). Bei diesen Untersuchungen stellte sich der Marker D7S522 als der Informativste heraus, da Deletionen in der Region 7q31.1 normalerweise um diesen Locus herum verteilt sind, wodurch sich eine smallest common deleted region (SCDR) von ~1000 kb definiert (Abbildung I-11). Diese Region umfasst neben den *CAV*-Genen die fragile Stelle FRA7G (83).

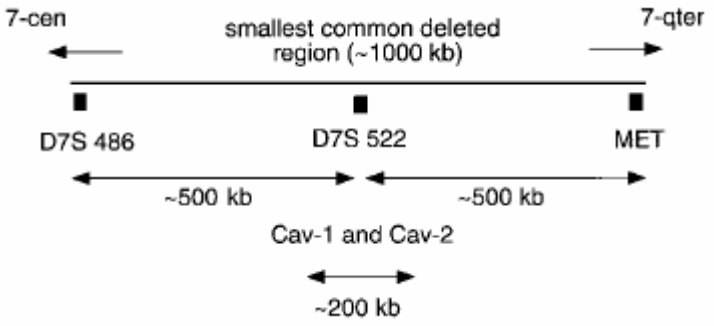


Abb. I-11: Die genomische Anordnung der humanen Gene *CAV-1* und *-2* am D7S522-Locus (7q31.1). Dargestellt ist die Lokalisation der *CAV*-Gene im Bezug auf die smallest common deleted region (~1000 kb), einer bekannten fragilen Stelle, die in humanen Tumoren häufig deletiert ist. Der Marker D7S522 liegt ~500 kb downstream von Marker D7S486 und ~500 kb upstream des MET-Proto-Onkogens. *CAV-1* und *-2* liegen etwa 100 kb upstream bzw. downstream von D7S522, so dass beide Gene im Zentrum dieser smallest common deleted region liegen (aus: Engelman JA *et al.* (43))

Der Verlust dieser kritischen Region wird in einer Vielzahl verschiedener Tumoren beobachtet, einschließlich des Prostata-Karzinoms. Angesichts der Assoziation zwischen 7q31.1 und dem LOH von D7S522 mit der Karzinogenese, ist ein Tumor-Suppressor innerhalb dieser Region von 1 MB anzunehmen, bei dem es sich um *CAV-1* handeln könnte. Die Lokalisierung nahe dieses Locus und die Fähigkeit zur Suppression der Transformation (40; 41; 96; 106) prädisponieren *CAV-1* als dieses TSG auf Chromosom 7. Weitere Hinweise, die für *CAV-1* als TSG sprechen, sind: (i) sowohl der mRNA- als auch der Protein-Spiegel von *CAV-1* ist in transformierten NIH3T3-Zellen durch eine Reihe aktivierter Onkogene (v-Abl, Bcr-Abl, und H-Ras), in transgenen Mäusen und in von Brustkrebs stammenden Zelllinien reduziert oder fehlt ganz, und diesen transformierten Zellen fehlen auch Caveolae (40; 41; 96; 106), (ii) in transformierten NIH3T3-Zellen und in Brustkrebs-Zelllinien kann die rekombinante Expression von *CAV-1* den transformierten Phänotyp dieser Zellen supprimieren (41; 106) und (iii) die gezielte Herunterregulierung der *CAV-1*-Expression mittels eines Anti-Sense-Vektors führt zu Wachstum in Soft-Agar, zur Tumorigenese/Karzinogenese in Nackt-Mäusen und zur Hyperaktivierung der p42/44 MAP-Kinase-Kaskade in NIH3T3-Zellen (55).

Seine besondere Lokalisation in einer häufig in Tumoren deletierten Region, seine molekularbiologischen Eigenschaften und der Verlust der Gen-Expression durch genetische oder epigenetische Ereignisse machen das Gen *CAV-1* auf Chromosom 7q31.1 zu einem Kandidaten-Gen, das für das Prostata-Karzinom relevant sein könnte.

1.6 Zielsetzung

Die molekularen Ereignisse, die zur Entwicklung des Prostata-Karzinoms führen, sind weitestgehend unklar, obwohl einige konsistente chromosomale Veränderungen mit der Progression dieses Karzinoms assoziiert werden konnten. Am Prozess der Tumor-Progression scheint die Inaktivierung einiger Tumor-Suppressor-Gene beteiligt zu sein. Dabei spielen Veränderungen, die Chromosom 7 betreffen, besonders häufig eine Rolle, speziell das Segment 7q31.1, in dem das Gen *CAV-1* liegt. Lokalisation, molekular-biologische Eigenschaften und der Verlust der Gen-Expression durch genetische oder epigenetische Ereignisse machen *CAV-1* zu einem für das Prostata-Karzinom relevanten Kandidaten-Gen.

In einer Assoziationsstudie sollte die Rolle von Polymorphismen des *CAV-1*-Gens für das PCa in verschiedenen Probanden-Gruppen analysiert werden. Die enzymatische Mutationsdetektion und eine Fragment-Analyse mit für diesen Locus spezifischen Mikrosatelliten sollten in den Zelllinien und in Probanden aus einem Kollektiv Ulmer von PCa-Patienten die Frage beantworten, ob genomische Varianten des Gens mit einer erhöhten Suszeptibilität für das PCa einhergehen. Durch Sequenzierung auf genomischer Ebene sollten Mutationen im kodierenden Bereich sowie im Promotor des *CAV-1*-Gens in den zur Verfügung stehenden PCa-Zelllinien sowie in einem Patienten-Kollektiv gesucht werden, für das in der eigenen Arbeitsgruppe Kopplung zu Chromosom 7q31-33 in 24 Patienten aus Familien mit einer aggressiven Form der Krankheit beobachtet war.

Die Relevanz von *CAV-1* aus der Literatur und den eigenen Untersuchungen wurde zum Ausgangspunkt von Untersuchungen zur Expression von *CAV-1* und seinen Isoformen sowie zu dessen Regulation.

Hierfür bot es sich an für grundsätzliche Fragen zur Charakterisierung der Transkription dieses Gens, zu seinen Transkripten und zu seiner Transkriptionsregulation Zelllinien zu verwenden. Zunächst war zu klären, ob *CAV-1* auf RNA und auf Protein-Ebene in verschiedenen Prostata-Karzinom-Zelllinien sowie in Zelllinien, die von normalem, gesundem Prostata-Gewebe stammten, überhaupt exprimiert ist, wozu semiquantitative RT-PCR, Northern und Western Blot-Analysen eingesetzt wurden. Im Anschluss daran sollten die Untersuchungen zur Expression des Gens auf verschiedene Gewebe ausgedehnt werden. Es sollte außerdem versucht werden, die Frage zu klären, ob die *CAV-1*-Isofomen die widersprüchlichen Befunde zur Regulation des Gens in Tumoren erklären können.

Da eine methylierungsabhhängige Repression des Gens nahe lag, sollte der für die Transkriptionsregulation relevante Promotor-Bereich auf seine Aktivität hin analysiert und schließlich

auch auf eine potentielle Interaktion mit spezifischen Methyl-CpG-Proteinen untersucht werden. Die folgenden Schritte wurden geplant:

- Analyse des Methylierungsmusters des *CAV-1*-Promoter-Fragments in den PCa-Zelllinien
- Analyse des Methylierungsprofils des *CAV-1*-Promotors im Vergleich von Tumor- vs. Normal-Gewebe
- Analyse des Einflusses experimenteller Methylierung des *CAV-1*-Promotors auf die Transkription *in vitro*. Dies ist mit einem Reportergen-Assay möglich, in dem verschiedene Promotor-Fragmente auf ihre Aktivität untersucht wurden.

Zur Überprüfung von Alternativen der Promotor-Methylierung mussten die folgenden Fragen zusätzlich geklärt werden:

- Sind an der Inaktivierung des *CAV-1*-Promotors Regulatoren „*in trans*“ beteiligt?
- Kann die *CAV-1*-Expression in LNCaP-Zellen durch 5-Aza-2´-Desoxycytidin und TSA reaktiviert werden?

Die Inaktivierung von Genen durch Methylierung wird in der Regel durch methylierungsabhängige Bindung spezifischer Proteine vermittelt. Um spezifische DNA-Protein-Interaktionen mit der *CAV-1*-Promotor-Region nachzuweisen und um zu bestimmen, ob diese Interaktion von Methylierung abhängig ist, wurden Electrophoretic Mobiltiy Shift Assays durchgeführt. Da sich bei der Verwendung von PC-3- und HeLa nukleärem Extrakt zwar die Spezifität der Bindung nachweisen lässt, dies aber keinen Hinweis auf das bindende Protein liefert, sollte weiter untersucht werden, ob es sich hierbei tatsächlich um den einzig derzeit bekannten Kandidaten für eine derartige Bindungsstelle (Bindung an ein einzelnes CpG) handelt, nämlich um das Methyl-CpG-Bindeprotein MeCP2. Dies kann ebenfalls im EMSA unter Verwendung des *in vitro* synthetisierten Proteins geprüft werden.

Seine Lage auf 7q31.1 in der Nähe einer bekannten Region, die dem Imprinting unterliegt, machte auch *CAV-1* zu einem guten Kandidaten für ein imprintetes Gen, so dass sich folgende Fragen ergaben:

- Ist *CAV-1* ein weiteres Gen mit Imprinting auf 7q3 und
- Unterliegt *CAV-1* in der Maus einem Imprinting?

Die Gesamtheit der hier geplanten Teiluntersuchungen wurde so angelegt, dass aus den Ergebnissen die Rolle von *CAV-1* beim Prostata-Karzinom erkennbar wird und auch die Mechanismen, durch die die Regulation von *CAV-1* modifiziert wird.

2 Probanden, Material und Methoden

2.1 Probanden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit Prostata-Karzinom, gesunde Familienangehörige sowie nicht-verwandte, gesunde Kontrollpersonen untersucht. Alle Personen, die hier beschrieben werden, nehmen am Projekt „Molekulargenetik des Prostata-Karzinoms“ der Universität Ulm teil.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm geprüft und anerkannt. Alle Teilnehmer dieser Studie wurden über die Intention dieser Studie informiert und gaben vollen “informed consent” gemäß der Ethikkommission der Universität Ulm. Nach Einverständniserklärung wurden sie in die Untersuchungsgruppen aufgenommen. Danach wurden die Teilnehmer um eine Blutspende gebeten.

2.1.1 Kontroll-Personen

Um im Sinne einer Fall-Kontroll-Studie den familiären und sporadischen Patienten geeignete Kontrollpersonen gegenüberstellen zu können, wurden aus dem Ulmer Kollektiv 191 gesunde Männer zur Untersuchung ausgewählt. Die Kriterien zur Erfüllung des Kontrollstatus waren dabei 1) kein diagnostiziertes Prostata-Karzinom, 2) eine negative Familienanamnese und 3) ein unbedenklicher Serum-PSA-Spiegel. Die Informationen zum PSA-Spiegel waren jedoch nur für etwa 30% der Kontrollen erhältlich. Bei diesen Kontrollen handelte es sich ausschließlich um Personen aus dem Raum Ulm. Ihr Durchschnittsalter lag bei 58.8 Jahren (Altersspanne, 35-91 Jahre).

2.1.2 Prostata-Karzinom-Familien

Die Rekrutierung von Patienten mit familiärem Prostata-Karzinom erfolgt über die Abteilung Urologie der Universität Ulm durchgeführt, die zu diesem Zweck mit Kliniken und niedergelassenen Urologen aus dem gesamten Bundesgebiet zusammenarbeitet. Die Patienten wurden gebeten, einen Fragebogen zur Erfassung der Familiengeschichte auszufüllen. Mittels dieses Fragebogens konnten dann weitere Betroffene sowie relevante nicht-betroffene Familienangehörige kontaktiert werden.

In dieser Studie wurden 105 nicht verwandte betroffene Patienten mit familiärem Prostata-Karzinom untersucht. Sie hatten ein mittleres Alter von 71 Jahren (Altersspanne, 54-89 Jahre)

und das durchschnittliche Erst-Diagnosealter lag bei 62.3 Jahren, wobei die Bandbreite von 47-80 Jahren reichte.

Eine Untergruppe von 10 Familien, die eine aggressive Form der Krankheit aufwiesen, wurde mittels Sequenzierung auf genetische Veränderungen des *CAV-1*-Gens untersucht. Diese Familien zeigten Kopplung der aggressiven Form der Krankheit (Grad II/III+III-Tumoren) zu Chromosom 7q31-33. Für die Sequenzierung wurden 24 der insgesamt 37 Betroffenen ausgewählt. Dabei war jede der 10 Familien mit mindestens zwei Fällen, mit jeweils mindestens einem GII-III/III-Tumor, in der Mutationsanalyse vertreten. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 73.4 Jahren (Bandbreite, 64-83 Jahre) und ihr Erst-Diagnosealter im Mittel bei 64.1 Jahren (Altersspanne, 51-73 Jahren). Der Serum-PSA-Spiegel betrug im Schnitt 25.66 ng/ml und reichte von 6.2 ng/ml bis 65.6 ng/ml.

2.1.3 Patienten mit sporadischem Prostata-Karzinom

Prostata-Karzinom-Patienten mit negativer Familien-Anamnese werden in der Urologie Ulm als sporadische Fälle registriert. Aus dieser Sammlung wurden im Rahmen einer Assoziationsstudie 190 Probanden untersucht. Das mittlere Alter dieser Fälle war 66.8 Jahre und reichte von 37-86 Jahre. Das durchschnittliche Alter der Erst-Diagnose betrug 63.5 mit einer Bandbreite von 43-79 Jahren.

2.1.4 Klassifizierung der Probanden

Die Angaben zu den einzelnen Probanden wurden elektronisch erfasst und durch klinische Informationen wie das Alter der Patienten bei Erst-Diagnose, die TNM-Klassifizierung (Stadium von Tumor - Noduli - Metastasen), den Gleason Score und den histopathologischen Grad komplettiert. Diese Informationen waren in ca. 95% der Fälle verfügbar und die Patienten konnten dichotomisiert in Gruppen wie frühes oder spätes Erkrankungsalter ($\leq$ 65 oder > 65 Jahre), niedrig- oder hochgradige Tumoren (GI-II oder GII-III/III), und dem pathologischen TNM-Stadium entsprechend Organ-begrenzten (T1/2) oder fortgeschrittenen (T3/4), Beteiligung der lokalen Lymphknoten (N0 oder N1/2), Bildung von Fern-Metastasen (M0 oder M1), sowie Follow Up-Informationen (NED und Progression) gegliedert werden (Tabelle II-1).

Tabelle II-1: Klinische Charakteristika der 295 Fälle

Charakteristika	# sporadische Fälle (n = 190)	# familiäre Fälle (n = 105)
Erst-Diagnose, Jahre		
≤ 65	111	81
> 65	78	24
Fehlend	2	0
T-Stadium		
T1/2	100	60
T3/4	87	45
Tx	3	0
N-Stadium		
N0	165	77
N1/2	19	16
Nx	6	12
M-Stadium		
M0	182	94
M1	1	1
Mx	7	10
Tumor-Grad		
GI-II	134	87
GII-III	52	15
Gx	3	3
Follow Up		
Progression [a]	54	38
NED [b]	122	53
Fehlend	14	14

[a] Bei Progress fließen sowohl PSA- und klinischer Progress als auch Tod infolge eines PCa ein
[b] no evidence of disease
T=Tumor, N=Lymphknoten-Befall, M=Metastase, G=Tumor-Grad

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Standard-Chemikalien und -Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham (Braunschweig), AP Biotech (Freiburg), Applied Biosystems (Foster City USA), AppliChem (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu Ulm), Gibco BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt), O. Kindler (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Seromed (München), Sigma Aldrich (München).

2.2.2 Radiochemikalien

Alle radioaktiven Chemikalien wurden von Amersham, Braunschweig bezogen. Verwendet wurden im Rahmen dieser Arbeit die ^{32}P-Nukleotide [α-^{32}P]-CTP und [γ-^{32}P]-ATP, sowie die ^{35}S-markierte AS ^{35}S-Methionin. Die spezifische Aktivität der ^{32}P-Nukleotide betrug

800 Ci/mmol, wobei die Konzentration bei 20 µCi/µl lag. Die ^{35}S-markierte AS hatte eine spezifische Aktivität von > 1000 Ci/mmol und eine Konzentration von 10 µCi/µl.

Des Weiteren wurde für die Western Blot-Versuche der [^{14}C] methylated protein molecular weight marker Rainbow^{TM} verwendet, dessen Aktivität 10-100 µCi/mg Protein betrug und der eine Konzentration von 0.004 µCi/µl hatte. Der Marker ist eine Mixtur aus individuell gefärbten und gereinigten Proteinen, wobei jedes ^{14}C-markiert ist. Der Rainbow^{TM}-Marker enthält Myosin (200 kDa; blau), Phosphorylase B (97,4 kDa; braun), BSA (66 kDa; rot), Ovalbumin (46 kDa; gelb), Carboanhydrase (30 kDa; orange), Trypsin-Inhibitor (21.5 kDa; blau) und Lysozym (14,3 kDa; magenta).

Für die EMSA-Experimente wurde die BENCHMARK™ Prestained Protein Ladder (GibcoBRL) verwendet, die aus 10 radioaktiv markierten Proteinen besteht, die ein Molekulargewicht zwischen 10 und 200 kDa aufweisen. Die vierte Proteinbande (62.13 kDa) erscheint auf dem SDS-Gel pink.

2.2.3 Enzyme und DNA-/RNA-Längenstandards

2.2.3.1 Enzyme

Calf Intestine Phosphatase (CIP)	USB, Cleveland USA
DNA-Polymerase *Taq*	AP Biotech, Freiburg
DNase I	QIAGEN, Hilden
DNase RQ1	QIAGEN, Hilden
Exonuclease I	USB, Cleveland USA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	USB, Cleveland USA
*Sss*I Methylase (CpG Methylase)	NEB, Frankfurt
Proteinase K	Sigma Aldrich, München
T4-DNA-LIGASE	Gibco BRL, Neu-Isenburg
Diverse Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt

2.2.3.2 Längenstandards

ΦX174 DNA/*Hae* III Marker	Promega, Madison USA
Lambda/*Hind* III	Promega, Madison USA
100 bp DNA Ladder	Stratagene, Amsterdam NL
1 kb DNA Ladder	Stratagene, Amsterdam NL
50 – 500 bp Ladder (Cy-5 markiert)	AP Biotech, Freiburg
RNA Ladder 0.16 – 1.77 kb	Gibco BRL, Neu-Isenburg
RNA Ladder 0.24 – 9.5 kb	Gibco BRL, Neu-Isenburg

2.2.4 Bakterien, Vektoren und Antikörper

2.2.4.1 Bakterienstämme

Escherichia coli K12 TOP10 („One Shot“)	Invitrogen, Groningen NL
Epicurian *E.coli* XL1-Blue Supercompetent Cells	Invitrogen, Groningen NL
Escherichia coli K12 ER1647 Competent Cells	NEB, Frankfurt

2.2.4.2 Vektoren

pCDNA®3.1/V5/His-TOPO	Promega, Madison USA
pCR®II-TOPO	Invitrogen, Groningen NL
pGL3-Enhancer	Promega, Madison USA
pGL3-Control	Promega, Madison USA
pUC18	AP Biotech, Freiburg
pCMV-β-control (β-GAL-Vektor)	Promega, Madison USA

2.2.4.3 Antikörper

C37120 (α-Isoform; 1:2000)	Transduction Lab
C43420 (β-Isoform; 1:2000)	Transduction Lab
Goat anti-rabbit HRP (1:10000)	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA
MeCP2 (C-17): *sc-5758*	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA

2.2.5 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Thermo Hybaid (Neu Ulm) bzw. Biomers.net GmbH (Ulm) bezogen und wurden standardmäßig mit einer Konzentration von 10 pmol eingesetzt. Lediglich Sequenzier- und SNaPShot-Primer wurden mit einer Konzentration von 1 pmol verwendet.

Tabelle II-2: Primer zur Untersuchung von Einzelbasen-Polymorphismen mittels „SNaPShot“

SNP	Region	PCR- und *Extension*sprimer			ddNTP^{LABEL}	
		Sequenz	Annealing	Orient.	Allel 1	Allel 2
rs1543293:+13431*	Intron **2**	5´-GAGAAATGCCTATGGAATATGGCAAATCG-3´ 5´-CAATCCCGGATATGACTTTATCAGCAGC-3´ *5´-ttttttttttTCGTTCATTAGATTTCACCA-3´*	52°C	rückwärts	C^{TAMRA}	G^{R110}
rs3815412:+25576*	Intron **2**	5´-TCAGGTCAGTGACTGCAGGTCCCCTCCA-3´ 5´-GATAAATGAGTGGAGCTACTTTTTGAGC-3 *5´-ttttttttttttttCACACACAACATTTATTCCAC-3´*	52°C	rückwärts	C^{TAMRA}	T^{ROX}
rs1022436:+28113*	Intron **2**	5´-ATCCAGTAGAATCACAATTTCCAATAACAGTCTA-3´ 5´-CAATCCCGGATATGACTTTATCAGCAGC-3´ *5´-ttttttttttttttttttttGATTTTGAAACCCAGAAAAGATT-3`*	52°C	rückwärts	C^{TAMRA}	G^{R110}
rs3757732:+28588*	Intron **2**	5´-GTAGTATCATAAGCCAATGCTGCACAAAGGTA-3´ 5´-CAATCCCGGATATGACTTTATCAGCAGC-3´ *3´-ttttttttttttttttTGGGCATTGAGTTTTAAAGCC-5´*	53°C	rückwärts	C^{TAMRA}	A^{R6G}

Kursiv markierte Primer sind SNaPShot-Primer
t-Überhänge dienten Unterscheidung der Produkte anhand ihrer Länge
* Lokalisation relativ zum ersten Nukleotid des Transkriptionsstarts (nt Position +1): National Center for Biotechnology Information dbSNP identification number

Tabelle II-3: PCR-Primer zum Sequenzieren für Mutationsdetektion und LOH-Primer für Fragment-Analyse

CAV-1	Sequenz	Annealing	Länge (bp)
Promotor 1	5´-AAGCTTTAAATAATTCTACA-3´ 3´-AGATGCCCAGTATGGCGAACCAAG-5´	53°C	492
Promotor 2	5´-CGGCTTAGGACAGGGCAGGATTGTGGA-3´ 3´-GCTGGCCCGTGGCTGGATGAAAAC-5´	56°C	484
Exon 1	5´-GTGCCTAGACCCGGCGCAGCACACGTC-3´ 3´-CACGCCCGAGCCGGCGCCCC-5´	53°C	383
Exon 2	5´-TGGTGTCCTCTGCGAGATCCTCTTA-3´ 3´-GTGCGTACACGGCAATGCTAAAGAAGGATG-5´	53°C	301
Exon 3	5´-CTTCTATTCTGTGCTCATGTTG-3´ 3´-GAACTTGAAATTGGCACCAGG-5´	54°C	454

Die entsprechenden Primer, die bei der EMD und Fragment-Analyse zum Einsatz kamen, waren Cy5 markiert

Tabelle II-4: Weitere für verschiedene Untersuchungen verwendete Primer

Gen	Bezeichnung	Primersequenz (5`→ 3`)	Prod.-Größe (bp)	Zweck/Methode
hGAPDH	GAPDH/H GAPDH/R	F: AGG GTG GTG GAC CTC ATG GC R: GTA CAT GAC AAG TGT CGG CTC	195 bp	Northern, RT-PCR
CAV- **Promoter**	caveolin1 BS-F caveolin1 BS-R	F: TGT GTA TTT TGt AAA ATA TGG tTA Att TG* R: CCA TCT CTa CCT TAA AAC ACA T*	356 bp	Bisulfit-PCR
CAV-1α	cDNAa1 cDNAb	F: TCA GTT CCC TTA AAG CAC AG R: TCA GGT ATA CTT CTA TCC TT	627 bp	cDNA-Synthese
CAV-1β	5´UTR2Start cDNAb	F: TTT CTG TGC ACG GAG CCG TAG R: TCA GGT ATA CTT CTA TCC TT	703 bp	cDNA-Synthese
CAV-1	Cav1 UTRh Cav1 UTRr	F: GAC ATT TCA AGG ATA GAA G R: TCA GAG TCT GAA ACA CGC ATG GAA	670 bp	3´UTR
CAV-1	cDNA Ex2 H cDNA Ex3 R	F: CAA CAA GGC CAT GGC AGA CGA GCT R: CAT GGT ACA ACT GCC CAG ATG	317 bp	Lightcyler
Maus cav1α*	Cav1aMouse-H Cav1aMouse-R	F: ACAAGATCTTCCTTCCTAG R: GATGTCCCTCGGAGTCCACG	117 bp	Northern
Maus cav1β*	Cav1ßMouse-H Cav1ßMouse-R	F: TAGCAAAAGTTGTAGCGCCAG R: GTAGAGATGTCCCTGTGAGG	140 bp	Northern
β-Actin	βactinh βactinr	F: TCA CCA ACT GGG ACG ACA TG R: TCA TGA GGT AGT CAG TCA GGT	328 bp	Lightcycler

* Primer zur Amplifikation des Maus-Gens

Anmerkung: Die kleingeschriebenen Basen wurden von C nach t (Hin-Primer) oder von G zu a (Revers-Primer) verändert entsprechend den Veränderungen, die aus der Bisulfit-Konversion von nicht methylierten Cytosinen resultieren.

Tabelle II-5: Primer zur Sequenzierung von Plasmiden

Name	Sequenz	Plasmid	Annealing
M13 uni **M13 rev**	5´-GGTAACGCCAGGGTTTTCC-3´ 5´-GAAACAGCTATGACCATG-3´	pUC18, pCRII-TOPO, pCDNA®3.1/V5/His-TOPO	58°C
PP1 **PP2**	5´-CTGTCCCCAGTGCAAGTGCA-3´ 5´-GTCTTCCATGGTGGCTTTAC-3´	pGL3-Enhancer pGL3-Control	62°C

2.2.6 Reagenziensysteme (Kits)

"Kits" sind vom jeweiligen Hersteller speziell entwickelte Kombinationen von Reagenzien und Hilfsmitteln, die es dem Anwender ermöglichen sollen, komplexe Fragestellungen und Bearbeitungsschritte zu vereinfachen und v.a. erheblich zu beschleunigen. Der Vorteil dieser Produkte liegt in ihrer einfachen Handhabung, ihrer hohen Reproduzierbarkeit und der immensen Zeitersparnis. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Kits, mit einer kurzen Darstellung ihres Anwendungsbereiches, aufgeführt. Da allen Kits ausführliche Produktbeschreibungen und Arbeitsanleitungen beiliegen, soll hier auf eine methodische Beschreibung verzichtet werden.

Folgende Kits wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, gemäß den Herstellerangaben verwendet:

Kit-Name	Verwendung	Firma
ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3.1	Sequenzierung auf ABI3100	Applied Biosystems, Foster City, USA
β-Galactosidase Enzyme Assay System™	Nachweis *β-GAL*-Aktivität	Promega, Heidelberg
DC™ Protein Assay	Protein-Bestimmung nach Lowry	Biorad, München
Blood and Cell Culture DNA Mini Kit	DNA-Isolation aus Cryoschnitten	Qiagen, Hilden
EFFECTENE™ TRANSFECTION KIT	Transfektion von Eukaryonten-Zellen	Qiagen, Hilden
ExpressHyb™ Hybridization Solution	Northern Hybridisierung	Clontech, Palo Alto, USA
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Pharmacia Biotech, Freiburg
GFX™ *MICRO* PLASMID PREP KIT	Plasmid-Mini-Präparation	Pharmacia Biotech, Freiburg
GeneJammer	Transfektion von Eukaryonten-Zellen	Stratagene, Amsterdam, NL
Human Multiple Tissue $H_{(2)}$ Northern (MTN) Blot	*CAV-1*-Expression beim Mensch	Clontech, Palo Alto, USA
Luciferase Reporter Gene Assay, constant light	Kontrolle der Transfektionseffizienz	Boehringer, Mannheim
Mouse Embryo Multiple Tissue Northern (MTN) Blot	*cav-1*-Expression in der Maus	Clontech, Palo Alto, USA
Passport™ Mutation Scanning Kit	Enzymatische Mutationsdetektion	AP Biotech, Freiburg
PICOPURE™ RNA ISOLATION KIT	RNA-Isolierung aus Cryogewebe	Arcturus, Mountain View, USA
Plasmid Purification Kit (Midi/Maxi)	Plasmid-Isolierung aus Bakterien	Qiagen, Hilden
QIAfilter™ Plasmid Midi Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen, Hilden
QIAquick™ PCR Purification Kit	PCR-Aufreinigung	Qiagen, Hilden
Rediprime™ II random prime Labeling Systems	Sonden für Northern Blot	AP Biotech, Freiburg
TNT™ T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	*In vitro*-Transkription und -Translation	Promega, Heidelberg
RNeasy total RNA Kit	RNA-Extraktion aus Zellen	Qiagen, Hilden
SNaPShot™ ddNTP Primer Extension Kit	SNP-Screening	Applied Biosystems, Foster City, USA
Superscript™ Preamplification Kit	cDNA-Synthese	Invitrogen, Groningen, NL
SureClone™ Ligation Kit	Ligation von Insert und Vektor	AP Biotech, Freiburg
Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung auf ALFexpress	AP Biotech, Freiburg
TOPO TA™ Cloning Kit	Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen, Groningen, NL
Western Blot Detektionssystem (ECL)	Antikörpernachweis im Western Blot	AP Biotech, Freiburg

2.2.7 Geräte und Software

Neben Geräten, die zur Grundausstattung eines molekular-genetischen Labors gehören, wurden eingesetzt:

2.2.7.1 Thermocycler

GeneAmp PCR System 9600	Perkin & Elmer, Wellesley USA
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
PTC-100TM Thermal Controler	MJ Research, Watertown USA
T-Gradient	Biometra, Göttingen

2.2.7.2 Geigerzähler und Szintillatoren

Multi Crystal Gamma Counter LB 2101	Berthold, Hannover
Liquid Scintillation and Luminescence Counter	MicroBeta, Freiburg
PhosphoImager, PhosphoScreens	Molecular Dynamics
Software: Scanner Control™	Molecular Dynamics
DynaQuant™	Molecular Dynamics

2.2.7.3 Sequenz- und Fragment-Analyse

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City USA
ALFexpress	AP Biotech, Freiburg
Fragment Manager 1.0	AP Biotech, Freiburg
GCG Wisconsin Package 10.0	Accelrys, San Diego USA
GeneScan Software 3.7	Applied Biosystems, Foster City USA
SeqScape 2.0	Applied Biosystems, Foster City USA
Sequence Analyzer 1.0	AP Biotech, Freiburg

2.2.7.4 Statistik-Software

EH v1.14[1]	Xie und Ott, 1993
Microsoft® Office XP (Excel)	Microsoft, Redmont USA
Statview v 5.0.1	SAS Institute Inc., Madison USA
DeFinetti	Thomas Wienker, Bonn

2.2.8 Zelllinien

Die für diese Untersuchungen verwendeten Zelllinien sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle II-6: Verwendete Zelllinien, deren Ursprung, morphologische Charakteristika und Bezugsquelle

Bezeichnung	Ursprung	Morphologie	Bezugsquelle (Nummer)
DU-145	Human; Karzinom; Prostata; Hirn-Metastase	Epithelial	ATCC* (HTB-81)
PC-3	Human; Adenomakarzinom; Prostata; Knochen-Metastase	Epithelial	ATCC (CRL-1435)
LNCaP-CH	Human; Karzinom; Prostata; linker supraclavicularer Lymph-Knoten	Epithelial	Prof. G. Thalmann, Universität Bern, Schweiz
LNCaP-Gött	Human; Karzinom; Prostata; linker supraclavicularer Lymph-Knoten	Epithelial	Dr. P. Thelen, Experimentelle Urologie; Göttingen
LNCaP.FGC	Human; Karzinom; Prostata; linker supraclavicularer Lymph-Knoten	Epithelial	ATCC (CRL-1740)
PNT1A	Human; post-pubertäre normale Prostata; immortalisiert mit SV40	Epithelial	ECACC** (195012614)
PNT1B	Abstammend aus der Linie PNT1A	Epithelial	Valérie Ronflé, Institut Universitaire de France
PNT2	Human; normale Prostata; immortalisiert mit SV40	Epithelial	ECACC (195012613)
FIB	Humane Fibroblasten; Hautstanze	epithelial	neu etabliert; Jürgen Häusler

* ATCC = American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
** ECACC = European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, UK

Die drei Prostata-Karzinom-Zelllinien LNCaP, PC-3 und DU-145 sowie die von normalem prostatischem Gewebe stammenden Linien PNT1A, PNT1B, PNT2 und die diploiden Fibroblasten wurden in unterschiedlichen Experimenten verwendet. Bei den Karzinom-Zelllinien handelt sich um epitheliale Zellen aus Metastasen eines supraclavicularen Lymphknotens (LNCaP), des Skeletts (PC-3) oder des Gehirns (DU-145), die aus Patienten mit einem Prostata-Karzinom isoliert wurden. LNCaP Zellen stellen die bislang einzige etablierte humane Androgen-abhängige Prostata-Karzinom-Zelllinie dar. Alle Zelllinien wurden in DMEM-Medium, das mit 10% Kälberserum (FCS, ICN) supplementiert wurde, bei 10% CO_2-Gehalt und 37°C kultiviert, mit Ausnahme der LNCaP-Zellen, die in α-Medium gehalten wurden.

2.2.9 DNA- und RNA-Quellen

2.2.9.1 Patientenproben

Als Grundlage für Mutations- und Assoziationsanalysen diente DNA aus peripherem Blut der oben beschriebenen Probanden. Diese wurde nach herkömmlichen Protokollen isoliert.

2.2.9.2 Weitere Quellen

Für weitere Untersuchungen wurde DNA und RNA aus Zelllinien, nach Erreichen von etwa 60-80% optischer Konfluenz, nach Standardverfahren isoliert. Auch prostatisches Cryo-

material von Patienten, die in der Abteilung Pathologie beurteilt wurden, und tiefgefrorene Zellen von Patienten der Abteilung Humangenetik dienten als DNA-/RNA-Quellen für die verschiedensten Experimente, wobei nach etablierten Methoden isoliert wurde.

2.3 Experimentelle Methoden

Gängige molekularbiologische Methoden wie DNA- (RNA)-Isolation, Aufreinigung, Fällung, Restriktion, Färbung und elektrophoretische Auftrennung sowie PCR wurden, da es sich um Standardmethoden handelt, nach etablierten Vorschriften durchgeführt („Current Protocols in Human Genetics“ und der „Current Protocols in Molecular Biology“ (7; 36) und werden im Folgenden nicht näher erklärt, sondern nur kursorisch erwähnt und zwar unabhängig von der konsequenten Abfolge der Experimente und damit auch vom Ergebnisteil. Auf eine explizite Erklärung biochemischer Standardmethoden wird ebenfalls verzichtet. Lediglich bei Modifikation oder Besonderheiten wird im Text darauf eingegangen. Neu oder eigens etablierte Methoden oder Techniken, die für das Arbeitsziel relevant erscheinen, werden ausführlicher dargestellt.

2.3.1 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die Amplifikation der aus peripheren Lymphozyten oder Zellkultur extrahierten, genomischen DNA mittels PCR erfolgte in einem Volumen von 25 µl, das 50 ng DNA, 5 pmol eines jeden Primers, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl und 1.5 Units *Taq* DNA-Polymerase enthielt. Die Amplifikation wurde auf konventionelle Weise durchgeführt; einer 5 min initialen Denaturierung folgten 35 Zyklen á 30 s Denaturierung, 30 s Annealing und 30 s Extension. Der finale Extensionsschritt bei 72°C dauerte 10 min. Die Annealing-Temperatur wurde für jedes Primer-Paar individuell optimiert.

2.3.2 Klonierung von PCR-Produkten

Im Rahmen dieser Arbeit war es nötig, verschiedene DNA-Fragmente zu klonieren und Expressionsvektoren herzustellen. Diese Klonierungen wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning®-Systems durchgeführt, mit dem es möglich ist, *Taq*-Polymerase-amplifizierte PCR-Produkte in einen linearisierten, 3´-T-Überhänge tragenden Plasmid-Vektor (pCRII-TOPO oder pCR2.1-TOPO) bzw. Expressionsvektor (pcDNA3.1-TOPO) zu inserieren. Die Ligation wird durch die am Vektor kovalent gebundene *Topoisomerase* I vermittelt (176; 177).

Für die anschließende Transformation wurden chemokompetente *E.coli* „One Shot"-Zellen verwendet und die Transformation entsprechend Herstellerempfehlungen vorgenommen. Die Selektion positiver Klone erfolgte durch die entsprechende Antibiotikumsresistenz und gegebenenfalls durch „Blau-Weiss"-Selektion, die möglich ist, da sich die Multiklonierungsstelle z.B. des pCRII-TOPO-Vektors innerhalb des *LacZ*-Gens befindet, dessen ORF durch erfolgreiche Insertion zerstört wird. Insert-positive Klone sind nicht in der Lage, den Indikator X-Gal umzusetzen und sind daher als weiße Kolonien von blauen, Insert-negativen zu unterscheiden.

2.3.3 Enzymatische Mutationsdetektion (EMD)

Die enzymatische Mutationsdetektion (EMD) ist eine effiziente Technologie zur schnellen Detektion von Mutationen und Polymorphismen, kleineren Deletionen und Insertionen. Die Methode nutzt PCR-Produkte und basiert auf dem Einsatz von „*Resolvasen*" der Bakteriophagen, wie der *T4 Endonuclease* VII, die DNA-Mismatches erkennen. Diese ungepaarten Bereiche, deren Ursachen Fehlpaarung oder eine Deletion/Insertion sind, werden von diesen Enzymen in unmittelbarer Nähe (innerhalb von 6 bp vom 3´-Ende) geschnitten. Die so entstandenen Fragmente werden elektrophoretisch getrennt und ausgewertet. Auf diese Weise wird nicht nur eine Mutation durch das Auftreten eines Fragments detektiert, sondern auch seine Größe dessen ungefähre Lokalisation. Abbildung II-1 gibt einen Überblick über die Technologie des „Passport™ Mutation Scanning" Systems.

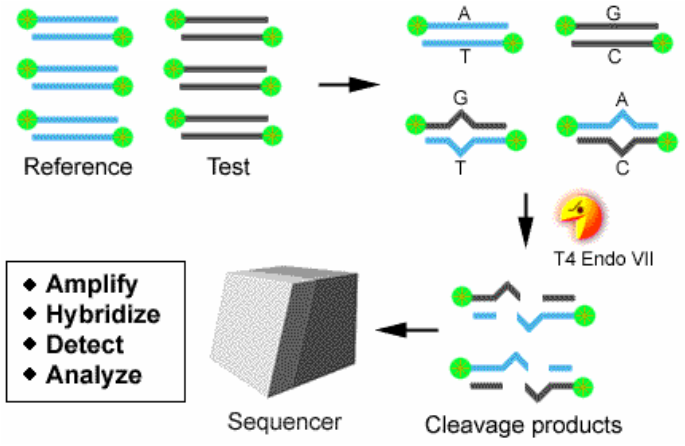


Abb. II-1: Prinzip der enzymatischen Mutationsdetektion. Referenz und zu untersuchendes PCR-Produkt werden gemischt und denaturiert. Nach dem Re-Annealing bilden sich Heteroduplices, die von der T4 Endonulease VII erkannt und geschnitten werden. Die Cy-5-markierten Produkte werden automatisiert und laserbasiert auf einem ALF-Express detektiert.

Diese Methode wurde verwendet, um im kodierenden Bereich des *CAV-1*-Gens bei Prostata-Karzionom-Patienten nach Mutationen zu suchen.

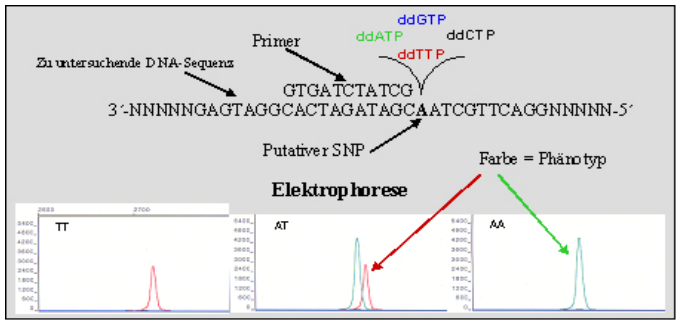
2.3.4 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Absicherung der aus dem EMD erhaltenen Daten erfolgte mittels Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (160). Dazu wurden die aufgereinigten PCR-Produkte des *CAV-1*-Promotors und der drei Exons nach Herstellerangaben mit dem Applied Biosystems PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v3. für beide Richtungen mit dem jeweiligen Hin- oder Rück-Primer sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem automatischen Sequenziergerät (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Mit dem zugehörigen Software-Paket (ABI PRISM Sequence Analysis) war es möglich, die erhaltenen Sequenzen durch Abgleich mit der Referenz-Sequenz (accession no.: NT_07933) nach Mutationen zu suchen.

Für das Mutationsscreening in den drei Exons des *CAV-1*-Gens wurden die in Tabelle II-3 aufgelisteten Primer-Paare verwendet. Dabei wurden für die Mutationssuche mittels EMD Cy-5-markierte Primer verwendet, während für die ABI PRISM-Sequenzierung unmarkierte Primer (Tabelle II-4) verwendet werden konnten.

2.3.5 Genotypisierung von *CAV-1*-SNPs

Die Genotypisierung von SNPs, die aus der NCBI SNP-Databank[1] stammten, erfolgte unter Verwendung der SNaPShot ddNTP primer extension-Methode. Die Basis dieser Methode bildet die Verlängerung eines Primers, der unmittelbar 5´ der polymorphen Stelle bindet, um genau das polymorphe Nukleotid spezifisch zu verlängern, indem das entsprechende fluoreszenz-markierte ddNTP an dessen 3´-Ende angehängt wird. Ein Mehrfarben-Sequenzier-System (PRISM 3100 Genetic Analyzer, Perkin Elmer) übernimmt die Identifikation des eingebauten Nukleotids.



Ausgangsbasis dieses Experiments ist die jeweilige Amplifikation der den Polymorphismus flankierenden Region. Zunächst wurde das PCR-Produkt enzymatisch aufgereinigt, wobei nicht-inkorporierte PCR-Primer durch eine Exonuklease (*Exo*I) abgebaut und dNTPs mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (*SAP*) dephosphoryliert, sodass diese in der folgenden Primer-Extension nicht zu einer unerwünschten Strang-Polymerisation beitragen konnten.

[1] NCBI HumanSNPdb http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/CMD=search&db=snp/

Zum Zwecke der Genotypisierung von vier intronischen Einzelbasen-Polymorphismen des *CAV-1*-Gens wurden 5 µl SNaPShot Reaktionsmix, der eine AmpliTaq DNA-Polymerase, vier fluoreszenz-markierte ddTNPs und Reaktionspuffer enthält, mit 1 µl aufgereinigtem PCR-Produkt, in 10 µl Reaktionsansatz gemischt. Bei allen zu untersuchenden Personen wurden die vier Polymorphismen (rs1543293, rs3815412, rs1022436, rs3757732) in zwei multiplex-SNaPShot-Reaktionen analysiert. Aus technischen Gründen wurden alle SNPs mit Extensionsprimern (Tabelle II-2) analysiert, die an den komplementären Strang binden. Die Signalzuordnung der jeweiligen SNP-Primer-Kombinationen (rs1543293 + rs3815412 bzw. rs1022436 + rs3757732) des *CAV-1*-Gens in einem multiplex-Ansatz war möglich, da die jeweiligen Extensionsprimer mittels einer oligo-T-Verlängerung in unterschiedlicher Länge gewählt wurden. Um nach der Primer-Extension, die nach vorgegebenen Standard-Bedingungen des Herstellers erfolgte, nicht-inkorporierte ddNTPs zu dephosphorylieren, wurde jeder Ansatz mit *Calf Intestine alkaline Phosphatase* (*CIP*) behandelt. Die Trennung und Detektion der Produkte erfolgte schließlich mittels ABI 3100. Mit Hilfe der Software GeneScan wurden die Probenläufe, dargestellt als Fluorogramme, ausgewertet.

2.3.6 Northern Blot

Der Northern Blot wurde benutzt, um Informationen über das Expressionsmuster des Gens *CAV-1* zu erhalten. Für den Nachweis gewebe-spezfischer Expression wurde der Human MTN Blot H (Clontech) verwendet, der polyA-RNAs aus folgenden Geweben enthält: Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelett-Muskel, Niere und Pankreas. Die Gewebe werden durch den Human MTN Blot H_2 durch Milz, Thymus, Prostata, Testis, Ovarien, Dünndarm, Kolon und periphere Blut Leukozyten ergänzt. Für die murinen Expressionsuntersuchungen kam der Mouse Embryo MTN Blot (Clontech) zum Einsatz, der RNA von 7, 11, 15 und 17 Tage alten Maus-Embryonen enthält. Des Weiteren sollte das Expressionsmuster des *CAV-1*-Gens in den drei Prostata-Karzinom-Zelllinien LNCaP, PC-3 und DU-145, den von normalem gesunden Prostata-Gewebe stammenden Zelllinien PNT1A, PNT1B, PNT2 und normalen, diploiden Fibroblasten charakterisiert werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Zellen in einem denaturierenden Agarose-Gel der Größe nach fraktioniert und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wird mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert, die komplementär zur gesuchten RNA ist und an diese binden kann. Nach Entfernung ungebundener Sonden-DNA können die radioaktiven Signale der gebundenen Sonde detektiert und quantifiziert werden.

2.3.6.1 Generierung von cDNA Sonden

Es wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Sonden aus der cDNA des humanen *CAV-1*-Gens zur Transkript- und Expressionscharakterisierung eingesetzt. Die Sonde, die den gesamten 537 bp großen offenen Leserahmen abdeckte, wurde, ausgehend von cDNA, mit dem Primer-Paar cDNAa + cDNAb amplifiziert. Die Sonde *CAV-1α*, die aus einer RT-PCR-Amplifikation mit den Primern *CAV-1*cDNAa1 und *CAV-1*inEx1r entstand, umfasste 94 bp und detektierte nur die *CAV-1α*-Isoform. Die Sonde *CAV-1β* wurde mit den Primern 5´UTR-2Start und 5´UTR2r zur Detektion der humanen *CAV-1β*-Isoform generiert und umfasste 150 bp. Die Kontroll-Hybridisierung erfolgte mit einer humanen *β-actin* cDNA-Sonde.

Für das murine *cav-1*-Gen wurden zur Detektion der α-Isoform die 117 bp große Sonde cav-1α-Maus mit den Primern cav-1α-Maus H und R an cDNA bzw. für die β-Form die Sonde cav-1β-Maus (140 bp) mit den Primern cav-1β-Maus H und R an cDNA synthetisiert, zur Kontrolle sequenziert und mit der Datenbank-Sequenz verglichen[2].

2.3.6.2 Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

Die jeweilige Sonde für den Nachweis der Expression von *CAV-1*-Transkripten wurde mittels PCR mit den entsprechenden Primern unter optimierten Bedingungen aus cDNA hergestellt. Das Zusammenführen mehrerer gleicher PCR-Ansätze gewährleistete ausreichende Mengen an Sonden-DNA. Der gesamte PCR-Ansatz wurde in einem 0.8%-igem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, das Produkt mit dem GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert und dabei aufgereinigt.

Die Markierung der DNA-Sonde erfolgte nach dem Prinzip des „random prime labelings“ (47) mit dem Rediprime II random prime Labeling System (Amersham) nach Anleitung. Hexanukleotide zufälliger Sequenz lagern sich dabei an die denaturierten DNA-Stränge und dienen als Primer für die T7-DNA-Polymerase, die das radioaktive Nukleotid α-^{32}P-dCTP bei der Neusynthese in die DNA-Stränge inkorporiert. Vorteil dieser Methode ist, dass geringe DNA-Mengen sowie kurze Sequenzen effektiv markiert werden können. Es wurden jeweils 80-100ng Sonden-DNA zur Markierung eingesetzt und anschließend nicht-inkorporierte Nukleotide mit Hilfe einer äquilibrierten Sephadex G-50-Säule abgetrennt. Die Messung der Aktivität des Eluats erfolgte im Scintillations-Zähler.

[2] NCBI Blast http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/

2.3.6.3 Hybridisierung und Waschen

Zum Hybridisieren wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre gegeben und in „ExpressHyb™ Hybridization Solution“ (Clontech) 30 min bei 68°C prä-hybridisiert. Dem Wechseln der Prä-Hybridisierungslösung folgte die Zugabe der Hybridisierungslösung mit markierter und denaturierter Sonde. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 68°C für 60 min. Nach mehrmaligem Waschen mit immer stringenteren Waschlösungen bei 50°C wurde die Aktivität der gebundenen Sonde überprüft und über Nacht auf einem Röntgenfilm oder für 2-6 h im PhosphoImager visualisiert.

2.3.7 Western Blot

Um semiquantitative Aussagen über den Gehalt der Zellen an CAV-1-Protein in verschiedenen Zelllinien machen zu können, war der Western Blot die Methode der Wahl. Das aus den jeweiligen Zelllinien gewonnene Protein-Lysat wurde in einer vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach *Laemmli* (99) unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch der Größe nach fraktioniert. Das SDS, ein anionisches Detergens, zerstört dabei nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. β-Mercaptoethanol oder Dithiotreitol (DTT) reduzieren Disulfid-Brücken. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die im Gel enthaltenen Proteine auf eine immobilisierende Membran übertragen (geblottet). Spezifische Antikörper binden an das zu untersuchende Membran-gebundenen Protein und können zum indirekten Nachweis verwendet werden.

2.3.7.1 Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE

Bei den einzelnen Experimenten wurden jeweils gleiche Mengen an Protein-Lysat (~35µg), das zuvor nach Standardverfahren aus kultivierten Zellen extrahiert und dessen Protein-Konzentration mit dem BIORAD-DC-Protein-Assay bestimmt wurde, eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE. Die elektrophoretische Fraktionierung erfolgte bei 4°C für ca. 3 Stunden. Als Größenstandard wurde eine Proteinleiter verwendet.

2.3.7.2 Protein Transfer (Western Blotting)

Beim Protein-Transfer vom Gel auf eine PVDF-Membran wurde die „Nass-Blot“-Technik angewandt, wobei die Membran auf das Gel aufgelegt und zwischen Blot-Papier und saugstarken Material vertikal in eine mit Blot-Puffer gefüllte Kammer gestellt wurde. Da

Proteine durch Anlagerung von SDS-Molekülen eine negative Netto-Ladung aufweisen, werden sie beim Anlegen einer Spannung vom Gel auf die Membran in Richtung Anode transferiert. Der Transfer dauerte 3 Stunden und fand bei 4°C statt.

2.3.7.3 Antikörper-Bindung und Nachweis

Eine Inkubation in Blockierungslösung (5% Magermilchlösung in 1x PBST) sollte unspezifische Bindungen des für den Nachweis verwendeten Antikörpers vermeiden. Dazu wurde die Membran in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Es folgte die Zugabe des ersten anti-Caveolin-Antikörpers (C37120 für die α-Isoform bzw. C43420 für die β-Isoform), der 1:2000 in 1% Magermilchlösung (in 1x PBST) verdünnt und auf den Filter gegeben wurde. Nach Entfernen dieser Lösung und mehrmaligem Waschen der Membran wurde der zweite Antikörper (goat anti-rabbit horse redish peroxidase; HRP), der spezifisch an die schwere Kette des ersten Antikörpers bindet, in einer Verdünnung von 1:10000 in 1% Magermilchlösung zugegeben. Durch die an den sekundären Antikörper konjugierte Peroxidase, die das ECL-Detektionsreagenz proportional umsetzt, wurde die Immunoreaktivität visualisiert. Das dabei emittierte Licht schwärzt bei Exposition auf einen Röntgenfilm die Proteinbande(n) an der ihrer Größe entsprechenden Stelle.

2.3.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA (band shift assay, Gel-Retentionsanalyse) ist ein elektrophoretisches Untersuchungsverfahren, mit dem potentielle Interaktionen zwischen Nukleinsäure-bindenden Proteinen und einem DNA- oder RNA-Molekül nachgewiesen und analysiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die sequenz-spezifische Interaktion zwischen Proteinen und dem Promotor des *CAV-1*-Gens charakterisiert und untersucht werden, ob methylierte CpGs diese Interaktion beeinflussen. Das Promotor-Fragment wurde mittels PCR generiert und anschließend mit γ-^{32}P-ATP am 3´-Ende markiert. Nach der End-Markierung wurde das Reaktionsprodukt über eine DEAE-Sephacel-Säule (AP-Biotech) aufgereinigt. Methylierte Fragmente wurden vor der Markierung in Gegenwart der Methylase *Sss*I (M.*Sss*I) für 2h inkubiert. Das für die Bindereaktion erforderliche Protein-Lysat wurde aus PC-3-Zell-Kultur isoliert bzw. im Falle des nukleären Extrakts aus HeLa kommerziell erworben.

2.3.8.1 Prinzip des EMSAs

Die Grundlage dieser Methode ist die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität von freien, ungebundenen Nukleinsäuren und von Nukleinsäure/Protein-Komplexen. Die Folge

der Komplexbildung ist eine Retention des Komplexes im Vergleich zu freien Nukleinsäuren im Acrylamid-Gel. DNA/Protein-Aggregate können unter nicht-denaturierenden Bedingungen in die Gelmatrix eines Polyacrylamid-Gels hineinwandern und bleiben, ohne zu dissoziieren, während der Elektrophorese als Komplexe erhalten. Selbst schwach gebundene Komplexe können stabilisiert werden, weil wahrscheinlich die Netzstruktur eines Gels das Abdissoziieren der beiden Reaktionspartner erschwert und so die Komplexe stabilisiert. Die Verwendung radioaktiv markierter DNA-Fragmente ermöglicht es, den sog. „shift“ (die verkürzte Laufstrecke), das Bandenmuster der DNA/Protein-Komplexe und freier DNA durch Autoradiographie sichtbar zu machen.

2.3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe wurde die diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach *Laemmli* (99) angewandt. Dies rinzip besteht darin, dass in einer Elektrophorese-Kammer ein System aus zwei Gelen unterschiedlicher Porengröße gegossen wurde, wobei das SDS-PAG aus einem 4%igen Sammel-Gel und einem 8%igen Trenn-Gel besteht. Am Übergang von Sammel- zu Trenn-Gel werden Proteine in reduzierter, denaturierter Form zunächst konzentriert und dann im Trenn-Gel elektrophoretisch ihrer Größe nach fraktioniert. Durch Hitze-Denaturierung in Gegenwart von SDS wird idealerweise die vollständige Auflösung der Tertiärstruktur und ein gleichmäßiges Beladen mit SDS erreicht, so dass die positiven Ladungen der Proteine kompensiert werden. Indem SDS an die hydrophoben Regionen eines Proteins bindet, wird eine stark negative Ladung in die denaturierten, nach Zufall geknäulten und gefalteten Polypeptid-Ketten eingeführt und die meisten Proteine dissoziieren in ihre Untereinheiten. Dadurch wandern die DNA/Protein-Komplexe in einem Gel entsprechend ihrem Molekulargewicht. Unter Verwendung eines ^{14}C-markierten Molekulargewichtsmarkers ist eine ungefähre Abschätzung der Molmasse der DNA/Protein-Komplexe möglich.

Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren, die den Ausgang eines EMSA-Experimentes negativ beeinflussen können, zu minimieren, wird dem Ansatz ein Überschuss an unspezifischer Hefe-tRNA, poly(dI-dC) und Heparin, ein Polyanion, das mit dem Zuckerphosphat-Gerüst der Nukleinsäure interagiert, zugefügt. Da sich aber unspezifische Wechselwirkungen in EMSA-Versuchen nie völlig ausschließen lassen, müssen alle DNA/Protein-Komplexbildungen durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

In Kompetitionsexperimenten wird der Versuchsansatz mit dem Protein-Lysat zusätzlich zur ^{32}P-markierten Ziel-DNA mit einen Überschuss an nicht markierter DNA inkubiert. In diesen Versuchen sollte die spezifische Bindung des Proteins an unmarkierte Ziel-DNA durch Kompetition den shift verhindern können.

Die DNA/Protein-Binde-Reaktionen wurden in 20 mM HEPES (pH7.4), 2 mM DTT, 0.1% NP-40, 5% Glyzerin, 100 mM KCl, 2 µg/µl poly(dI-dC) und 150 ng Gesamt-Protein-Lysat aus PC-3 oder 90 ng kommerziell erworbenes nukleäres HeLa-Extrakt (HNE) für 30 min auf Eis durchgeführt. Etwa $2x10^5$ cpm doppel-strängige Promotor-DNA wurde zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Elektrophorese folgte die autoradiographische Detektion.

2.3.8.3 Klonieren von MeCP2 und in vitro-Protein-Synthese

Die Daten aus dem EMSA lassen eine methylierungsabhängige Interaktion des *CAV-1*-Promotors mit einem nukleären, methyl-CpG-bindenden Protein vermuten. Um diese Bindung zu bestätigen, wurde die cDNA von *MeCP2*, dem methyl-CpG-binding proteine 2, in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5/His-TOPO (TOPO TA, siehe oben) kloniert. Um eventuelle Einzel-Basen- und frühe Stop-Mutationen auszuschließen, wurde der rekombinante Vektor sequenziert, und der korrekte Vektor in die *in vitro*-Synthese des Proteins MeCP2 in rabbit reticulocyte lysate (Promega) eingesetzt.

2.3.8.4 In vitro-Transkription und -Translation

Ausgehend vom rekombinanten Vektor, der einen T7-RNA-Polymerase-Promotor besitzt, erfolgt im Retikulozyten-Lysat sowohl die Transkription als auch die Translation. Durch Zugabe der ^{35}S-markierten AS Methionin in die Biosynthese wird ein radioaktiv markiertes Protein synthetisiert, das dann über Autoradiographie visualisiert werden kann. Die Kontrolle des Molekulargewichts des synthetisierten Polypeptids erfolgte vor seinem Einsatz im EMSA auf einem 6%igen, denaturierenden Polyacrylamid-Gel. Durch den Einsatz eines eukaryotischen Systems sollte gewährleistet werden, dass alle notwendigen post-translationalen Modifikationen ein funktionsfähiges, korrekt gefaltetes, *in vitro*-synthetisiertes Protein generieren.

2.3.9 Chemilumineszenz-Assay zur quantitativen Bestimmung der *Luc*-Aktivität

Neben der Analyse der Expression von Genen ist es auch interessant, ihre Steuerung zu kennen. Der Luciferase-Reportergen-Assay bietet die Möglichkeit, die Expression der *Luciferase (luc)* in eukaryontischen Zellen quantitativ zu messen. Dazu werden Zellen mit einem Vektor transfiziert, der die luc von *Photinus pyralis* kodiert, wobei vor das *luc*-Gen die zu untersuchenden regulatorischen Sequenzen kloniert werden können.
Mittels dieses Reporter-Gen-Ansatzes wurde der Einfluss der CpG-Methylierung auf die Funktion des *CAV-1*-Promotors in eukaryontischen Zellen untersucht.

2.3.9.1 Test-Prinzip des luc-Reportergen-Assays

Der Assay ist eine sensitive, schnelle, leicht zu handhabende und nicht-radioaktive Alternative zu anderen Reportergen-Assay-Systemen. Der *luc*-Assay ist 100 – 1000x sensitiver als der radioaktiv durchgeführte Standard-CAT-Assay. Die detektierbare lineare Bandbreite der Luciferase ist ungefähr 10 fg bis 10 ng (10^{-16} – 10^{-19} M). Das Enzym wird aus einem einzelnen Polypeptid von 550 AS, das in seiner monomeren Form aktiv ist, gebildet.
Die Luciferase katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Emission von gelb-grünem Licht einer Wellenlänge von 562 nm.

$$\textit{Luciferin} + \textit{ATP} + O_2 \xrightarrow[\textit{Luciferase}]{Mg^{2+}} \textit{Oxyluciferin} + \textit{AMP} + PP_i + CO_2 + \textit{Licht}$$

Auf diese Weise kann die Expression der *luc* als Mass für die Aktivität des *CAV-1*-Promotors einfach durch Messung der Lichtmenge quantifiziert werden.

2.3.9.2 Generierung der Expressionsvektoren

Die pGL3-Plasmide waren die Ausgangsbasis für die Konstrukte, die generiert und im *luc*-Assay eingesetzt wurden.

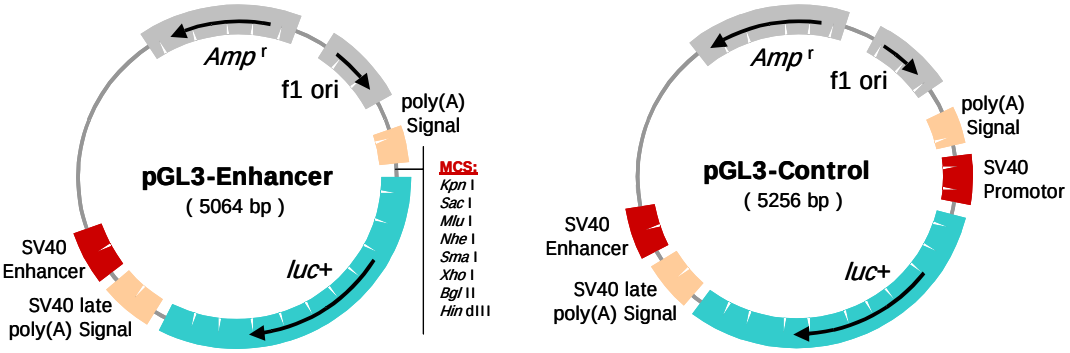


Abb. II-2: pGL3-Vektoren zur Expression des *luc*-Gens. Das Plasmid pGL3-Enhancer ist mit einer Multi-Cloning Site (MCS) ausgestattet, mit deren Hilfe das zu untersuchende Promotor-Fragment vor den Transkriptionsstartpunkt des *Luciferase*-Gens (*luc*+) kloniert werden kann. Das Plasmid pGL3-Control entspricht dem pGL3-Enhancer Konstrukt, besitzt jedoch einen eigenen *SV40*-Promotor.

Die chimären *luc*-Konstrukte wurden durch Ligation der entsprechenden *CAV-1*-Promotor-Fragmente in den pGL3-Enhancer-Vektor generiert, so dass das *luc*-Gen (*luc*+) dieses Vektors unter der transkriptionellen Kontrolle des *CAV-1*-Promotors steht.

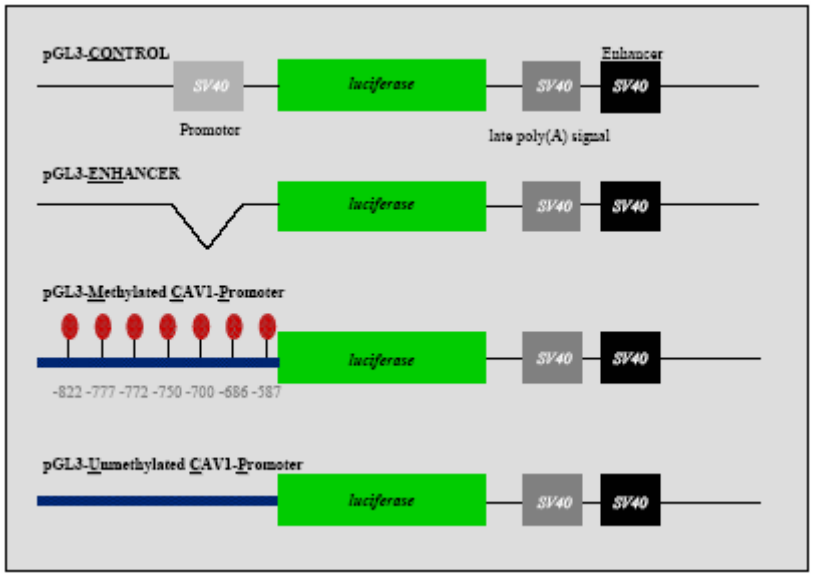


Abb. II-3: Schematische Darstellung der *CAV-1-luc*-Konstrukte. Diese wurden zur Bestimmung der *CAV-1*-Promotor-Aktivität im *luc*-Assay eingesetzt. Als Kontrolle wurde der Vektor pGL3-CON verwendet, der einen funktionellen *SV40*-Promotor vor dem *luc*-Gen besitzt, während die Negativ-Kontrolle pGL3-ENH keinen Promotor hat. Vor das Reportergen des von pGL3-UCP wurde das unmethylierte PCR-Produkt des *CAV-1*-Promotors kloniert. Beim Vektor pGL3-MCP wurde das Promotor-Fragment unmittelbar vor dem Klonierungsschritt mit der Methylase *Sss*I inkubiert, um alle CpG-Stellen innerhalb des zu testenden *CAV-1*-Promotors zu methylieren. Alle Vektoren besitzen außerdem *SV40*-Poly(A)-Signal gefolgt von einem *SV40*-Enhancer, um die Expression der jeweiligen Promotoren zu verstärken.

Das pGL3-UCP (Unmethylated *CAV-1* Promoter)-Konstrukt, das ein komplett unmethyliertes 356 bp *CAV-1*-Promotor-Fragment (–881 bp to –518 bp, relativ zum Translationsstart) trägt,

wurde in die *Bam*H1 und *Kpn*I Stellen des pGL3-Enhancer-Vektors kloniert. Durch Behandlung des aufgereinigten *CAV-1*-PCR-Fragments mit der Methylase *Sss*I wurden die CpG-Dinukleotide im *CAV-1*-Promotor methyliert. Das *Sss*I methylierte PCR-Produkt wurde anschließend ebenfalls in einen pGL3-Vektor kloniert und das entstandene Plasmid pGL3-MCP (Methylated *CAV-1* Promoter) genannt. Diese Version von pGL3 besitzt schließlich sieben methylierte CpG-Dinukleotide in der zu prüfenden Region. Das Plasmid pGL3-Control repräsentiert als Konstrukt mit *SV40*-Promotor die Positiv-Kontrolle des *luc*-Assays (siehe Abbildung II-3). Als Negativ-Kontrolle diente der pGL3-Enhancer-Verktor in seinem Originalzustand.

Für die nötige Vervielfältigung der Plasmide wurden methylierungserhaltende Bakterien vom Stamm *E.Coli* ER1647 verwendet. Bei diesen handelt es sich um Bakterien mit Restriktions-defekten in den Genen *McrA* und *McrBC*. Dieser Stamm ist somit nicht in der Lage, Fremd-DNA zu schneiden, die durch verschiedene sequenz-spezifische Adenin/Cytosin-Methylasen modifiziert wurde.

2.3.9.3 Transfektion, Auswertung und Normalisierung

Für die nötigen Transfektionen der Zelllinie PC-3 wurde das Stratagene GeneJammer Transfection-Reagenz nach Herstellervorgaben verwendet. Durch Zugabe von Lysis-Puffer wurden die transfizierten Zellen nach ausreichendem Wachstum lysiert und das Zell-Lysat in eine Mikrotiter-Platte transferiert. Die Enzym-Reaktion wird durch Zugabe des Luciferase-Reagenz gestartet, das alle Komponenten enthält, die für den Start der Chemilumineszenz-Reaktion nötig sind. Die Quantifizierung der Photonen-Emission übernahm ein Luminometer.

Alle Transfektionen erfolgten pro Experiment in doppelter Ausführung und alle Experimente wurden mindestens fünfmal durchgeführt, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. In allen Transfektionen kamen gleiche Mengen an Plasmid-DNA zum Einsatz und es wurden ähnliche Transfektionseffizienzen erhalten. Alle Versuche wurden sowohl mit den zu testenden Konstrukten als auch den beiden Kontroll-Vektoren durchgeführt, um die Daten sicher interpretieren zu können.

Um experimentellen Schwankungen während der Transfektion und der Lyse der Zellen zu kompensieren, wurde die Lumineszenz bezogen auf die Galactosidase-Aktivität normalisiert, wobei ein β-GAL-Assay (Clontech) verwendet wurde. Der β-GAL-Vektor pCMV-β-control wurde zu diesem Zweck in allen Experimenten mit den *luc*-Konstrukten co-transfiziert.

2.3.10 Analyse der DNA-Methylierung von PCa-Zelllinien und Tumor-DNA mittels modifizierter Bisulfit-Methode

Für die Analyse des Methylierungsstatus von CpG-Dinukleotiden im *CAV-1*-Promotor in PCa-Zelllinien und frischem Prostata-Tumoren und prostatischem Normal-Gewebe wurde die Methode der Bisulfit-Konversion genomischer DNA mit anschließender PCR und Sequenzierung der PCR-Produkte gewählt. Dazu wurde genomische DNA aus Cryoschnitten von sieben Prostata-Tumoren sowie dem entsprechenden gesunden prostatischen Gewebe mit *Hind*III, das nur außerhalb des zu untersuchenden Fragments schneidet, restringiert und mit Natrium-Bisulfit behandelt. Nach anschließender PCR mit spezifischen Primern wurde die konvertierte DNA sequenziert. Dazu wurde DNA isoliert, eine Bisulfit-vermittelte Konversion aller CpG-Dinukleotide durchgeführt und die Amplifikate kloniert. Insgesamt wurden von sieben Patienten 72 Klone aus Tumor- und 71 Klone aus gesunden Prostata-Arealen mittels Sequenzierung analysiert.

2.3.10.1 Chemie der Bisulfit-Reaktion

Die Reaktion von Cytosin-Resten mit Natrium-Bisulfit, das zur selektiven Konversion zu Uracil führt, wurde bereits in den frühen 70er Jahren (74; 172) zur Untersuchung der Konformation von einzel- und doppelsträngigen Regionen in DNA und RNA angewandt (65; 91; 123).

Die Reaktion umfasst drei Hauptschritte (Abbildung II-4): Die Sulfonierung (I), die Desaminierung (II) und die Desulfonierung (III).

I) *Reversible Sulfonierung der Cytosine zu Cytosin-6-Sulphonat*. Die Sulfonierung findet bevorzugt bei einem niedrigen pH-Wert und niedriger Temperatur statt. Bei 0°C wird der Gleichgewichtszustand innerhalb von 20 Minuten erreicht.

II) *Irreversible hydrolytische Desaminierung der Cytosin-6-Sulphonat zu Uracil-6-Sulphonat*. Diese Reaktion findet bevorzugt bei höheren Konzentrationen von Natrium-Bisulfit und bei höheren Temperaturen statt, das pH-Optimum liegt zwischen pH 5 und 6.

III) *Reversible Desulfonierung der Uracil-6-Sulphonate zu Uracil*. Diese Reaktion tritt bevorzugt bei hohen pH-Werten ein.

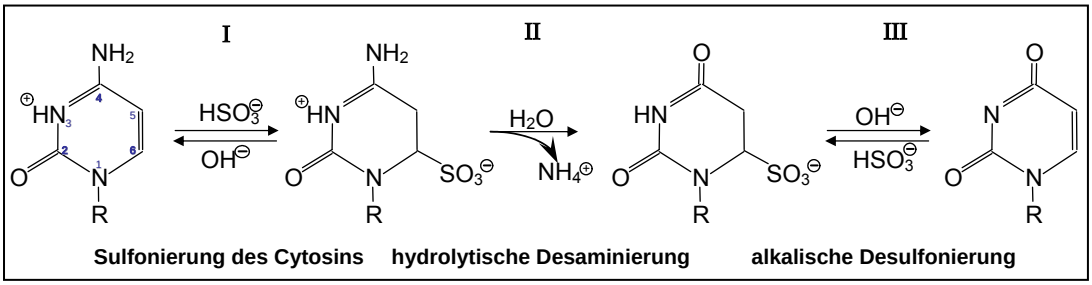


Abb. II-4: Chemie der Reaktionsschritte: I) Sulfonierung an Position C6 des Cytosins, II) irreversible hydrolytische Desaminierung an Position C4, wobei 6-Sulphonate-Uracil entsteht, und III) anschließende Desulfonierung unter alkalischen Bedingungen. Methylierung an Position C5 behindert eine Sulfonierung an der C6-Position (Schritt I).

Nur die Cytosine in Einzelstrang-DNA können effizient mittels Natrium-Bisulfit modifiziert werden, wohingegen Cytosine in nicht-denaturierter, doppelsträngiger DNA nahezu resistent sind. Des Weiteren ist die Reaktion unter den oben genannten Bedingungen sehr selektiv für nicht-methylierte Cytosine. Diese werden quantitativ modifiziert (in Uracil konvertiert), während nur 2-3% der 5-Methyl-Cytosine reagieren und in Thymine konvertiert werden (197).

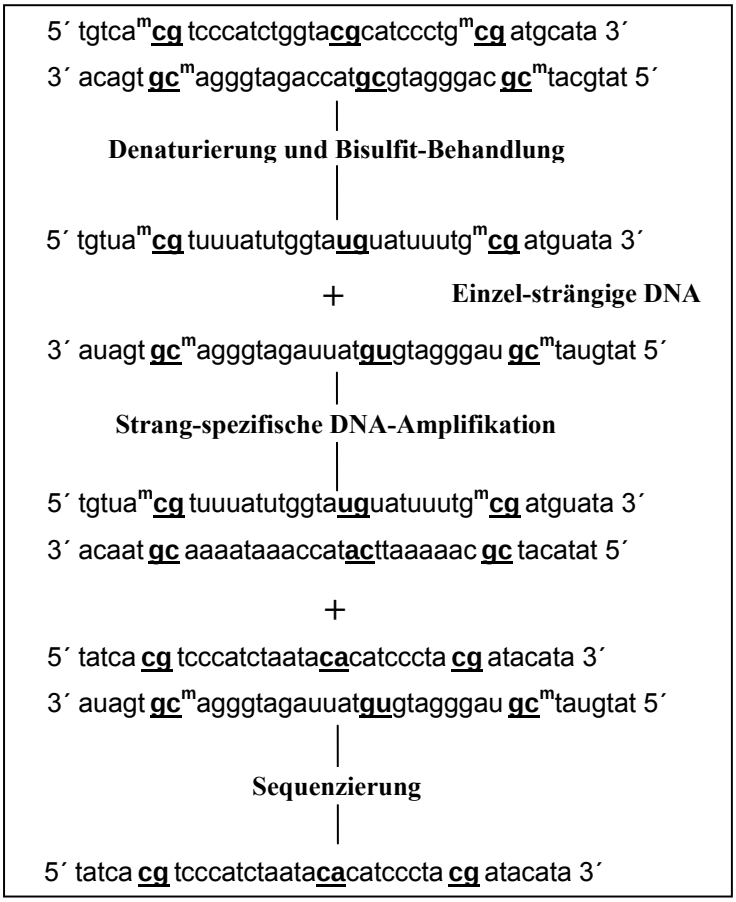


Abb. II-5: Schematische Darstellung einer DNA-Sequenz nach Bisulfit-Konversion. Die beiden Stränge sind nach einer Bisulfit-Behandlung nicht länger komplementär (a=Adenin, c=Cytosin, ^{m}c=5-Methyl-Cytosin, g=Guanin, t=Thymin, u=Uracil).

Das hier verwendete Protokoll ist eine modifizierte Version (69) der ursprünglichen Technik der Bisulfit basierten Methylierungsanalyse von *Frommer et al.* (52). Der Hauptunterschied liegt im Einbetten der zu untersuchenden DNA in low melting point (LMP)-Agarose. Alle Modifikationen finden in der Agarose statt, was den Verlust an DNA während der Prozedur verringern soll, so dass mit minimalen DNA-Mengen (700 ng) gearbeitet werden kann. Des Weiteren verhindert die Agarose das Re-Annealing der denaturierten DNA-Stränge, was höchste Qualität und Reproduzierbarkeit der Reaktion ermöglichen soll.

2.3.10.2 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA, PCR und Sequenzierung der modifizierten DNA

Genomische DNA wurde mit Natrium-Bisulfit behandelt, um alle unmethylierten Cytosine in Uracil-Reste zu verwandeln. Dazu wurden zunächst 700 ng genomische DNA mittels Restriktionsenzym *Hind* III, das flankierende Stellen des *CAV-1*-Promotors schneidet, restringiert. Dieser Schritt fördert die räumliche Trennung komplementärer DNA-Stränge nach einem alkalischen und Hitze-Denaturierungsschritt. Nicht-methylierte Cytosine in Einzelsträngen werden anschließend in Gegenwart von 2.5 M Natrium-Bisulfit pH5 und Hydrochinon modifiziert und durch eine Alkali-Behandlung zu Uracil konvertiert. Nach gründlichem Waschen in TE-Puffer wird die zu untersuchende Sequenz mittels PCR amplifiziert, wobei für Bisulfit-konvertierte DNA optimierte Primer zum Einsatz kamen. Im vorliegenden Fall dienten ~100 ng Bisulfit-behandelte DNA als Template für die Amplifikation. Die PCR-Produkte können direkt in eine Sequenzreaktion eingesetzt werden oder alternativ nach Klonierung als einzelne DNA-Klone sequenziert werden. In dieser Arbeit wurden die PCR-Produkte TOPO TA kloniert und mindestens zehn Klone sequenziert, um den Grad der Methylierung zu bestimmen. Die Sequenzierung erfolgte mittels ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1.

Zusätzlich zur DNA aus Zell-Kultur wurde der Methylierungsgrad von DNA aus Prostata-Tumoren bestimmt. Neben Tumor- und Kontroll-DNA, die freundlicherweise vom Labor Wolfgang Schulz in Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurde, konnte auch auf DNA aus Prostaten aus der Pathologie Ulm zurückgegriffen werden. Die Aufarbeitung der Prostatektomie-Präparate erfolgte in der Pathologie der Uni Ulm. Nach Entnahme der Prostata wurden transversale, 3 - 4 mm dicke Schnitte senkrecht zur rektalen Fläche angefertigt. In der Richtung von Apex zur Basis wurden die Schnitte je nach Größe halbiert, geviertelt oder weiter unterteilt und bei -80°C gelagert.

2.3.10.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Die Befundung der Schnitte erfolgte durch den Pathologen Dr. Sven Perner. Mit Hämatoxylin und Eosin werden die Zellkerne blauschwarz bis violett und das Zytoplasma rosa angefärbt, so dass sich eindeutig normales Prostata-Gewebe, BPHs, (HG)-PIN bzw. prostatische Tumoren identifizieren lassen.

Von den Cryo-Präparaten wurden 5 µm Gefrierschnitte hergestellt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Nach einem 3minütigen Waschschritt in 1x PBS wurden die Objektträger 5 min in Hämatoxylin-Lösung (Hämatoxylin in Aqua bidest) gefärbt, dann kurz in Aqua bidest geschwenkt und 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Objektträger 30 sec in einer 1%-igen Eosin-Lösung gefärbt, kurz in Aqua bidest geschwenkt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 90%, 99%) für je 5 min dehydriert. Zum Schluss wurden die Objektträger 5 min in Xylol inkubiert und mit Eukitt eingedeckt.

2.3.10.4 RNAse-freie Laser-Mikrodissektion (LCM)

In weiteren Arbeitsschritten wurde reines Tumor-Gewebe und reines Normal-Gewebe durch Mikrodissektion bzw. durch Einsatz entsprechender Kits für die RNA/DNA-Extraktion gewonnen. Die Laser Capture Microdissection (LCM) ist eine sehr hilfreiche Methode, um einheitliche Populationen von Zellen basierend auf deren morphologischen Charakteristika aus heterogenen Tumoren zu isolieren.

Mittels LCM wurden ca. 10000 Prostata-Karzinom-Zellen gewonnen und aus diesen anschließend mit dem PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus) RNA isoliert. Da diese Methode allerdings zu zeit- und arbeitsintensiv war, wurde schließlich auf die LCM verzichtet und stattdessen RNA aus Cryoschnitten isoliert.

2.3.10.5 RNA-Isolation aus Cryoschnitten

Dazu wurde von den Blöcken umliegendes, tumorfreies Gewebe durch Zurechtschneiden entfernt, je nach Größe des Tumor-Areals 3 - 5 10 µm Schnitte gemacht und daraus mittels Blood and Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen) DNA extrahiert. Die erhaltene DNA wurde in die Bisulfit-Konversion eingesetzt und der Methylierungsgrad von *CAV-1* in Prostata-Tumoren und normalem, prostatischem Gewebe bestimmt.

2.3.11 Reaktivierung der *CAV-1*-Expression in LNCaP-Zellen

Sowohl die Ergebnisse aus den Reportergen-Experimenten mit *CAV-1*-Promotor-Kontrukten als auch die Befunde der EMSA-Versuche ließen ein Abschalten der *CAV-1*-Gen-Expression infolge von Methylierung vermuten. Um dieser Vermutung nachzugehen, sollte überprüft werden, ob durch Demethylierung der DNA oder Deacetylierung der Histone eine Reaktivierung der *CAV-1*-Expression in der Zelllinie LNCaP, die kein *CAV-1* exprimiert (s. Ergebnisse Northern Blot und RT-PCR) erzielt werden könnte.

2.3.11.1 5-Aza-2´-Desoxycytidin-Behandlung

Durch Hypermethylierung inaktivierte Gene können durch den DNA-Methyl-Transferase-Inhibitor 5-Aza-2´-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) reaktiviert werden. 5-Aza-CdR ist ein Cytidin-Analogon mit einem Stickstoff-Atom, das das Kohlenstoff-Atom in Position 5 des heterozyklischen Ringes ersetzt. 5-Aza-CdR wird in der S-Phase des Zellzyklus in den DNA-Strang anstelle der Cytosin-Base inkorporiert. Im Laufe weiterer Zellzyklen werden immer mehr 5-Aza-CdR-Moleküle in die DNA eingebaut und die ursprüngliche Methylierung der Zelle geht verloren. Nach Einbau von 5-Aza-CdR in DNA und dem irreversiblen Binden der DNA-Methyl-Transferase1 können aufgrund seiner strukturellen Unterschiede zum Cytosin keine Methyl-Gruppen von der Methyl-Transferase auf das 5-mC-Analogon transferiert werden und es kommt zu einer Hypomethylierung (189). Dieser Verlust der Methylierung kann die Gen-Expression in *cis* durch das Relaxieren der Chromatin-Struktur regulieren, was als erhöhte Nuklease-Sensitivität detektiert werden kann. Dieses Remodellieren der Chromatin-Struktur erlaubt es, Transkriptionsfaktoren an Promotor-Regionen zu binden, den Transkriptionskomplex sich ausbilden zu lassen und die Gen-Expression so zu reaktivieren.

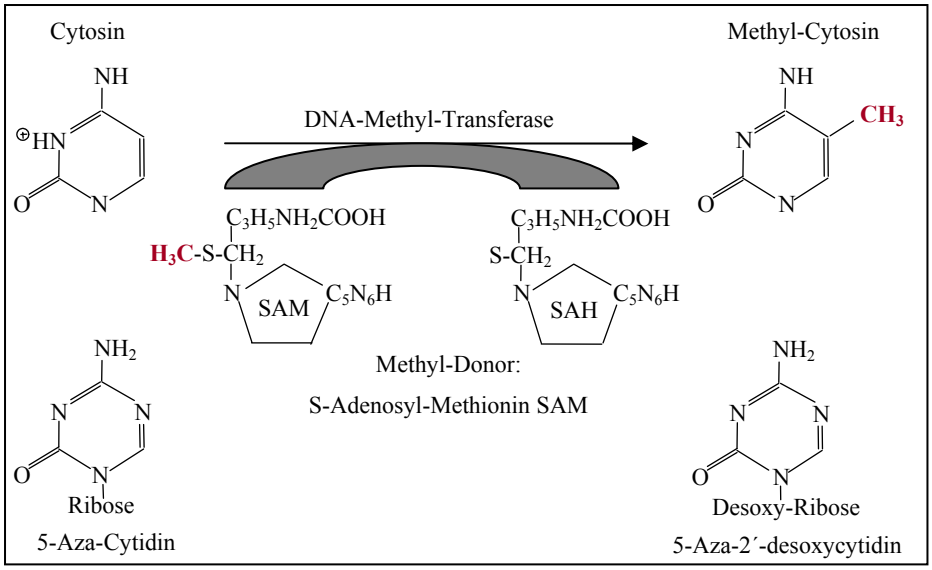


Abb. II-6: Schema des Transfers einer Methyl-Gruppe auf Cytosin. Die DNA-Methyl-Transferase katalysiert in Anwesenheit des Methyl-Donors SAM den Transfer einer Methyl-Gruppe auf ein Cytosin, wodurch Methyl-Cytosin entsteht. Unterschied zwischen 5-Aza-Cytidin und 5-Aza-2´-Desoxycytidin.

Bei diesem Experiment wurden LNCaP-Kulturen 24 h vor der Behandlung geteilt und dünn ausgesät. 5-Aza-CdR wurde diesen Zellen mit End-Konzentrationen von 100, 200, 300 und 500 µM zugegeben. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle drei Tage, wobei bei jedem Wechsel frisches 5-Aza-CdR-enthaltendes Medium zugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24h in frischem α-Medium inkubiert. Dieses Prozedere wurde über einen Zeitraum von 2 Wochen wiederholt, bis die Zellen schließlich etwa 80% konfluent waren. Nach RNA-Isolation erfolgte eine RT-PCR mit *CAV-1*-spezifischen cDNA-Primern.

2.3.11.2 Trichostatin A-Behandlung

Trichostatin A (TSA) ist ein nicht-kompetitiver reversibler Inhibitor der HDAC(Histon-Deacetylase)-Aktivität. Die sich ergebende Histon-Hyperazetylierung führt zur Chromatin-Relaxation und Modulation der Gen-Expression (215). TSA arretiert Zellen in der G1- und G2-Phase des Zell-Zyklus, induziert Differenzierung und revertiert die transformierte Morphologie von bestimmten Zellen in Kultur (214).

Für den *in vitro*-Versuch mit TSA (1mg/ml in Ethanol) wurden die Kulturen 24 h vor Zugabe des Agens geteilt und dünn ausgesät. Die Konzentrationen von TSA betrugen 10, 20, 50, 100 und 200 ng/ml bzw. als Kontrolle 100µl 100% Ethanol in α-Medium. Die Behandlung zog sich über fünf Tage mit täglichen Mediumwechsel und Zugabe von frischem TSA. Am 6. Tag erfolgte die RNA-Isolation mit anschließender RT-PCR wie oben erwähnt.

2.3.11.3 Behandlung der Zelllinien mit PD98059

PD98059 (2´-Amino-3´-Methoxyflavone) inhibiert selektiv die Aktivität der MAP Kinase Kinase (MAPKK, ERK Kinase, oder MEK), indem es die Aktivierung der MAP Kinase und die anschließende Phosphorylierung der MAP Kinase-Substrate sowohl *in vitro* als auch in intakten Zellen blockiert. Für dieses Experiment wurden zunächst die PCa-Zelllinien verwendet, um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Stärke der Expression zwischen unbehandelten und behandelten Kulturen gibt und ob die Expression des Gens generell in diesen PCa-Linien durch eine Hyperaktivierung der p42/44 MAP Kinase reduziert ist. Dazu wurde eine Zeitreihe über 24 h erstellt und zum jeweiligen Zeitpunkt (4, 5 und 7h nach Zugabe von PD98059) die Inkubation durch RNA-Isolation unterbrochen wurde. PD98059 wurde in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Der Nachweis der Expression erfolgte mittels RT-PCR mit Primern, die spezifisch für die α- (cDNAa1 + cDNAb) und β-Isoform (Ex2H + cDNAb) von *CAV-1* sind (Abbildung III-16).

LNCaP-Zellen wurden ebenfalls mit PD98059 über einen Zeitraum von 21 h inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten (1, 2, 3, 4, 5, 7 und 21h) wurde RNA isoliert und die Reaktivierung der Expression mittels RT-PCR untersucht. Eine Vitalitätskontrolle der Zellen erfolgte visuell anhand der Morphologie der Zellen.

2.3.13 Imprinting-Analyse des humanen und murinen *CAV-1*-Gens

Das Gen *CAV-1* liegt in enger Nachbarschaft zu einem Imprinting Cluster, das auf Chromosom 7q32 zu finden ist (12; 93). Da sich ein solches Cluster möglicherweise auch auf die Region 7q31.1 ausdehnt, war es nun interessant, die allel-spezifische Expression von *CAV-1* zu überprüfen. Für die Unterscheidung zwischen maternalem und paternalem Allel in heterozygoten DNA-Samples wurde zunächst in der NCBI-Datenbank[3] nach einem exprimierten Einzel-Basen-Polymorphismus gesucht. Dieser wurde in Form einer C->A-Substitution in der 3´UTR der *CAV-1*-DNA an Position 965 gefunden. Im nächsten Schritt wurden kultivierte Fibroblasten einiger Familien, beide Eltern mit mindestens einem Kind, untersucht. Fibroblasten dieser Familien, bestehend aus Kontrollen und NF-1-Patienten (Neurofibromatose Typ-I), waren während eines NF-1-Projekts gesammelt worden und standen nun für meine Untersuchungen zur Verfügung. In zwei der sechs Familien konnte Heterozygotie für diesen Austausch bestätigt werden. Von diesen wurde RNA isoliert, cDNA

[3] NCBI HumanSNPdb http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/CMD=search&db=snp/

synthetisiert und die RNA und RT-PCR-Produkte mittels SNaPShot-Analyse auf dem ABI auf Heterozygotie getestet.
Zusätzlich zu den oben erwähnten Familien wurde cDNA, die aus Gesamt-RNA von verschiedenen Geweben heterozygoter Föten (zur Verfügung gestellt von V.M. Kalscheuer, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin) untersucht. Bei den Geweben handelte es sich um Skelett-Muskeln, Haut, Gehirn, Niere, Nebenniere, Leber, Plazenta, Darm, Lunge, Zunge, Chorion-Platte (fötaler Teil der Plazenta) und Amnion (12). Die cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert und direkt sequenziert.

Eine Imprinting-Analyse bei Mäusen ist aufgrund der Verfügbarkeit von Eltern-Tieren und der Möglichkeit von Kreuzungen einfacher durchführbar als beim Menschen. Aus diesem Grund wurden Gewebe von F1-Hybriden der Maus-Stämme *Mus musculus* und *M. spretus*, die für die meisten Marker divergent sind, auf Imprinting hin untersucht. Bei diesen Geweben handelte es sich um Leber, Milz und Muskel, sowie Zunge und Gehirn. Grundlage dieser Untersuchung war ein exprimierter Polymorphismus im *cav-1*-Gen mit unterschiedlichen Allelen in den beiden Maus-Stämmen, der sich aus der Suche in der Maus-SNP-Datenbank[4] ergab. Die SNPaPShot-Analyse erfolgte mit den für den Polymorphismus spezifischen Primern auf dem ABI.

[4] NCBI MouseSNPdb http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/MouseSNP.cgi/

2.4 Statistische Verfahren zur Ermittlung von Assoziation

2.4.1 Bestimmung des Hardy-Weinberg-Equilibriums

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) beschreibt den Zusammenhang zwischen Genotyp und Allel-Frequenzen eines Locus in einer diploiden Population. Unter bestimmten Voraussetzungen sind im HWE sowohl die Allel- als auch die Genotyp-Frequenzen einer Population konstant und stehen in einem bestimmten Verhältnis zueinander. Folgende Voraussetzungen müssen für das HWE erfüllt sein:

- Diploide Individuen
- Sexuelle Fortpflanzung
- Nicht überlappende Generationen
- Zufällige Paarung (Panmixie)
- Unendliche Populationsgröße
- Keine Migration, Mutation und Selektion

Die Beziehung zwischen Allel- und Genotyp-Frequenzen wird durch folgende Gleichungen ausgedrückt:

Genotyp:	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
HW-Häufigkeit:	p^2	$2pq$	q^2

Sind A_1 und A_2 die einzigen Allele an diesem Locus, so gilt für deren Häufigkeiten $p + q = 1$.

Abweichungen vom HWE in beobachteten Genotyp-Häufigkeiten innerhalb einer Gruppe von Probanden können entweder durch Genotypisierungsfehler, unerwartete Verwandtschaftsbeziehungen, aufgrund einer unerkannten Vermischung genetisch divergenter Sub-Populationen, oder eben durch Assoziation eines Genotyps mit dem untersuchten Phänotyp zu Stande kommen.
Beobachtete, und nach dem HWE erwartete Genotyp-Häufigkeiten können mit Hilfe eines χ^2-Tests miteinander verglichen werden, um eventuelle Abweichungen festzustellen.

2.4.2 Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts

Ein Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium, LD) beschreibt die Verknüpfung eines bestimmten Marker-Allels mit einem anderen Marker oder einer Krankheit in einer Population. LD liegt dann vor, wenn in der betrachteten Population bestimmte Allele dieser Marker häufiger auf einem Chromosom gemeinsam zu finden sind, als dies unter der

Annahme von freier Rekombination (Kopplungsgleichgewicht) zu vermuten wäre. Rekombination trennt nur selten zwei Loci, die auf einem Chromosom dicht neben einander liegen, da nur Crossing-over, das genau in dem kurzen Bereich zwischen den Loci stattfindet, Rekombinanten hervorbringt.

Allel-Gruppen, die in einem sehr kurzen Abschnitt eines Chromosoms liegen, werden daher gewöhnlich gemeinsam über viele Generationen hinweg weitergegeben. Einen solchen Block von Allelen bezeichnet man als Haplotyp. Das Maß |D'| gibt an, ob eine beobachtete Anzahl an Haplotypen allein auf eine aufeinander folgende Entstehung von Polymorphismen durch Mutationen zurückgeführt werden kann (|D'| = 1), oder ob Rekombinationsereignisse zur Erklärung zusätzlicher Haplotypen angenommen werden müssen (|D'| < 1). Der Wert 0 steht dann für freie Rekombination.

Soll beurteilt werden, wie sicher anhand des Auftretens eines bestimmten Allels an einem Markerort der Zustand an einem anderen Marker-Locus vorhergesagt werden kann, so ist die Größe r^2 aussagekräftig. Sind für ein bi-allelisches Marker-Paar nur zwei Haplotypen zu beobachten, so befinden sich die beiden Loci in einem absoluten Kopplungsungleichgewicht ($r^2 = 1$).

2.4.3 Ermittlung von Haplotyp-Frequenzen

Als Ausgangsdaten zur Bestimmung des Kopplungsungleichgewichts eines Marker-Paares sind zunächst nur die Häufigkeiten von Genotypen beider Loci zugänglich. Bei einer Betrachtung von zwei SNPs ist dabei zumindest für die doppelt-heterozygote Konstellation keine eindeutige Aussage über die Phase der Allele möglich. Um das Problem des zweideutigen Genotyps einzugrenzen, wurden die Frequenzen der Zwei-Locus-Haplotypen in einem Maximum-Likelihood-Verfahren mit Hilfe des Programms EH (Estimating Haplotypes) (208) geschätzt. Diese Haplotyp-Frequenzen können dann zur Berechnung von |D'| und r^2 eingesetzt werden.

Beide Masse des Kopplungsungleichgewichts, r^2 und |D'|, können Zahlen zwischen 0 und 1 annehmen, wobei der Wert 0 für freie Rekombination steht.

2.4.4 Fall-Kontroll-Studie

In Fall-Kontroll-Studien wird geprüft, ob ein genetisches Merkmal mit einem Phänotyp assoziiert ist, das heißt, ob es bei Betroffenen signifikant häufiger auftritt als bei Nicht-Betroffenen (59).

Zur Entscheidung, ob ein genetisches Merkmal ein Risikofaktor ist, wurden übliche statistische Verfahren angewandt (190). Dabei wurde untersucht, ob die Unterschiede zweier Stichproben durch zufallsbedingte Streuung zu erklären waren (Nullhypothese H0) oder ob tatsächlich ein Effekt vorlag (Alternativhypothese H1). Mit dem χ^2-Test wurde aus den Beobachtungsdaten die jeweilige Testgröße errechnet und der zugehörige p-Wert ermittelt. Der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die vorliegenden Ergebnisse zufällig ergeben könnten, d.h. der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese H0 (keine Assoziation) ablehnt. Wenn diese Wahrscheinlichkeit gering ist (kleiner als das zuvor vereinbarte Signifikanzniveau α), wird H0 verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. Meist (so auch in der vorliegenden Arbeit) setzt man α = 0.05. Außerdem wurden Odds Ratio (OR) mit Konfidenz-Intervall (CI) berechnet. Das OR gibt an, um welchen Faktor das Krankheitsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger eines bestimmten Allels oder Genotyps ist. Es kann aus der Vier-Felder-Tafel

	Risiko-Genotyp	kein Risiko-Genotyp
krank	p_{11}	p_{10}
gesund	p_{01}	p_{00}

bestimmt werden durch das Verhältnis

$$OR = \frac{p_{11} * p_{00}}{p_{10} * p_{01}}.$$

Um die Signifikanz des OR beurteilen zu können, wurde das zugehörige CI angegeben. Das CI ist der Wertebereich, der mit einer vorgegebenen Vertrauenswahrscheinlichkeit (1 - α) die wahre OR enthält. Enthält das CI den Wert 1, ist das Ergebnis nicht signifikant. Da - wie üblich - eine Irrtumswahrscheinlichkeit von α = 5% gewählt wurde, werden 95% CI angegeben.

Im vorliegenden Fall eines Fall-Kontroll-Vergleichs zu Risiko-Genotypen beim Prostata-Karzinom wurde mit der Software StatView 5.0.1 (SAS Institute Inc., Madison USA) die logistische Regression auf einzelnen Polymorphismen und vom Krankheitsstatus jeweils von Kontrollen, sporadischen und familiären Fällen berechnet. Dabei wurden Odds Ratios (OR) und dazugehörige 95% CIs sowie die entsprechenden *P*-Werte ebenfalls ermittelt.

Die Tests zur Assoziation zwischen den SNPs und Prostata-Karzinom wurden durchgeführt, indem Allel- und Genotyp-Frequenzen von Fällen und Kontrollen für jeden SNP verglichen wurden. Unterschiede in den Allel-Frequenzen wurden für jeden SNP mittels χ^2-Test mit einem Freiheitsgrad ermittelt. Auch die Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen wurden

mittels χ^2-Test bestimmt, jedoch mit zwei Freiheitsgraden. Beide Tests wurden mit dem SAS-Computer-Programm durchgeführt.

2.4.5 Statistische Analyse im Fall des *CAV-1*-Gens

Ob die Genotyp-Frequenzen im Hardy-Weinberg Equilibrium liegen, wurde mit Hilfe des exakten Tests, einem Bestandteil des Computerprogramms FINETTI (entwickelt von Wienker und Strom), getrennt für Fälle und Kontrollen überprüft. Das Linkage Disequilibrium (LD) zwischen den einzelnen SNPs wurde durch D' und r^2 quantifiziert.

Die Assoziation von Krankheit und Allelen, durch einen Unterschied der Genotyp-Verteilung zwischen Kontrollen und Fällen gekennzeichnet, wurde durch den Cochran-Armitage Trend Test, ebenfalls Bestandteil des SAS Programm-Packets (SAS) beschrieben.

Da sich alle SNPs im HWE befanden, wurden die allelischen Odds Ratios mit ihren 95% CI unter der Annahme potentieller ko-dominanter Effekte berechnet. Diese Odds Ratios verdeutlichen die Erhöhung des Risikos PCa zu entwickeln, wenn der Patient ein potentielles Risiko-Allel besitzt.

Die Haplotypen neben einander liegender SNPs wurde mittels FAMHAP geschätzt (*http://www.uni-bonn.de/~umt702/becker.html*). Die Frequenz jedes einzelnen Haplotyps wurde jeweils gegen alle restlichen Haplotypen zwischen Kontrollen und Fällen durch den χ^2-Test mit einem Freiheitsgrad verglichen.

Die Analysen wurden separat in mehreren Stratifikationen der Fälle mit den entsprechenden Kriterien für das Stratifizieren, also klinischen Parametern und der Anamnese Prostata-Karzinom durchgeführt.

Der Vergleich von Fällen und Kontrollen bzgl. der Allel- und Genotyp-Frequenzen wurde im Sinne einer explorativen Analyse durchgeführt. Aus diesem Grund wurden für das multiple Testen keine Anpassungen vorgenommen, d.h. in den Analysen mit Stratifikation und den multiplen Haplotyp-Vergleichen wurden die ermittelten p-Werte ohne Korrektur angegeben.

2.4.6 Stratifizierung

Für die insgesamt 486 Teilnehmer der Studie, bestehend aus 190 sporadischen, 105 familiären Fällen und 191 Kontrollen, standen klinische Informationen wie das TNM (Tumor - Noduli - Metastasen)-Stadium, der histopathologische Tumor-Grad, der Gleason Score, sowie das Alter der Erst-Diagnose zur Verfügung (Tabelle 2). Für Analyse-Zwecke erfolgte eine Dichitomisierung dieser Informationen nach Erst-Diagnose-Alter ($\leq$ 65 oder > 65 Jahre),

niedrigem oder hohem Tumor-Grad (GI-II oder GII-III/III) sowie dem histopathologischen Stadium entsprechend T1/2 vs. T3/4, N0 vs. N1/2, M0 vs. M1 sowie Follow Up-Informationen (NED und Progression).

3 Ergebnisse

Die Frage, ob *CAV-1* zu Recht als Kandidaten-Gen für die Entstehung und Progression des Prostata-Karzinoms angesehen wird, wurde einerseits durch Charakterisierung der Expression dieses Gens, seiner Transkripte und seiner Transkriptionsregulation angegangen und andererseits wurde untersucht, ob genomische Varianten des Gens mit einer erhöhten Suszeptibilität für das PCa einhergehen. Die in diesen Untersuchungen gewonnenen starken Hinweise auf die Bedeutung der DNA-Methylierung für die Repression der *CAV-1*-Expression wurden dann abschließend durch Untersuchung der Methylierung des *CAV-1*-Promotors in Prostata-Karzinomen überprüft.

Die meisten der Untersuchungen zur Transkription von *CAV-1* waren auf grundsätzliche Fragen zur Regulation dieses Gens gerichtet und konnten deshalb an Zelllinien durchgeführt werden. Verwendet wurden hierzu sämtliche derzeit verfügbaren, aus der Prostata abgeleiteten Zelllinien: drei dieser Zelllinien (LNCaP, PC-3 und DU-145) stammen aus Metastasen und werden im weiteren Verlauf der Arbeit als Karzinom-Zelllinien bezeichnet. Sie wurden ausgehend von epithelialen Zellen aus Metastasen eines supraclavicularen Lymphknotens (LNCaP), des Skeletts (PC-3) oder des Gehirns (DU-145) etabliert, die von Patienten mit einem Prostata-Karzinom stammten. Als Kontrollen dienten drei aus anscheinend normalem Prostata-Gewebe durch Transformation mit SV40 immortalisierte Zelllinien, nämlich PNT1A, PNT1B und PNT2. Da auch diese Zelllinien einen aberranten Karyotyp und genomische Imbalancen aufweisen, wurden darüber hinaus normale diploide Fibroblasten als Kontrollen verwendet.
Der erste Teil der Untersuchungen umfasste einerseits Transkript-Menge und andererseits die hieraus resultierende Menge an verfügbarem Protein, und zwar differenziert nach den durch unterschiedlichen Transkriptionsstarts determinierten α- und β-Isoformen des *CAV-1*-Gens. In einem zweiten Schritt wurde das für die Transkriptionsregulation wesentliche Promotor-Fragment bestimmt und gezeigt, dass dessen Aktivität durch Methylierung einiger weniger CpG-Dinukleotide reguliert ist, was sich sowohl im Reportergen-Ansatz als auch durch genomische Demethylierung in Zelllinien zeigen ließ. Die methylierungsabhhängige Repression des Gens scheint durch Bindung eines regulatorischen Proteins vermittelt zu sein, das jedoch nicht mit dem bekannten Methyl-CpG-bindenden Faktor MeCP2 identisch ist.

Im Einklang mit diesen funktionellen Untersuchungen an Zelllinien hat die direkte Untersuchung an Prostata-Karzinomen dann auch gezeigt, dass die entsprechenden CpGs im PCa sehr viel häufiger und stärker methyliert sind als im Kontroll-Prostata-Gewebe.

3.1 Wie und wo ist das *CAV-1*-Gen exprimiert?

Die Situation der Expression von *CAV-1* in Tumoren bleibt aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsergebnisse bis heute kontrovers diskutiert.

Verschiedene Forschergruppen lieferten widersprüchliche Daten zur Expression von *CAV-1*, wobei sowohl von Überexpression (81; 211; 212) als auch von verminderter Expression des Gens in diversen Zelllinien und Geweben berichtet wurde (147; 203; 204). Wenig ist bislang über die *CAV-1*-Expression in Zelllinien bekannt, die von Tumoren stammen. Einige Forschergruppen fanden eine Überexpression in ihren Kulturen (191; 212). Im Gegensatz dazu wurde von verminderter *CAV-1*-Expression berichtet, z.B. in humanen Brustkrebs-Zelllinien, wie MCF-7 und T47-D (44) oder in Zelllinien, die von squamösen Zell-Karzinomen der Lunge und der Zervix stammen (149). Dies deutet darauf, dass das Abschalten der *CAV-1*-Expression an der Entwicklung von Tumoren beteiligt sein könnte.

Mit den nachfolgenden Untersuchungen sollte zum einen die Frage geklärt werden, wie die Situation der *CAV-1*-Expression in Zelllinien aussieht, die aus prostatischen Tumoren bzw. aus normalem Prostata-Gewebe etabliert wurden, und zum anderen, ob die Expression für spezifische Isoformen verändert ist. Eine Bestätigung spezifischer Isoformen würde die Fragen nach sich ziehen, ob sich bestimmte Transkripte in Tumor-Zelllinien überrepräsentiert finden oder ob eine gewebe-spezifische Expression beobachtet werden kann.

3.1.1 Das *CAV-1*-Gen weist 2 Transkripte auf

Es gibt zwei *CAV-1*-Isoformen, nämlich *CAV-1α* und *CAV-1β*.

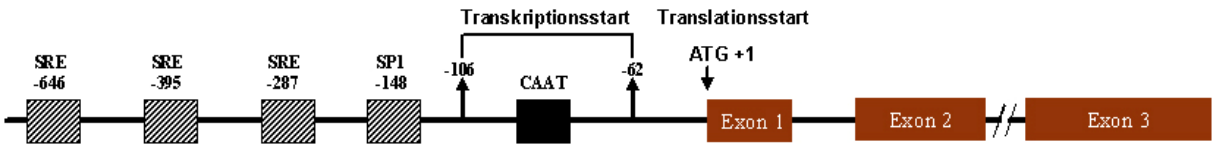


Abb. III-1: Ein Teil des 5´-Promotors sowie Exon 1-3 des humanen *CAV-1*-Gens. Im Promotor befinden sich drei potentielle Sterol Regulatory Elements (SRE), eine CAAT-Box und eine SP1-Konsenus Sequenz. Zwei Transkriptionsstartstellen finden sich an Position -106 und -62 relativ zum Translationsstart 1, der als ATG+1 bezeichnet wird. Modifiziert nach: Bist A *et al.* (11)

Bislang wurde angenommen, dass die beiden humanen Isoformen von einer *CAV-1*-mRNA kodiert werden. Die hier durchgeführte Sequenz-Analyse des *CAV-1*-Gens in den oben genannten Zelllinien führte zunächst zur Entdeckung eines zweiten ATG-Start-Codons in Exon 2. Unabhängige Untersuchungen bestätigten mittlerweile die von mir entdeckten Hinweise auf ein zweites Start-Codon (168). Mittels RT-PCR wurde diese Beobachtung weiter untersucht und es konnte auch ein zweites Transkript gefunden werden. Diese zweite mRNA kodiert offensichtlich die β-Isoform des CAV-1-Proteins. Dies wurde erstmals von unserer Arbeitsgruppe gefunden. Die beiden jeweiligen Primer-Paare amplifizierten ausgehend von cDNA zwei entsprechende Transkripte (Abbildung III-2).

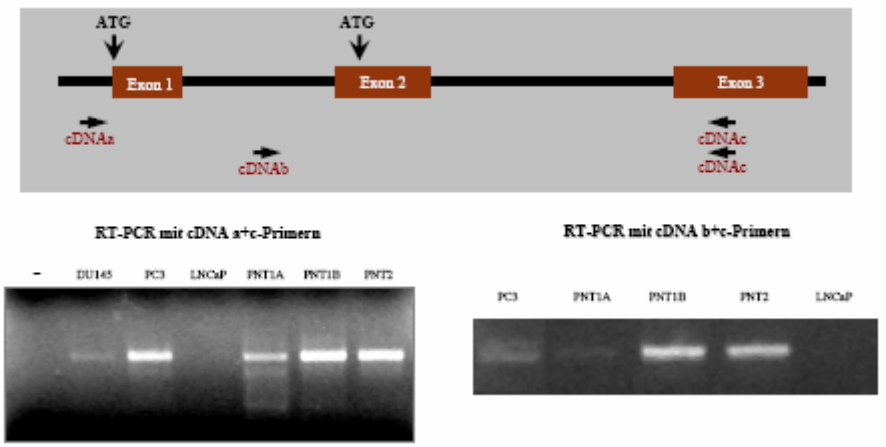


Abb. III-2: Das Gen *CAV-1* weist zwei Transkripte auf. Im oberen Teil der Abbildung ist eine schematische Darstellung des Gens unter Angabe der für diesen Versuch verwendeten Primer wiedergegeben. Dabei amplifizierte das Paar cDNAa+c das größere α-Transkript und die Primer cDNAb+c die kleinere β-Isoform des Gens. Die unteren beiden Abbildungen zeigen RT-PCRs zum Beweis der Existenz dieser Transkripte. In allen Zelllinien mit Ausnahme von LNCaP werden sowohl die α- als auch die β-Isoform des *CAV-1*-Gens exprimiert. Die Expressionsstärke variierte zwischen den einzelnen Linien, wobei das *CAV-1*β-Transkript in allen Kulturen deutlich geringer vorhanden war.

Das zweite Start-Codon in Exon 2 des Gens kodiert die *CAV-1*β-Isoform, die um 31 AS kürzer als das α-Transkript ist und die gleiche Expression in den untersuchten Zellen zeigte (s.u.). Die α-Isoform von *CAV-1* wurde durch das Primer-Paar cDNAa+c amplifiziert, während Primer cDNAb in Kombination mit cDNAc das kleinere *CAV-1*β-Transkript nachwies. In fast allen Zelllinien wurden sowohl die α- als auch die β-Isoform des *CAV-1*-Gens exprimiert. Nur LNCaP exprimierte keines der beiden Transkripte. Die Expressionsstärke variierte zwischen den einzelnen Linien, wobei das *CAV-1*β-Transkript in allen PCa-Linien in deutlich geringerer Menge vorhanden war. Dennoch konnten diese beiden Isoformen (*CAV*-1α und -β) die widersprüchlichen Aussagen zur Expression nicht auflösen.

Beide *CAV-1*-Isoformen wurden in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert, um die Auswirkungen der Überexpression beider Proteine nach Transfektion in PCa-Zelllinien zu untersuchen. In diesem Zusammenhang konnte ich zeigen, dass die beiden humanen

Isoformen nicht wie bislang angenommen von einer mRNA, sondern von zwei Transkripten kodiert werden. Das bedeutet, dass es offenbar eine zweite mRNA gibt, die die β-Isoform des Proteins kodiert. Dabei liegt der zweite Promotor vermutlich in Intron 1, da die β-Isoform nicht durch alternierende Nutzung eines weiteren ATGs in Exon 2 ausgehend von einer mRNA gebildet wird, sondern durch zweierlei Transkripte. Dies wurde in unabhängigen Experimenten in der Zwischenzeit bestätigt (94). Meine Untersuchungen deckten weitere exprimierte Sequenzen im Intron 1 des Gens auf, was sich im Sinne einer alternativen Spliceform deuten lässt. Der Transkriptionsstart dieser RNA liegt also in Intron 1. Die genaue Position blieb jedoch im Laufe der Arbeit ungeklärt. Vor dem Transkriptionsstart sollte ein für dieses Transkript verantwortlicher Promotor liegen, also ebenfalls in Intron 1. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass *Engelman et al*. (44) eine stärkere Promotor-Aktivität in einem Promotor/Intron 1-Konstrukt als im bekannten Promotor-Konstrukt alleine gefunden haben.

3.1.2 Nachweis der *CAV-1*-Expression in verschiedenen Geweben

Zur allgemeinen Charakterisierung der Expression wurden Northern Blots mit zwei kommerziell erhältlichen Sätzen von RNA-Präparationen durchgeführt. Die Analyse der Verteilung der Expression in verschiedenen Geweben erfolgte mittels hybridisierungsfertigem Human MTN Blot H/H_2 (Clontech), der 16 verschiedene humane Gewebe repräsentiert. Das Auftreten und die Veränderung der Expression während der Embryonalentwicklung in der Maus wurde mit dem Mouse Embryo MTN Blot (Clontech) untersucht.

Die Hybridisierung der Human MTN Blot H/H_2-Filter mit der *CAV-1α*-Sonde lieferte das in Abbildung III-3 dargestellte Expressionsmuster.

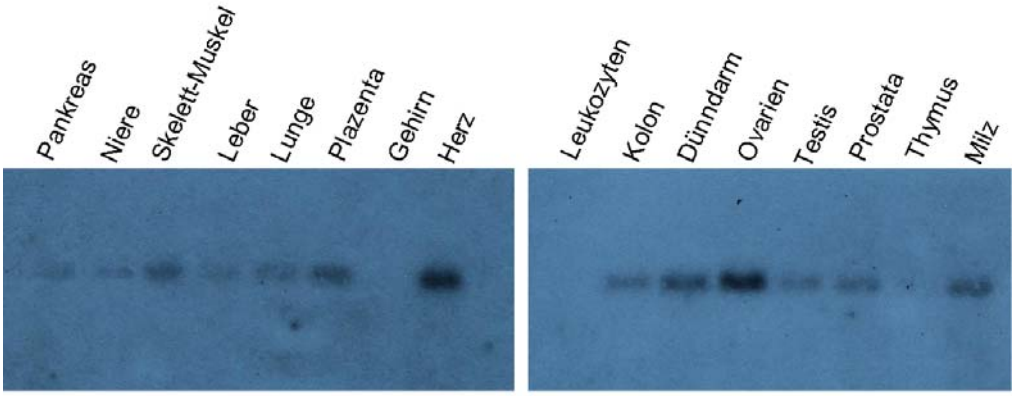


Abb. III-3: Northern Blot-Hybridisierung der *CAV-1α*-mRNA. Gewebespezifische Expression der *α*-Isoform auf den Human MTN Blot H/H_2-Filtern mit RNA gesunder Gewebe hybridisiert mit *CAV-1α*-Sonde. Diese Isoform des *CAV-1*-Gens wird stark in Herz und Ovarien exprimiert, wobei sie in allen anderen Geweben ebenfalls exprimiert gefunden wird. Eine Ausnahme stellen nur Gehirn und Leukozyten dar. In diesen Geweben konnte *CAV-1α* nicht detektiert werden. Die Dauer der Exposition des Röntgenfilms betrug 25h.

Der Northern Blot lieferte den Nachweis, dass die α-Isoform von *CAV-1* gewebespezifisch exprimiert ist. So findet man in Herz und Ovarien eine starke und in den anderen Geweben eine deutlich schwächere Expression, wohingegen in Gehirn und peripheren Blut-Leukozyten *CAV-1α* nicht exprimiert wird.

Den Nachweis der *CAV-1β*-Isoform in den oben genannten Geweben zeigt die folgende Abbildung.

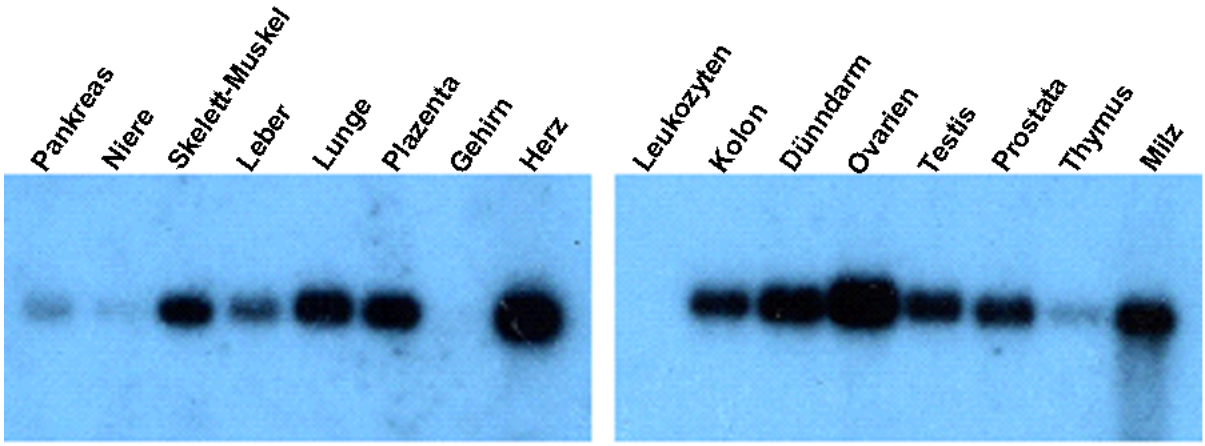


Abb. III-4: Northern Blot Hybridisierung der *CAV-1β*-mRNA. Hybridisierung der *β*-spezifischen Sonde auf Filter mit 16 gesunden humanen Geweben. Das Expressionsmuster der *β*-Isoform unterscheidet sich nicht von dem der *α*-Isoform. Sehr starke Expression zeigen Herz und Ovarien, während sie nur schwach in Pankreas, Niere und Thymus ist. Ebenso wie *CAV-1α* wird *CAV-1β* im Gehirn und peripheren Leukozyten nicht exprimiert. Die Expositionsdauer des Films lag bei 27h.

Das Expressionsmuster der *β*-Isoform unterscheidet sich nicht von dem von *CAV-1α*. Besonders starke Expression von *CAV-1β* zeigten Herz, Dünndarm, Ovarien und Milz. Eine deutliche Expression konnte in Skelett-Muskeln, Lunge, Plazenta, Kolon, Testis und Prostata

detektiert werden, während Pankreas, Niere, Leber und Thymus *CAV-1β* nur schwach exprimieren.

Beide Transkript-Formen des *CAV-1*-Gens zeigen die gleiche Gewebe-Verteilung und sind in allen Geweben, die untersucht wurden, einschließlich Skelett-Muskeln, Lunge, Plazenta, Herz, Kolon, Dünndarm, Ovarien, Testis, Prostata und Milz in unterschiedlichen Mengen nachweisbar. Am schwächsten ist die Expression beider Transkripte in Pankreas, Niere, Leber und Thymus. Genau wie die α-Isoform ist *CAV-1β* in peripheren Leukozyten und im Gehirn nicht exprimiert.

Insgesamt konnten keine Unterschiede in der Gewebeverteilung der beiden *CAV-1*-mRNAs festgestellt werden. Beim Vergleich der einzelnen Gewebe konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Stärke der Expression der Isoformen festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den Gewebefiltern, die zeigten, dass keine der beiden Isoformen in peripheren Blut-Leukozyten exprimiert ist, führte eine RT-PCR, die an aus frischem Blut isolierter DNA durchgeführt wurde, zu einem deutlich erkennbaren Signal. Wie Abbildung III-5 zeigt, ließen sich mit dieser sensitiven Methode beide Isoformen von *CAV-1* im Blut eindeutig nachweisen.

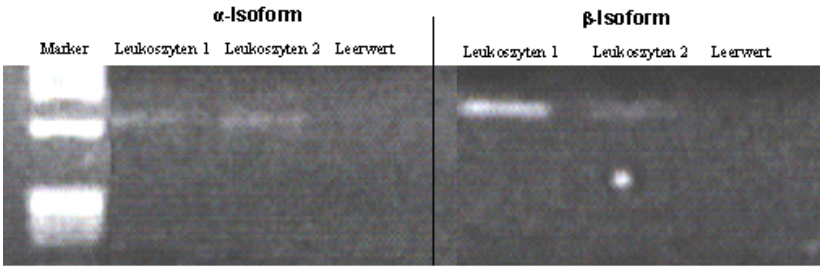


Abb. III-5: RT-PCR an DNA aus Blut mit Isoformen-spezifischen Primern. Beide Isoformen sind schwach im Blut exprimiert. Links: RT-PCR mit Primern, die spezifisch für die α-Isoform sind. Rechts: RT-PCR mit Primern, die spezifisch *CAV-1β* amplifizieren.

Zusammenfassend geben diese Ergebnisse keinen Hinweis auf unterschiedliche Funktionen der beiden *CAV-1*-Transkripte.

Eine Expressionsanalyse mit dem Mouse Embryo MTN Blot sollte die Expression des *CAV-1*-Gens zu verschiedenen Zeitpunkten in der frühen Maus-Entwicklung aufdecken. Auf diesem MTN Blot sind RNAs von Maus-Embryonen gespottet, die am Tag 7, 11, 15 und 17 isoliert wurden.

Die Northern Hybridisierung erfolgte mit spezifischen Sonden gegen die murinen *cav-1*-Isoformen, die aus Maus-cDNA synthetisiert wurden. Die Expression ist am frühest verfügbaren Zeitpunkt (Tag 7) am stärksten und nimmt bereits an Tag 11 ab. In den späteren Stadien (Tag 15, 17) ist keine Expression mehr nachweisbar. Das gleiche Expressionsmuster zeigte auch das β-Transkript. Da der Nachweis der Expression in verschiedenen adulten

Geweben für das humane *CAV-1* bereits erbracht wurde, wurde dieser Frage bei der Maus nicht weiter nachgegangen. Außerdem ist bekannt, dass adulte Mäuse *CAV-1* exprimieren.

3.1.3 *CAV-1*-Expression in LNCaP, DU-145, PC-3, PNT1A, PNT1B und PNT2

Da Untersuchungen zur Expression von *CAV-1* in Prostata-Karzinom-Zellen häufig gegensätzliche Resultate lieferten (147; 212), wurde im Rahmen dieser Arbeit die *CAV-1*-Expression in den humanen Prostata-Karzinom-Zelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3, sowie in Zelllinien, die von gesundem Prostata-Gewebe stammten, PNT1A, PNT1B und PNT2, analysiert, um Hinweise auf ein möglicherweise verändertes Expressionsmuster zwischen den transformierten Zell-Kulturen zu bekommen. Außerdem sollte in den PCa-Kulturen nach Expressionsunterschieden der beiden Isoformen gesucht werden.
Die Methode der Wahl für das Erstellen eines Expressionsprofils war auch in diesem Fall der Northern-Blot. Als Hybridisierungssonden dienten in beiden Fällen RT-PCR-Produkte.

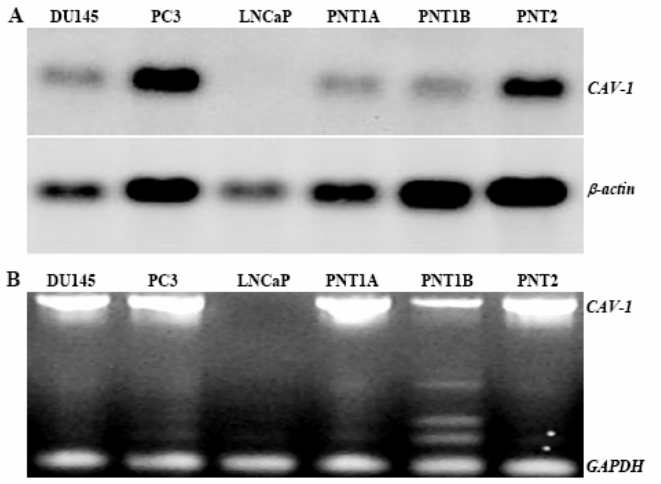


Abb. III-6: *CAV-1*-Expressionsanalyse mittels Northern Blot Hybridisierung an Zell-Kulturen. *A*) Die Northern Blot Analyse zeigt das Fehlen der *CAV-1* mRNA in LNCaP. Während PC-3 und PNT2 große Mengen des Gens exprimieren, wird nur wenig Transkript für PNT1A, PNT1B und DU-145 detektiert. ^{32}P-markierte cDNA diente als Sonde zur Detektion der *CAV-1* mRNA. Als Lade-Kontrolle wurde *β-actin* verwendet. *B*) RT-PCR. Wie der Northern Blot zeigt auch die RT-PCR, dass die Zelllinie LNCaP kein *CAV-1* exprimiert. Hingegen kann eine deutliche Expression bei allen anderen Zelllinien beobachtet werden.

Das mit Hilfe des Northern Blots gewonnene Expressionsprofil der Zelllinien (Abbildung III-6) zeigte einen kompletten Verlust oder nicht-detektierbare niedrige Mengen an *CAV-1*-Transkripten in der Karzinom-Linie LNCaP, wohingegen die Zelllinie PC-3 sehr hohe Mengen an *CAV-1* exprimiert. Auch in der Karzinom-Linie DU-145 konnte *CAV-1*-RNA detektiert werden, wenn auch sehr viel weniger. Das Transkript war ebenfalls in allen drei

Zelllinien nachweisbar, die von normalem Prostata-Gewebe stammten, wobei es am stärksten in PNT2 zu finden war.

Die Northern-Hybridisierung mit der *CAV-1β*-Sonde lieferte für die Zelllinien ein ähnliches Ergebnis wie die Hybridisierung mit der *CAV-1α*-spezifischen Sonde. In der aus Karzinom-Gewebe etablierten Linie PC-3 fanden sich große Mengen an *CAV-1*-Transkript und auch in der von normalem Prostata-Gewebe stammenden PNT2-Zelllinie konnte mehr *CAV-1*-mRNA nachgewiesen werden. Deutliche schwächere Expression zeigten die Karzinom-Zelllinie DU-145, sowie die Prostata-Zell-Kulturen PNT1A und PNT1B. Wiederum nicht nachweisbar war das *CAV-1*-Genprodukt in LNCaP-Zellen.

Mittels semi-quantitativer RT-PCR, die eine höhere Sensitivität erreicht, wurden die Resultate des Northern Blots für die Zelllinien zusätzlich verifiziert. Dabei wurde die aus den Zelllinien extrahierte RNA nach *DNase*I-Behandlung in eine Erst-Strang-cDNA-Synthese eingesetzt, die mit random hexamers durchgeführt wurde. Bei der anschließenden Multiplex-PCR wurden gleichzeitig der ORF des *CAV-1*-Gens und als Kontrolle das house keeping gene *GAPDH* amplifiziert. Auch mit diesem Ansatz wurden ähnliche Ergebnisse wie im Northern Blot erhalten (Abbildung III-6B). Wiederum konnte kein *CAV-1*-Transkript – weder α noch β – in LNCaP nachgewiesen werden, während die *CAV-1*-RNA in allen übrigen Zelllinien in unterschiedlichen Mengen vorhanden ist.

Um zu überprüfen, ob die RT-PCR auch tatsächlich eine Abschätzung der Transkriptionsmenge erlaubt, wurde der Versuch mit cDNA aus LNCaP und steigenden Mengen an DU-145-cDNA in einem multiplex RT-PCR-Ansatz durchgeführt. Dieser Ansatz enthielt sowohl die *CAV-1*-spezifischen als auch die *GAPDH*-Primer als Referenz. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Menge an DU-145-Template die *CAV-1*-Bande an Intensität gewann.

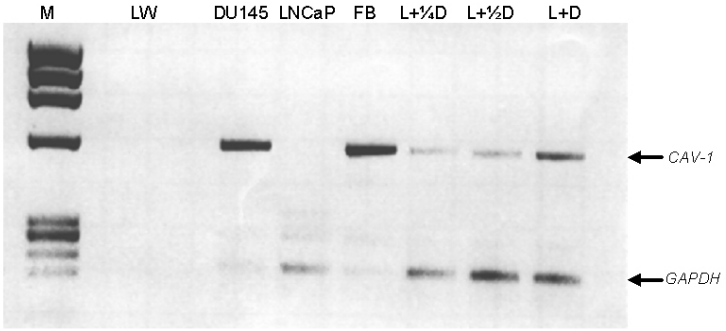


Abb. III-7: Multiplex-RT-PCR-Ansatz mit *GAPDH*- und *CAV-1*-Primern. Deutliche Expression von *CAV-1* in DU-145-Zellen und normalen Fibroblasten (FB) im Vergleich zum kompletten Fehlen in LNCaP. Mit steigender Konzentration an DU-145 cDNA in der PCR nimmt auch die Signal-Intensität der *CAV-1*-Bande zu. *GAPDH* diente als Kontrolle, dass die RT-PCR funktioniert. M=Marker, LW=Leerwert.

Alle Versuchsansätze zeigten ganz deutlich, dass *CAV-1* in der von Lmyphknoten-Metastasen stammenden PCa-Linie LNCaP nicht exprimiert wird. Eine graphische Darstellung der Expressionsdaten der Zelllinien gibt Abbildung III-8 wieder, in der das Verhältnis von *CAV-1*-RNA gegen *β-actin* RNA als Intensität der Banden aus den Northern-Autoradiogrammen aufgetragen ist.

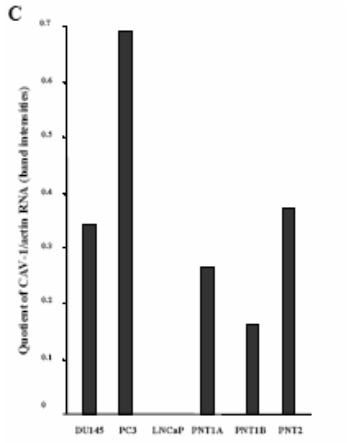


Abb. III-8: Das Diagramm zeigt für die untersuchten Zelllinien das Verhältnis der *CAV-1*-RNA im Vergleich zur *β-actin*-RNA. Die deutlich stärkste Expression zeigen dabei PC-3, während sowohl die Karzinom-Linie DU-145 als auch die von normalem Prostata-Gewebe stammenden Linien PNT1A, PNT1B und PNT2 eine nur etwa halb so starke Expression aufweisen. Für LNCaP konnte keine *CAV-1*-Transkription nachgewiesen werden.

In der PCa-Zelllinie PC-3 findet sich eine starke Expression der *CAV-1*-mRNA, während DU-145-Zellen das Gen nur etwa halb so stark exprimieren. Eine deutlich geringere Expression zeigen die von normalem Gewebe stammenden Linien PNT1A, PNT1B und PNT2, wobei letztere mehr *CAV-1* exprimiert als die Tumor-Zelllinie DU-145. In LNCaP-Zellen konnten weder im Northern Blot noch mittels semi-quantitativer RT-PCR *CAV-1*-Transkripte detektiert werden.

3.1.4 Expressionsanalyse des CAV-1-Proteins

Um zu überprüfen, ob CAV-1 auch auf Protein-Ebene in den im Northern Blot untersuchten Zelllinien exprimiert wird, wurde durch den Western Blot die beiden Isoformen CAV-1α und -β nachgewiesen. Für dieses Experiment wurden die beiden spezifisch gegen die Isoformen gerichteten Antikörper C37120 (α-Isoform) bzw. C43420 (β-Isoform) verwendet. Der Blot ist in Abbildung III-9 gezeigt.

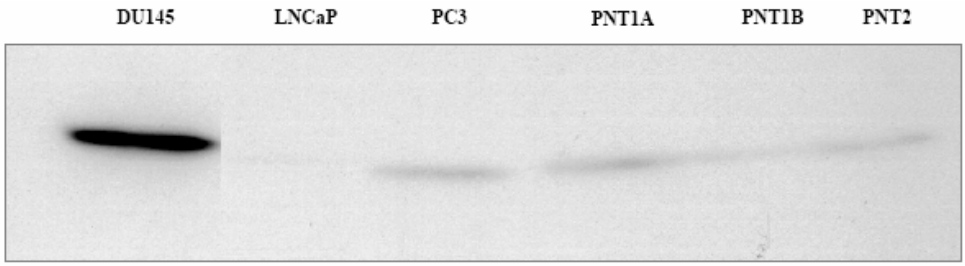


Abb. III-9: Nachweis der Expression von CAV-1α mittels Western Blot in Zelllinien. Der Antikörper C37120 detektiert die α-Isoform des Proteins. CAV-1α ist mit Ausnahme von LNCaP in allen untersuchten Zelllinien exprimiert. Auch hier zeigt sich wie in den Northern Blots, dass auch das Protein zwischen den Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert wird.

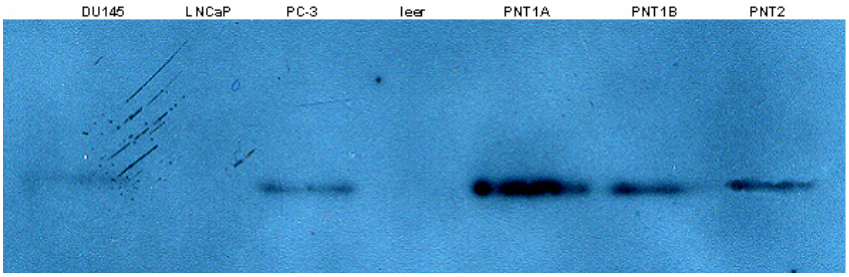


Abb. III-10: Western Blot zum Nachweis der Expression von CAV-1β in den PCa-Zelllinien. Die Detektion des Proteins erfolgte durch den β-Isoform spezifischen Antikörper C43420. Alle untersuchten Zelllinien mit Ausnahme von LNCaP exprimieren die **β**-Isoform des CAV-1-Proteins.

In fast allen Zelllinien konnte sowohl die α-Isoform (Abbildung III-9) als auch die β-Isoform (Abbildung III-10) nachgewiesen werden. Die Ausnahme stellte, wie zu erwarten, nur die Zelllinie LNCaP dar, bei der keine der beiden Isoformen durch spezifische Antikörper im Western Blot detektiert werden konnte. Bei DU-145 war ein signifikanter Unterschied in der Translationsstärke von CAV-1α im Vergleich zur β-Isoform zu beobachten, während die Verhältnisse für PNT1A genau umgekehrt lagen.

Zusammenfassend konnten keine Expressionsunterschiede zwischen den hier untersuchten Geweben und in den PCa-Zelllinien festgestellt werden. Nur in peripheren Leukozyten und im Gehirn war keine Expression der Isoformen nachweisbar. Die Ausnahme unter den Zelllinien bildete LNCaP, für die weder *CAV-1*-Transkription noch das Protein nachgewiesen werden konnte. Trotz der hier gefundenen gewebespezifischen Expression ergibt sich kein Hinweis auf eine spezifische Funktion.

3.2 Ist der *CAV-1*-Promoter methyliert?

Vom *CAV-1*-Promotor war bekannt, dass er insgesamt 924 bp umfasst, drei GC-reiche SREs (sterol regulatory elements), eine CAAT-Sequenz und eine Sp1-Konsensus-Sequenz (11) besitzt. Die relevante Promotor-Region war von *Engelman et al*. in zwei Brust-Krebs-Zell-

linien definiert worden, in denen die fehlende Expression durch Methylierung zu erklären war (44). Dieser 5´-Promotor-Bereich umfasst 356 bp, hat einen GC-Gehalt von 40.2% und ein CpG/GpC-Verhältnis von 0.875. Innerhalb dieser Sequenz gibt es sieben CpG-Dinukleotide. Diese sind upstream des Translationsstarts zwischen Position –881 und –518 gelegen. Aufgrund von zwei alternativen Transkriptionsstarts für die α- und β-Isoform von *CAV-1*, wurde der 5´ lokalisierte Translationsstart ATG als +1 bezeichnet, da von diesem ATG die Transkription der größeren α-Isoform initiiert wird. Die sieben potentiellen Methylierungsstellen waren Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

3.2.1 Das Methylierungsmuster des *CAV-1*-Promotors in PCa-Zelllinien

Im Anschluss an die Expressionsanalysen sollte überprüft werden, ob, und wenn ja, in welchem Ausmaß eine DNA-Methylierung mit der *CAV-1*-Gen-Expression korreliert, und ob sich eine Methylierung der sieben distalen CpGs in der 5´-Region des *CAV-1*-Promotors funktionell auswirkt.

Für die Bestimmung des Methylierungsprofils der Zelllinien musste genomische DNA zunächst mittels Bisulfit-Behandlung konvertiert werden. Dabei werden alle unmethylierten Cytosine in Uracil konvertiert, während methylierte Cytosine von dieser Modifikation unberührt bleiben.

Die Bisulfit-Konversion wurde an DNA von diploiden humanen Fibroblasten, an HeLa-Zellen, sowie an den PCa-Zelllinien durchgeführt. Nach erfolgter Bisulfit-Behandlung und PCR-Amplifikation wurden die Promotor-Fragmente mit Primern amplifiziert, die für BS-behandelte DNA konzipiert und optimiert wurden, schließlich kloniert und sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierungen ist in den nachfolgenden Abbildungen und Tabellen zusammengefasst.

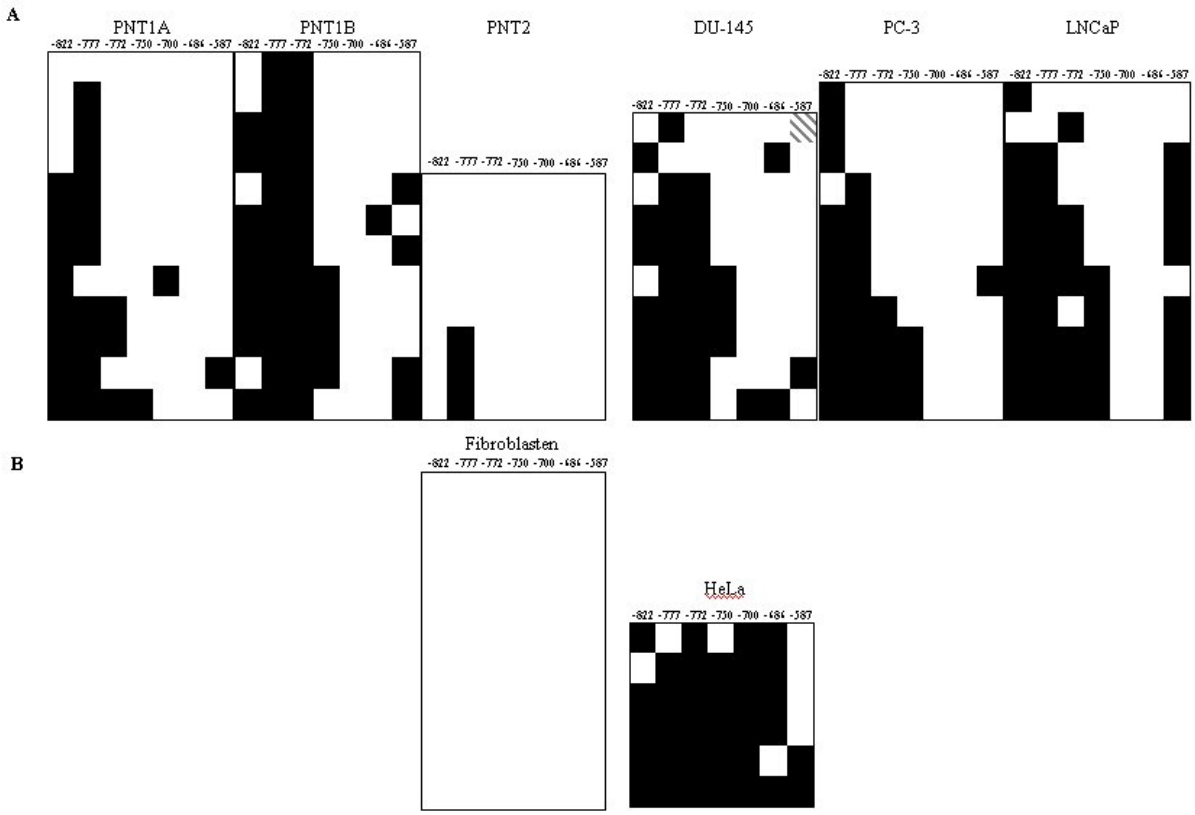


Abb. III-11: Methylierungsprofil der sieben CpGs im *CAV-1*-Promoter in Zelllinien nach Bisulfit-Behandlung. A) Promotor-Methylierung der PCa-Zelllinien. Während die CpGs an den Positionen –750, –700 und –686 geringe Methylierung aufweisen, ist das Cytosin an Position –587 bei LNCaP-Klonen deutlich stärker methyliert. Eine allgemeine Methylierung zeigen die ersten drei CpGs in allen Zelllinien mit Ausnahme von PNT2. B) Der *CAV-1*-Promotor von Fibroblasten ist zu 100% nicht methyliert. HeLa hingegen weist eine nahezu vollständige Methylierung aller CpGs in dieser Region auf, wobei das CpG an Position -587 eine Ausnahme darstellt. Die schwarzen Quadrate stehen für Methylierung, die weißen repräsentieren unmethylierte Dinukleotide. Die Spalten geben die Anzahl der untersuchten Klone wieder.

Die PCa-Zelllinien zeigen eine deutliche Methylierung der CpGs an den Positionen –822, –777 und –772. Die Methylierung sinkt ab Position –750. Die drei proximalen Dinukleotide (–750, –700 und –686) zeigten in allen Zelllinien nur selten Methylierung. Auch das Dinukleotid bei –587 zeigte nur in LNCaP eine höhere Methylierung im Vergleich zu den anderen Zelllinien, die *CAV-1* exprimieren, was auf eine Rolle dieses CpGs bei der Repression der *CAV-1*-Expression hindeuten könnte.

Betrachtet man normale diploide Fibroblasten, stellt man fest, dass keines der sieben im Promotor gelegenen CpGs Methylierung aufweist. Im Gegensatz dazu ist die Karzinom-Zelllinie HeLa nahezu vollständig an sechs der sieben hier untersuchten CpGs des *CAV-1*-Promotors methyliert. Auffälligerweise findet sich an Position -587 nur sehr schwache Methylierung.

Dies ist umso bemerkenswerter als eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR zeigte, dass HeLa-Zellen *CAV-1* exprimieren. Dieses CpG-Dinukleotid dürfte für die Repression der Expression des *CAV-1*-Gens verantwortlich gemacht werden.

Tabelle III-1: Methylierungsgrad der Zelllinien in Prozent an den jeweiligen CpG-Dinukleotiden nach Bisulfit-Konversion

CpG-Position	∑Klone	-822	-777	-772	-750	-700	-686	-587	ØMethylierung*
Fibroblasten	11	**0** (0/11)#	**0** (0/11)	**0** (0/11)	**0** (0/11)	**0** (0/11)	**0** (0/11)	**0** (0/11)	**0**
PNT1A	12	**67** (8/12)	**83** (10/12)	**25** (3/12)	**8** (1/12)	**8** (1/12)	**0** (0/12)	**8** (1/12)	**29**
PNT1B	12	**67** (8/12)	**100** (12/12)	**100** (12/12)	**33** (4/12)	**0** (0/12)	**8** (1/12)	33 (4/12)	**49**
PNT2	9	**0** (0/9)	**44** (4/9)	**0** (0/9)	**0** (0/9)	**0** (0/9)	**0** (0/9)	**0** (0/9)	**6**
DU-145	9	**78** (7/9)	**89** (8/9)	**89** (8/9)	**33** (3/9)	**11** (1/9)	**22** (2/9)	**11** (1/9)	**48**
PC-3	11	**91** (10/11)	**73** (8/11)	**36** (4/11)	**27** (3/11)	**0** (0/11)	**0** (0/11)	**9** (1/11)	**34**
LNCaP	11	**91** (10/11)	**82** (9/11)	**64** (7/11)	**45** (5/11)	**0** (0/11)	**0** (0/11)	**73** (8/11)	**51**
Hela	6	**83** (5/6)	**83** (5/6)	**100** (6/6)	**83** (5/6)	**100** (6/6)	**83** (5/6)	**33** (2/6)	**81**

* Durchschnittliche Gesamt-Methylierung aller CpGs der jeweiligen Zelllinie in Prozent
\# (Anzahl methlierter CpGs/Gesamt-Zahl untersuchter Klone)

Tabelle III-1 stellt die Methylierung der einzelnen Zelllinien in Prozent dar. Die Zelllinie, die die stärkste Gesamt-Methylierung des *CAV-1*-Promotors aufweist, ist mit 81% HeLa. Die CpGs von LNCaP, die *CAV-1* nicht exprimieren, sind zu 51% methyliert, gefolgt von PNT1B (49%), DU-145 (48%), PC-3 (34%) und PNT1A mit 29%. Die geringste Methylierung wurde bei PNT2 mit 6% festgestellt, während der *CAV-1*-Promotor in Fibroblasten nicht methyliert ist.

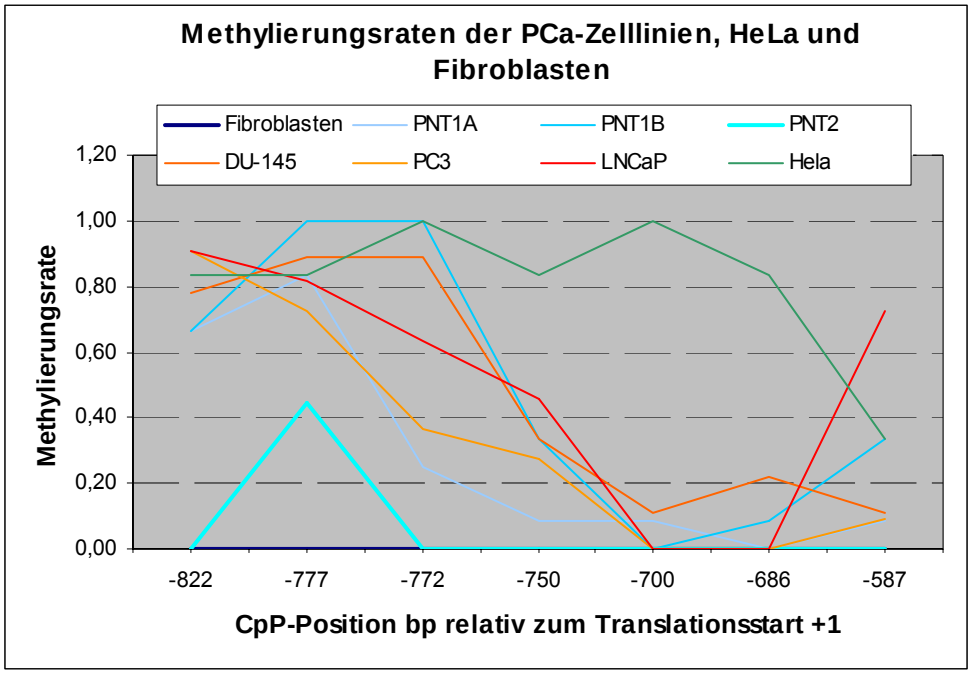


Abb. III-12: Methylierungsindex der untersuchten Zelllinien. Ein Methylierungsindex gibt den jeweiligen Prozentsatz an Methylierung an den sieben CpG-Positionen im Promotor wieder. Ein Methylierungsindex von 1 entspricht 100% Methylierung am entsprechenden CpG. Linien mit Rot-Abstufung stellen die Karzinom-Zelllinien dar, während Blau-Abstufungen die von normalem Gewebe abgeleiteten Prostata-Linien kennzeichnen. HeLa und Fibroblasten sind in Grün dargestellt.

Die Ergebnisse sind als Methylierungsindex für die jeweiligen Zelllinien in Abbildung III-12 zusammengefasst. In normalen diploiden Fibroblasten wurde keine Methylierung der sieben Promotor-CpGs gefunden. Alle hier untersuchten Zelllinien zeigen eine relativ hohe Methylierungsrate der ersten vier Dinukleotide.

Korreliert man nun die Expressionsdaten der Prostata-Zelllinien mit den Daten, die sich aus der Bisulfit-Sequenzierung ergeben, stellt sich die Frage, ob je höher der Grad an Gesamt-Methylierung des *CAV-1*-Promotors desto niedriger der Expressionslevel ist. LNCaP zeigen mit 51% den höchsten Grad an Promotor-Methylierung und exprimieren kein *CAV-1*-Transkript. Mit 49% haben PNT1B die zweithöchste Methylierungsdichte und exprimieren die geringste Menge an *CAV-1*, während DU-145 mit 45% Methylierung einen deutlich höheren Expressionslevel besitzen. Allerdings exprimieren PC-3-Zellen von den hier untersuchten Zelllinien *CAV-1* am stärksten, obwohl ihre Methylierung immer noch bei 34% liegt. Und auch PNT1A exprimieren z.B. im Vergleich mit DU-145 trotz einer nur 29%igen Methylierung nicht deutlich mehr als ihre Vergleichszellen. Auch PNT2, deren *CAV-1*-Promotor nur zu 6% methyliert ist, zeigen nicht den höchsten Expressionslevel. Diese mangelnde Korrelation zwischen Methylierungsgrad und Stärke der Expression dürfte deshalb eher auf einen Methylierungseffekt, der spezifisch für eine CpG-Position ist, zurückzuführen sein als auf den Grad der Methylierung.

3.2.2 Das Methylierungsprofil des *CAV-1*-Promotors im Vergleich von Tumor- vs. Normal-Gewebe

Bei Zelllinien handelt es sich letztendlich um ein artifizielles System, in dem sich die *in vivo* Situation bestimmter Parameter wie Diploidie, Chromosomenanzahl, aber auch die globale und spezifische Methylierung aufgrund der Immortalisierung und Kultivierung verändern. Da eine solche Untersuchung somit nur einen groben Anhaltspunkt liefert, wurde das Methylierungsprofil zusätzlich an frischem Tumor- vs. Normal-Gewebe untersucht. Dazu wurde DNA aus Cryoschnitten von 7 Prostata-Tumoren sowie dem entsprechenden gesunden Normal-Gewebe isoliert, eine Bisulfit-vermittelte Konversion aller CpG-Dinukleotide durchgeführt und die Amplifikate kloniert. Insgesamt wurden von sieben Patienten 72 Klone aus Tumor- und 71 Klone aus gesunden Prostata-Arealen mittels Sequenzierung analysiert.

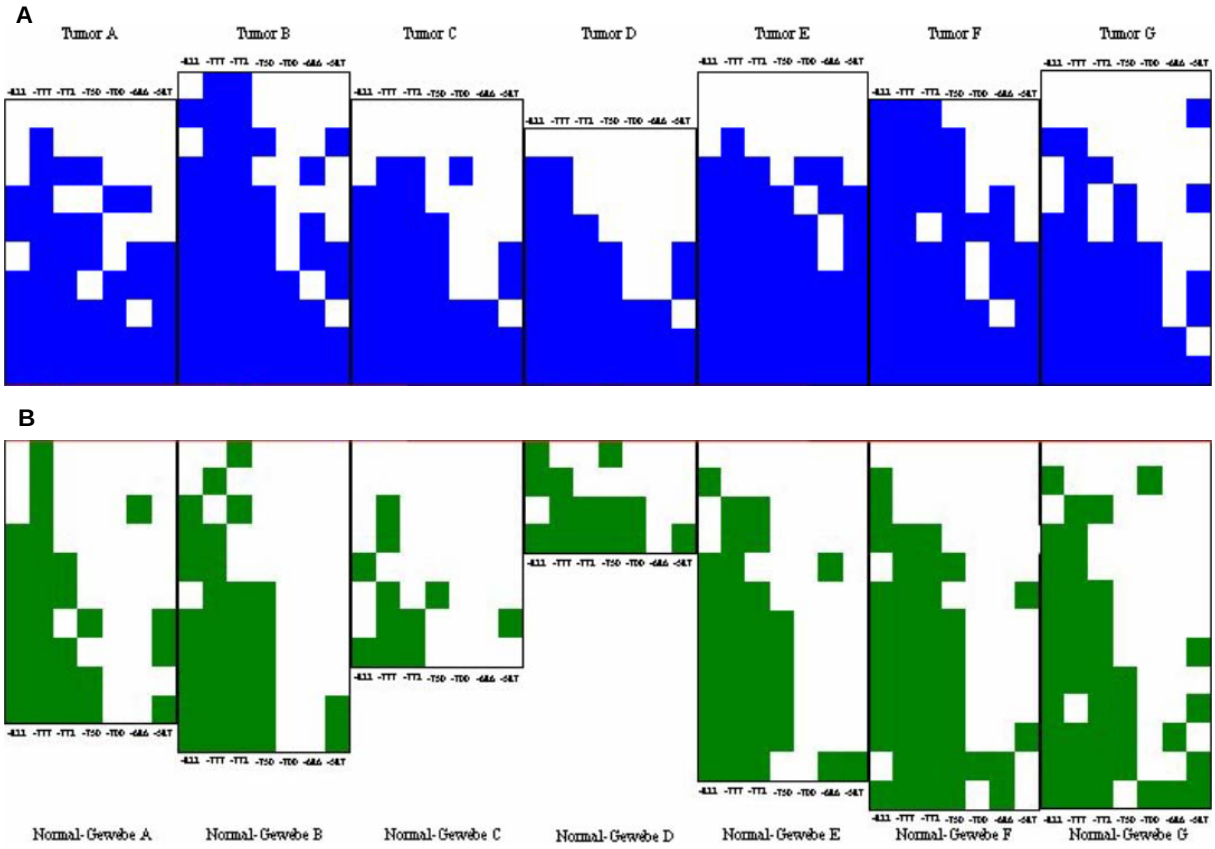


Abb. III-13: Methylierung der sieben CpG-Stellen im Promotor des *CAV-1*-Gens in Prostata-Tumoren vs. prostatischem Normal-Gewebe. Genomische DNA aus Cryoschnitten wurde mit Bisulfit behandelt, um nicht-methylierte Cytosine (C) chemisch so zu modifizieren, dass sie nach PCR und Sequenzierung als Thymidine (t) erscheinen. Methylierte Cytosine sind gegen diese Modifikation geschützt und verbleiben als Cytosine. Dargestellt ist das Methylierungsprofil von sieben jeweils zusammengehörigen Tumor/Normal-Gewebe-Paaren. A) Methylierung des relevanten Cytosins ist in Prostata-Tumoren blau und B) in prostatischem Normal-Gewebe grün dargestellt. Weiße Felder bedeuten keine Methylierung an der betreffenden Stelle. Die Anzahl der Quadrate gibt die Anzahl der untersuchten Klone wieder.

Wie Abbildung III-13 zeigt, ist gesundes Gewebe im Schnitt geringer methyliert als das entsprechende Tumor-Gewebe. Diese Situation wird noch deutlicher, wenn man den Methylierungsgrad der drei 3´gelegenen CpG-Dinukleotide betrachtet. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Methylierung zwischen Tumor und gesunder Prostata. Im Normal-Gewebe tritt an dieser Stelle nur sehr selten Methylierung im Vergleich zum Tumor auf. Die drei proximalen CpGs waren im Tumor im Schnitt zu 45% methyliert, während die Methylierung im Vergleichsgewebe bei 13% lag. Eine detaillierte Übersicht gibt Tabelle III-2.

Tabelle III-2: Anzahl methylierter Klone an den einzelnen CpG-Stellen im Vergleich von Tumor zu Normal-Gewebe nach Prostatektomie

CpG-Position	∑Klone	-822	-777	-772	-750	-700	-686	-587
Tumor A	**10**	**60*** **(6/10)#**	**90** **(9/10)**	**70** **(7/10)**	**60** **(6/10)**	**50** **(5/10)**	**50** **(5/10)**	**50** **(5/10)**
Normal A	*10*	*70 (7/10)*	*100 (10/10)*	*50 (5/10)*	*30 (3/10)*	*0 (0/0)*	*10 (1/10)*	*30 (3/10)*
Tumor B	**11**	**82** (6/11)	**100** (11/11)	**100** (11/11)	**73** (8/11)	**36** (4/11)	**55** (6/11)	**45** (5/11)
Normal B	*11*	*73 (8/11)*	*82 (9/11)*	*73 (8/11)*	*55 (6/11)*	*0 (0/11)*	*0 (0/11)*	*18 (2/11)*
Tumor C	**10**	**70** **(7/10)**	**80** **(8/10)**	**80** **(8/10)**	**60** **(6/10)**	**40** **(4/10)**	**30** **(3/10)**	**40** **(4/10)**
Normal C	*8*	*25 (2/8)*	*63 (5/8)*	*25 (2/8)*	*13 (1/8)*	*0 (0/8)*	*0 (0/8)*	*13 (1/8)*
Tumor D	**9**	**89** **(8/9)**	**89** **(8/9)**	**67** **(6/9)**	**56** **(5/9)**	**33** **(3/9)**	**33** **(3/9)**	**44** **(4/9)**
Normal D	*4*	*75 (3/4)*	*75 (3/4)*	*50 (2/4)*	*75 (3/4)*	*50 (2/4)*	*0 (0/4)*	*25 (1/4)*
Tumor E	**11**	**73** **(8/11)**	**82** **(9/11)**	**73** **(8/11)**	**64** **(7/11)**	**64** **(7/11)**	**55** **(6/11)**	**64** **(7/11)**
Normal E	*12*	*75 (9/12)*	*83 (10/12)*	*75 (9/12)*	*42 (5/12)*	*0 (0/12)*	*17 (2/12)*	*8 (1/12)*
Tumor F	**10**	**100** **(10/10)**	**100** **(10/10)**	**90** **(9/10)**	**90** **(9/10)**	**40** **(4/10)**	**60** **(6/10)**	**50** **(5/10)**
Normal F	*13*	*77 (10/13)*	*77 (10/13)*	*77 (10/13)*	*62 (8/13)*	*8 (1/13)*	*15 (2/13)*	*15 (2/13)*
Tumor G	**11**	**64** **(7/11)**	**82** **(9/11)**	**55** **(6/11)**	**64** **(7/11)**	**45** **(5/11)**	**18** **(2/11)**	**45** **(5/11)**
Normal G	13	*85 (11/13)*	*77 (10/13)*	*69 (9/13)*	*31 (4/13)*	*15 82713)*	*15 (2/13)*	*31 (4/13)*

Fett markiert ist jeweils Tumor-Gewebe, während *kursive* Markierung das entsprechende Normal-Gewebe kennzeichnet
***** Prozent Methylierung
# (Anzahl methlierter CpGs/Gesamt-Zahl untersuchter Klone)

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass an den drei proximalen CpG-Dinukleotiden im Tumor deutlich stärkere Methylierung zu finden ist als im entsprechenden Normal-Gewebe, während die Unterschiede in der Methylierung an vier 5´-gelegenen CpGs zwischen beiden Geweben nicht so deutlich ist. Vergleicht man Tumor-Gewebe mit Normal-Gewebe zeigte sich, dass das letzte CpG im Tumor deutlich stärker methyliert ist als im Normal-Gewebe.

3.2.3 Experimentelle Methylierung des *CAV-1*-Promotors reprimiert die Transkription *in vitro*

Die Bedeutung des Effekts der CpG-Methylierung für die Funktion des *CAV-1*-Promotors wurde weiterhin in einem Reportergen-Ansatz untersucht. Es wurden Expressionsvektoren generiert, die das Reportergen *Luciferase* (*luc*) unter die Kontrolle des 356 bp-Promotors bzw. von Kontroll-Fragmenten stellten. Wie Abbildung III-14 zeigt, trugen die Konstrukte das distale 356 bp-Promotor-Fragment, das vor das *luc*-Gen kloniert wurde.

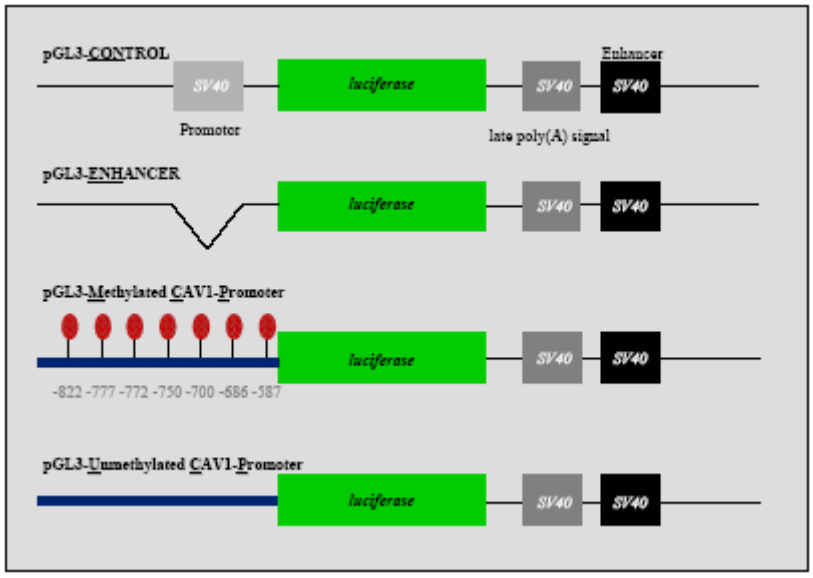


Abb. III-14: Schematische Darstellung der *CAV-1-luc*-Konstrukte. Diese wurden zur Bestimmung der *CAV-1*-Promotor-Aktivität im Luciferase-Assay eingesetzt. Als Kontrolle wurde der Vektor pGL3-CON verwendet, der einen funktionellen *SV40*-Promotor vor dem *luc*-Gen besitzt, während die Negativ-Kontrolle pGL3-ENH keinen Promotor hat. Vor das Reportergen wurde das unmethylierte PCR-Produkt des *CAV-1*-Promotors kloniert. Dieser Vektor wurde pGL3-UCP genannt. Beim Vektor pGL3-MCP wurde das Promotor-Fragment unmittelbar vor dem Klonierungsschritt mit der Methylase *Sss*I inkubiert, um alle CpG-Stellen innerhalb des zu testenden *CAV-1*-Promotors zu methylieren. Alle Vektoren besitzen außerdem ein *SV40*-Poly(A)-Signal gefolgt von einem *SV40*-Enhancer, um die Expression der jeweiligen Promotoren zu verstärken.

Der pGL3-CON-Vektor diente als Positiv-Kontrolle, da dieser Vektor einen eigenen Promotor besitzt. Der promotor-lose Vektor pGL3-ENH wurde als Negativ-Kontrolle verwendet, die zeigen sollte, dass die Expression von pGL3-UCP und -MCP auch tatsächlich unter der Kontrolle des *CAV-1*-Promotors stand.

In den Expressionsvektor pGL3-UCP wurde das mittels PCR amplifizierte Promotor-Fragment ohne zusätzliche Modifikationen kloniert, während das PCR-Produkt des Vektors pGL3-MCP vor der Klonierung Methylase *Sss*I behandelt wurde. Dadurch entstand ein methylierter Promotor. Der Luciferase-Assay mit mock-methyliertem pGL3-Konstrukt (d.h. Methylierung in Abwesenheit von S-Adenosyl-Methionin als Methyl-Donor) wurde als zusätzliche Positiv-Kontrolle durchgeführt. Die Methylierung des ganzen pGL3-Vektors nach dem Klonieren des unmethylierten PCR-Produkts diente als weitere Negativ-Kontrolle. Mit diesen Expressionsvektoren wurden PC-3-Zellen transient transfiziert.

Die relative *luc*-Aktivität der Kontrollen und der Vektoren, die den unmethylierten und methylierten *CAV-1*-Promotor tragen, sind in Abbildung III-16 dargestellt. Der Schein-methylierte Vektor (Daten nicht gezeigt) zeigte eine *luc*-Aktivität wie der pGL-CON-Vektor. Die Methylierung des ganzen pGL3-UCP-Vektors verhinderte vollständig die Expression der Luciferase.

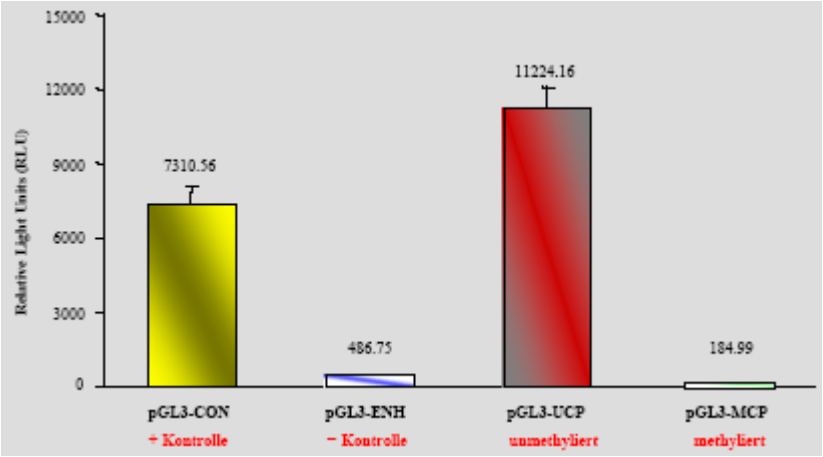


Abb. III-15: *Luc*-Aktivität der pGL3-Konstrukte im *luc*-Reportergen-Assay. pGL3-CON war dabei die Positiv-Kontrolle, bei der das *luc*-Gen unter der Kontrolle des starken *SV40*-Promotors steht, und pGL3-ENH die Negativ-Kontrolle, der ein funktioneller Promotor fehlt. Der Vektor pGL3-MCP unter Kontrolle des methylierten *CAV-1*-Promotors diente der Überprüfung der Effekte der Cytosin-Methylierung auf die *luc*-Transkription. Dieser Vektor lieferte eine Hintergrund-*luc*-Aktivität. Der Expressionsvektor pGL3-UCP, der den komplett unmethylierten *CAV-1*-Promotor enthielt, hatte eine 1.5-fache *luc*-Aktivität im Vergleich zum *SV40*-Promotor pGL3-CON. *Error bars* zeigen SEM.

Mit dem pGL3-ENH-Vektor, der keinen funktionellen Promoter besitzt, wurde die Hintergrund-*luc*-Aktivität ermittelt. Der Kontroll-Vektor pGL3-CON, dessen *luc*-Gen unter der Kontrolle des starken *SV40*-Promotors steht, zeigte eine deutliche *luc*-Aktivität. Die *luc*-Aktivität des unmethylierten Konstrukts (pGL3-UCP) war allerdings etwa 1.5 mal höher als die Aktivität, die für die Positiv-Kontrolle gemessen wurde, was auf eine starke Aktivität des 5´-Bereichs des *CAV-1*-Promotors hinweist. Das methylierte pGL3-MCP-Konstrukt zeigte die geringste *luc*-Aktivität. Diese war sogar niedriger als die Aktivität des pGL3-ENH-Vektors. Dieses Plasmid zeigte auch eine deutlich verringerte Expression relativ zur Kontrolle pGL3-CON.

Um zu überprüfen, ob Schwankungen in den *luc*-Aktivitäten bei Transfektion in verschiedene Zelllinien auftreten, wurde die von normalem prostatischem Gewebe stammende Zelllinie PNT1A mit den gleichen Vektoren transfiziert und anschließend der Luciferase-Assay durchgeführt. Es wurden für PNT1A-Zellen identische *luc*-Aktivitäten für die jeweiligen Expressionsvektoren gemessen wie für PC-3-Zellen, d.h. das unmethylierte *CAV-1*-Promotor-Fragment wies die höchste Aktivität auf, wobei diese wiederum höher als die des Kontroll-Vektors war. Im Gegensatz dazu war keine Expression vom methylierten Fragment pGL3-MCP zu beobachten, während für den promotor-losen Vektor pGL3-ENH nur Hintergrund-Aktivität gemessen werden konnte.

Die Ergebnisse lassen sich so zusammenfassen, dass der minimale aktive Promotor des *CAV-1*-Gens einen 356 bp großen Bereich umfasst, der etwa 900 bp vor dem Transkriptionsstart liegt und durch Methylierung stillgelegt werden kann.

3.3 Was ist die Ursache der fehlenden *CAV-1*-Expression in LNCaP?

3.3.1 Sind an der Inaktivierung des *CAV-1*-Promotors Regulatoren *„in trans“* beteiligt?

CAV-1 interagiert mit zahlreichen Signal-Molekülen und hält diese durch seine Bindung in einem inaktiven Zustand. Diese Interaktion wird durch die sog. caveolin-scaffolding domain (CSD) vermittelt. Funktionelle CAV-Binde-Motive finden sich sowohl in Tyrosin- als auch in Serin/Threonin-Kinasen. In allen untersuchten Fällen befindet sich das CAV-Binde-Motiv innerhalb der katalytischen Domäne des jeweiligen Signal-Moleküls. Zu diesen gehören u.a. Signal-Moleküle wie die MEK-1 (MAP kinase/ERK kinase-1). Es konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten von *CAV-1* zu einer konstitutiven Hyper-Aktivierung der p42/44 MAP-Kaskade führt (55).

Aus diesem Grund wurde der Frage nachgegangen, ob die fehlende Expression von LNCaP auf einen hyperaktivierten MAP Kinase-Weg beruht. Dazu wurden die Zellen mit PD98059 (2´-Amino-3´-Methoxyflavone) inkubiert, das selektiv die Aktivität der MAP Kinase Kinase (MAPKK, ERK Kinase, oder MEK) inhibiert, indem es die Aktivierung der MAP Kinase und die anschließende Phosphorylierung der MAP Kinase-Substrate sowohl *in vitro* als auch in intakten Zellen blockiert. Für dieses Experiment wurden zunächst alle PCa-Zelllinien verwendet, da überprüft werden sollte, ob es Unterschiede in der Stärke der Expression zwischen unbehandelten und behandelten Kulturen gibt und ob die Expression des Gens generell in diesen PCa-Linien durch eine Hyperaktivierung der p42/44 MAP Kinase reduziert ist. Es wurde eine Zeitreihe über 24 h erstellt, indem zum jeweiligen Zeitpunkt (PD98059: 4, 5 und 7h nach Zugabe) die Inkubation durch RNA-Isolation unterbrochen wurde. PD98059 wurde in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Der Nachweis der Expression erfolgte mittels RT-PCR mit Primern, die spezifisch für die α- (cDNAa1 + cDNAb) und β-Isoform (Ex2H + cDNAb) von *CAV-1* sind (Abbildung III-16).

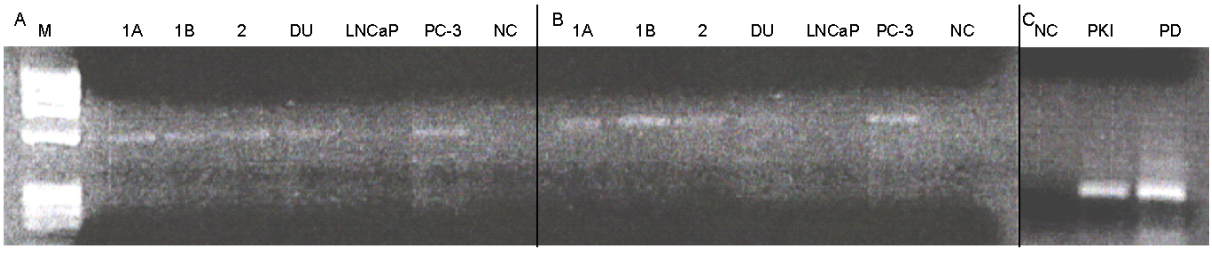


Abb. III-16: RT-PCR mit cDNA der PCa-Zelllinien. Untersuchung zum Effekt des MAP Kinase Kinase Inhibitor PD auf die Expression von *CAV-1*. Es konnte kein aktivierender Effekt von PD98059 auf die Expression von *CAV-1* im Vergleich zu unbehandelten Kulturen nachgewiesen werden. Nachweis der Expression A) von *CAV-1β* und B) von *CAV-1α* nach Inkubation mit PD98059 in den Zelllinien. Es konnte ebenfalls keine *CAV-1*-Reaktivierung

durch den MAP Kinase Kinase Inhibitor in LNCaP beobachtet werden. C) Als Expressionskontrolle nach PKI- und PD-Behandlung von LNCaP diente *GAPDH*. M=Marker, 1A=PNT1A, 1B=PNT1B, 2=PNT2, DU=DU-145, NC=Negativ-Kontrolle

Abbildung III-16 zeigt deutlich, dass in den PCa-Zelllinien sowohl das Transkript der *CAV-1α*- als auch der *CAV-1β*-Isoform detektierbar ist. Im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen ergaben sich allerdings keine Unterschiede in der Stärke der Expression. Wiederum stellt die PCa-Linie LNCaP eine Ausnahme dar, in der auch nach Inkubation mit dem MAP Kinase Kinase-Inhibitor keine Reaktivierung der *CAV-1*-Expression erzielt werden konnte.

Auf gleiche Weise sollte eine Zeit-abhängige Reaktivierung der *CAV-1*-Expression mit Hilfe des MAP Kinase Kinase-Inhibitors PD98059 geprüft werden (Abbildung III-17).

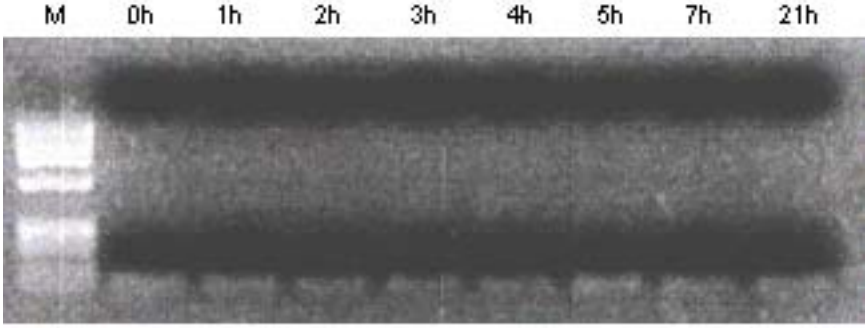


Abb. III-17: RT-PCR-Produkte nach Behandlung mit dem MAP Kinase Kinase Inhibitor PD98059. Versuch der Reaktivierung der *CAV-1*-Expression in LNCaP. LNCaP-Zellen wurden mit PD98059 über einen Zeitraum von 21h behandelt. Die RT-PCR-Kontrolle erfolgte zum jeweils angegebenen Zeitpunkt durch Abbruch der Inkubation durch RNA-Isolation. Das Fehlen der Expression von *CAV-1* in der Zelllinie LNCaP ist unabhängig von der p42/44 MAP Kinase-Aktivierung. Die Repression der *CAV-1*-Expression in LNCaP-Zellen lässt sich auch nach 21h Inkubation mit PD98059 nicht aufheben.

Die LNCaP-Zellen wurden zu diesem Zweck über einen Zeitraum von 21 h mit dem gut charakterisierten MAP Kinase Kinase Inhibitor PD98059 inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten (1, 2, 3, 4, 5, 7 und 21h) wurde RNA isoliert und die Reaktivierung der Expression mittels RT-PCR untersucht. Eine Vitalitätskontrolle der Zellen erfolgte visuell anhand der Morphologie der Zellen. Wie in Abbildung III-17 dargestellt, zeigte sich selbst nach 21-stündiger Inkubation kein *CAV-1*-Produkt in der RT-PCR aus LNCaP-Zellen. Da sich die Zellen morphologisch nicht von den Kontrollen unterschieden, darf man annehmen, dass das Fehlen der *CAV-1*-Expression in dieser Zelllinie unabhängig von der Aktivierung der p42/44 MAP Kinase ist.

Das Fehlen der Expression in LNCaP beruht offenbar nicht auf einer Hyperaktivierung des MAP Kinase-Wegs, da es trotz Behandlung mit dem MAP Kinase Kinase-Inhibitor PD98059 nicht gelang, die Gen-Expression von *CAV-1* in LNCaP-Kulturen zu reaktivieren. Auch in den anderen PCa-Zelllinien konnte keine verstärkte *CAV-1*-Expression des α- bzw. β-

Transkripts im Vergleich zu nicht behandelten Kulturen induziert werden. Dies spricht dafür, dass die Expression des Gens in diesen Kulturen unabhängig von einer hyperaktivierten p42/44 MAP Kinase ist.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Binden von CAV-1 über die scaffolding-domain ausreichend ist, um die enzymatische Aktivität zahlreicher Kinasen *in vitro* zu blockieren. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Protein-Kinase A-Signalwegs ein Stilllegen der *CAV-1*-Promotor-Aktivität und damit ein Abschalten der CAV-1-Protein-Expression zur Folge hatte (45). Sollte nun in der PCa-Zelllinie LNCaP die *CAV-1*-Expression durch eine hyperaktivierte Protein-Kinase A reguliert werden, müsste es möglich sein, diese durch Zugabe eines PKA-Inhibitors zu reaktivieren.
Ganz analog zur Hemmung der MAP Kinase durch Inhibitor PD98059 wurde untersucht, ob der *CAV-1*-Promotor in LNCaP durch eine hyperaktivierte Protein-Kinase A stillgelegt wird. Diese Hypothese wurde durch Behandlung von LNCaP-Kulturen mit dem Protein-Kinase A Inhibitor PKI (cAMP-dependent Protein Kinase Inhibitor, CALBIOCHEM) überprüft, indem die Kulturen für jeweils 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 21 und 22 h mit einer Konzentration von 2 mM PKI inkubiert wurden. Die Behandlung wurde durch RNA-Isolation zu den jeweiligen Zeitpunkten abgebrochen. Die anschließende RT-PCR mit Primer-Paaren, die spezifisch für die α- (cDNAa1 + cDNAb) und β-Isoform (Ex2H + cDNAb) sind, ist in Abbildung III-18 dargestellt.

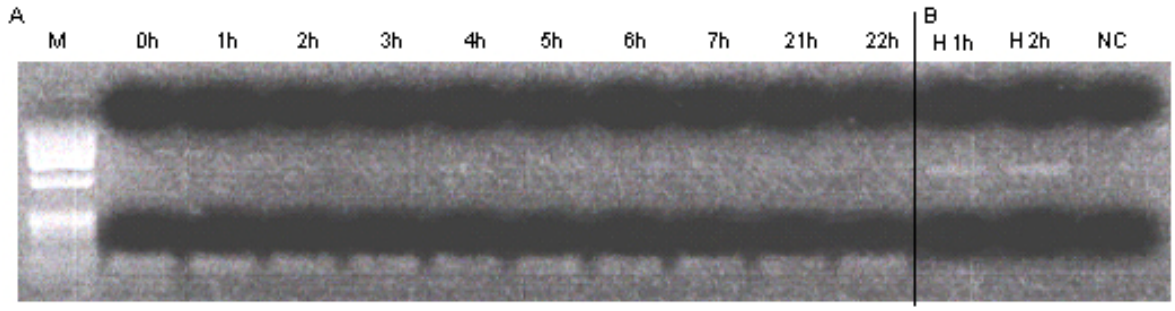


Abb. III-18: RT-PCR-Ergebnis nach Behandlung von LNCaP-Zellen mit PKI. A) Die Behandlung der Kulturen mit PKI wurde zu den dargestellten Zeitpunkten durch RNA-Isolation abgebrochen und im Anschluss daran mittels RT-PCR eine Expressionsanalyse durchgeführt. Es konnte keine Reaktivierung der *CAV-1*-Expression mit PKI erreicht werden. B) Auch HeLA-Kulturen wurden mit PKI behandelt, um die Vitalität der Zellen zu prüfen. Die stoffwechsel-aktiven Zellen exprimieren *CAV-1*, was bedeutet, dass PKI in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch wirkt. M=Marker, H=HeLa-Zellen, NC=Negativkontrolle.

Exemplarisch in Abbildung III-18 dargestellt ist der Ausgang des Experiments mit PKI für die α-Isoform. Wie deutlich zu erkennen ist, blieb eine Reaktivierung der *CAV-1*-Expression auch nach 22 h aus und es zeigte sich, dass PKI überhaupt keinen Einfluss auf die Expression des

Gens in LNCaP hatte. Es konnte keine der beiden Isoformen reaktiviert werden (*CAV-1β* nicht gezeigt).

Beide Agenzien, sowohl PD98059 als auch PKI, haben keinen toxischen Effekt auf LNCaP-Zellen, wie visuell durch Kontrolle der Zell-Morphologie ausgeschlossen wurde. Als Transkriptionskontrolle wurde eine RT-PCR mit *CAV-1α*-Primern (cDNAa1 + cDNAb = 627bp) durchgeführt. Die *CAV-1*-Bande zeigte, dass die Zellen bis zum Zeitpunkt der RNA-Isolation aktiv und vital waren und *CAV-1* exprimierten.

Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass weder eine Dosis-abhängige (nicht gezeigt) noch eine Zeit-abhängige Reaktivierung der Expression des Gens mit PKI oder PD98059 möglich ist. Die Ursache der *CAV-1*-Inaktivierung beruht also weder auf einem hyperaktiviertem MAP Kinase-Signalweg noch auf einer hyperaktivierten Protein Kinase A. Die fehlende Expression von *CAV-1* könnte ihren Ursprung also allein in der Repression durch Methylierung haben.

3.3.2 Kann die *CAV-1*-Expression in LNCaP-Zellen durch 5-Aza-2´Desoxycytidin und Trichostatin A reaktiviert werden?

Eine Blockade der *CAV-1*-Promotor-Aktivität durch hyperaktivierte Signal-Transduktionswege konnte durch die oben genannten Versuchsansätze ausgeschlossen werden. Dieser Befund macht eine epigenetische Modifikation als Ursache fehlender Expression wahrscheinlicher, da LNCaP-Zellen trotz des Vorhandenseins von mindestens einer intakten Kopie des Gens kein *CAV-1* exprimieren. Wie unter 1.4.1 beschrieben, könnte die Ursache für die fehlende Expression in LNCaP „gene silencing“ sein, das durch Methylierung des *CAV-1*-Promotors vermittelt wird. Durch Behandlung mit 5-Aza-2´Desoxycytidin (5-Aza-2´CdR), das Methylierung von CpGs verhindert, wurde versucht, die Expression von *CAV-1* zu reaktivieren. Dieses Cytidin-Analogon verhindert durch seinen Einbau in die DNA eine Methylierung durch seine strukturellen Unterschiede zum natürlichen Substrat das Übertragen von Methyl-Gruppen durch die Methyl-Transferase DNMT. Der resultierende Verlust der Methylierung im Laufe weiterer Zell-Zyklen kann die Gen-Expression in *cis* regulieren, da Transkriptionsfaktoren wieder an den Promotor-Regionen binden können.

Bei diesem Experiment wurden LNCaP-Zellen über einen Zeitraum von 2 Wochen mit 5-Aza-2´CdR in einer End-Konzentrationen von 100, 200, 300 und 500 µM inkubiert. Nach RNA-Isolation wurde die Transkriptmenge mittels RT-PCR mit *CAV-1*-spezifischen cDNA-Primern abgeschätzt (Abbildung III-19).

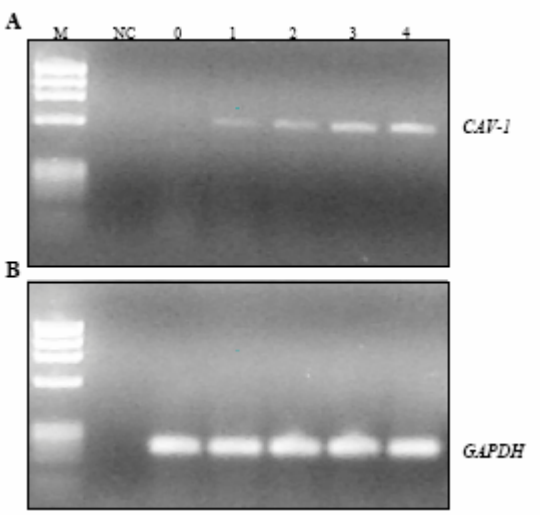


Abb. III-19: *A*) RT-PCR an RNA von LNCaP-Zellen nach 5-Aza-2´CdR-Behandlung. Durch Behandlung mit dem Cytidin-Analogon gelang es, die *CAV-1*-Expression in LNCaP zu reaktivieren. Die Intensität der PCR-Produkt-Bande stieg mit der 5-Aza-2´CdR-Konzentration. Spur M stellt einen Größenstandard dar. NC ist eine Negativ-Kontrolle. LNCaP-Zellen exprimieren basal kein *CAV-1* (Spur 0). End-Konzentrationen von 5-Aza-2´CdR waren 100 µM (Spur 1), 200 µM (Spur 2), 300 µM (Spur 3), 500 µM (Spur 4). *B*) RT-PCR mit *GAPDH*-spezifischen Primern dienten als Kontrolle für gleiche Mengen an RNA in der RT-PCR-Reaktion.

Durch das Aufheben der Methylierung mit 5-Aza-2´CdR gelang es, die Aktivität des *CAV-1*-Promoters dosis-abhängig in der Zelllinie LNCaP wiederherzustellen. Ein toxischer Effekt im Sinne morphologischer Veränderungen oder der Ablösung von Zellen stellte sich erst bei einer Konzentration über 1 mM ein. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Verlust der Methylierung (durch den Einbau von 5-Aza-2´CdR) die Expression von *CAV-1* in der *CAV-1*-negativen Zelllinie LNCaP wiederherstellen kann.

Histon-Deacetylierung, die durch Histon-Deacetylasen (HDAC) vermittelt wird, führt zu einem Supercoiling der Chromatin-Struktur, wodurch das Chromatin für DNA-bindende Transkriptions-regulierende Proteine unzugänglich wird. Dies könnte ebenfalls ein Mechanismus sein, durch den die intakte Kopie des *CAV-1*-Gens in LNCaP stillgelegt wird. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden LNCaP-Kulturen mit Trichostatin A (TSA) behandelt. TSA ist ein nicht-kompetitiver reversibler Inhibitor der HDAC-Aktivität, der durch Relaxation des Chromatins eine Reaktivierung der Gen-Expression bewirken kann.

Die Behandlung wurde über fünf Tage mit täglichen Mediumwechsel und Zugabe von frischem TSA durchgeführt. Als Konzentrationen wurden 10, 20, 50, 100, 200 und 500 ng/ml TSA bzw. als Kontrolle 100 µl 100% Ethanol pro Kultur in α-Medium eingesetzt. Am 6. Tag erfolgte die RNA-Isolation, Messung der Konzentration und anschließende semi-quantitative RT-PCR mit jeweils gleichen Mengen an Gesamt-RNA für jeden RT-PCR-Ansatz.

Die Behandlung der LNCaP-Zellen mit TSA führte bei keiner der verwendeten Konzentrationen zu einer Reaktivierung der *CAV-1*-Expression. Allerdings war mit zunehmender Konzentration ein toxischer Effekt auf die Zellen zu beobachten, der bei 100 ng/ml begann

und sowohl an der morphologischen Veränderung der Zellen als auch am sich Ablösen der Zellen zu erkennen war. Die Kontroll-Behandlung mit Ethanol in α-Medium (End-Konzentration: 1%) hatte keinen Effekt auf die Zellen.

Eine Kombinationsbehandlung mit 5-Aza-2´CdR und TSA wurde ebenfalls durchgeführt, um zu testen, ob sich die Wirkung auf die Reaktivierung der *CAV-1*-Expression hierdurch verändert. Für diesen Versuch wurden die gleichen Konzentrationen wie bei den Einzelversuchen verwendet. Es stellte sich heraus, dass die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit 5-Aza-2´CdR und TSA die Reaktivierung der Expression nicht verstärkt. Der toxische Effekt von TSA auf die Kulturen war wieder deutlich. Er war sogar stärker als bei Einzelbehandlung mit TSA. Auch bei mittleren Konzentrationen von TSA wuchsen weniger Zellen im Vergleich zur 5-Aza-2´CdR-Inkubation allein.

Der Ausschluss von LOH sowie eines hyperaktivierten p42/44 MAP Kinase-Signalweges und einer hyperaktivierten Protein-Kinase in LNCaP-Kulturen, die basal kein *CAV-1* exprimieren, sowie die Reaktivierung der *CAV-1*-Expression mit einem demethylierenden Agens, liefern eindeutige Beweise für eine Inaktivierung des Gens durch Hyper-Methylierung.

3.3.3 Bindet ein Nukleoprotein spezifisch an den methylierten *CAV-1*-Promotor?

Die Inaktivierung von Genen durch Methylierung wird in der Regel durch methylierungsabhängige Bindung spezifischer Proteine vermittelt. Um spezifische DNA-Protein-Interaktionen mit der *CAV-1*-Promotor-Region nachzuweisen und um zu bestimmen, ob diese Interaktion von Methylierung abhängig ist, wurden Electrophoretic Mobiltiy Shift Assays (EMSAs) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden PCR-Amplifikate des *CAV-1*-Promotors vor der radioaktiven Markierung mit der Methylase *Sss*I inkubiert, was zu einer vollständigen Methylierung aller CpG-Dinukleotide des PCR-Produktes führt. Als Negativ-Kontrolle diente ein PCR-Produkt, das zwar in Anwesenheit von *Sss*I, aber ohne den Methyl-Donor SAM inkubierte wurde. In diesem Fall bleibt eine Methylierung der CpGs aus. Die so erhaltenen radioaktiv markierten, methylierten bzw. unmethylierten *CAV-1*-Promotor-Fragmente wurden anschließend zum Test auf Interaktion mit einem Methyl-Binde-Protein in den EMSA eingesetzt. Der EMSA wurde zum einen mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen (Abbildung III-20A) durchgeführt, und zum anderen mit einem Gesamt-Protein-Lysat (Abbildung III-20B), das aus PC-3-Zellen gewonnen wurde.

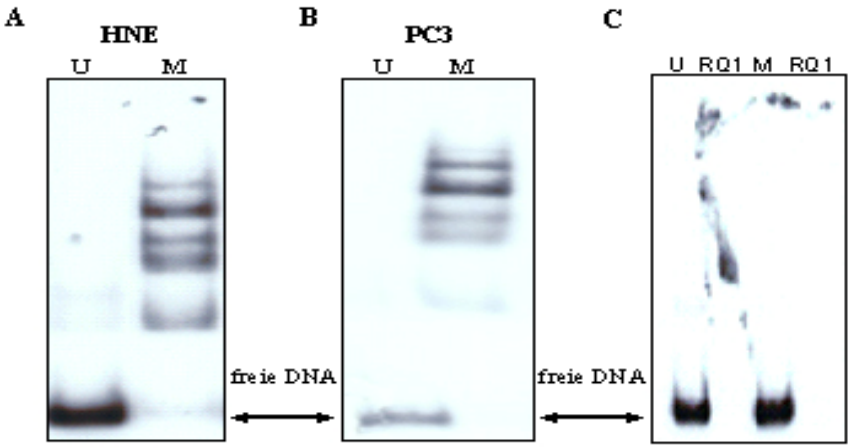


Abb. III-20: Autoradiogramme der EMSA-Experimente mit verschiedenen Protein-Lysaten. Die Analyse zeigt eine Interaktion zwischen dem methylierten *CAV-1*-Promotorfragment und *A*) einem nukleären Protein aus HeLa nukleärem Extrakt (HNE) und *B*) einem Protein aus PC-3-Gesamt-Protein-Lysat. Keine Interaktion wurde mit dem unmethylierten Promotor (freie DNA) beobachtet. In die EMSAs wurden 90 ng HNE und 150 ng PC-3-Lysate eingesetzt und annähernd gleiche Mengen an unmethyliertem (U) und *Sss*I methyliertem (M) Promoterfragment, das PCR amplifiziert und mit γ-^{32}P-ATP radioaktiv markiert wurde. C) EMSA-Kontrollexperiment: *DNase* RQ1 Behandlung der ^{32}P-markierten *CAV-1*-DNA-Fragmente.

Bei beiden Extrakten zeigte der Assay eine Retention, was eine Bindung eines Proteins an das methylierte (pGL3-MCP), aber nicht an das unmethylierte Fragment (pGL3-UCP) (Abbildung III-20A und B, Spur M) anzeigt. Dieses Promotor-Fragment ist hinsichtlich seiner Methylierung genau das gleiche (pGL3-MCP), das auch im Reportergen-Assay keinerlei Promotor-Aktivität besaß. Im Gegensatz dazu zeigte die unmethylierte Wild-Typ-DNA bei Inkubation mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen bzw. PC-3-Lysat normale elektrophoretische Mobilität, wie man an der ungebundenen DNA in Spur U erkennen kann. Die Kontroll-Reaktionen wurde mit radioaktiv markierter, unmethylierter (U) und methylierter (M) *CAV-1*-Promotor-DNA durchgeführt, wobei in diesen Fällen kein Protein in den EMSA eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). In einer weiteren Kontrolle wurden die beiden Typen DNA vor dem Assay mit *DNase* RQ1 behandelt. Diese Nuklease baut DNA ab und so konnte kein radioaktives Signal im Gel detektiert werden, während nicht behandelte DNA ein deutliches Signal hinterlässt (Abbildung III-20C).

Bei Betrachtung der Autoradiogramme fällt auf, dass mehrere retardierte Banden zu sehen sind. Da dies auf unspezifische Wechselwirkungen hindeuten könnte, musste der positive Befund durch Kompetitionsexperimente verifiziert werden. Dabei wird dem potentiell bindenden Protein(lysat) vor der eigentlichen Bindereaktion mit der radioaktiv markierten "Ziel-DNA" ein Überschuss an unmarkierter Kompetitor-DNA angeboten.

Bei diesen Experimenten war die Kompetitor-DNA immer unmarkiert. Die Kompetitionen erfolgten zunächst jeweils mit der gleichen, aber unmarkierten DNA, also radioaktiv markierte (un)methylierte (*) Ziel-DNA (U-CAV*/M-CAV*) mit unmarkiertem (un)methyliertem Kompetitor (U-CAV* + U-CAV bzw. M-CAV* + M-CAV), sowie die

reziproke Kompetition (U-CAV* + M-CAV bzw. M-CAV* + U-CAV). Zum besseren Verständnis der durchgeführten Kompetitionen dient nachfolgendes Schema.

Ziel-DNA	U-CAV*	M-CAV*	U-CAV*	M-CAV*	U-CAV*	U-CAV*	M-CAV*	M-CAV*
Kompetitor	**---**	**---**	**---**	**---**	**U-CAV**	**M-CAV**	**U-CAV**	**M-CAV**
Protein[§]	---	---	+	+	+	+	+	+

* Sowohl der methylierte als auch der unmethylierte 356 bp-*CAV-1*-Promotor ist radioaktiv mit $^{32}\gamma$-ATP markiert
§ Die Kompetitionsexperimente wurden mit nuklärem HeLa-Extrakt durchgeführt

Bei diesem EMSA ist ein mit zunehmender Kompetitor-Menge immer schwächer werdendes Signal des Protein/DNA-Komplex auf dem Autoradiogramm zu erwarten. Diese Abschwächung sollte allerdings nur nach Inkubation mit identischer DNA eintreten, da nur diese vom Interaktionspartner spezifisch gebunden wird. Da die spezifische Bindung sehr viel stärker ist als die unspezifische, kann selbst eine hohe Konzentration an eingesetzter Kompetitor-DNA keinen Einfluss auf die spezifische Komplexbildung nehmen.

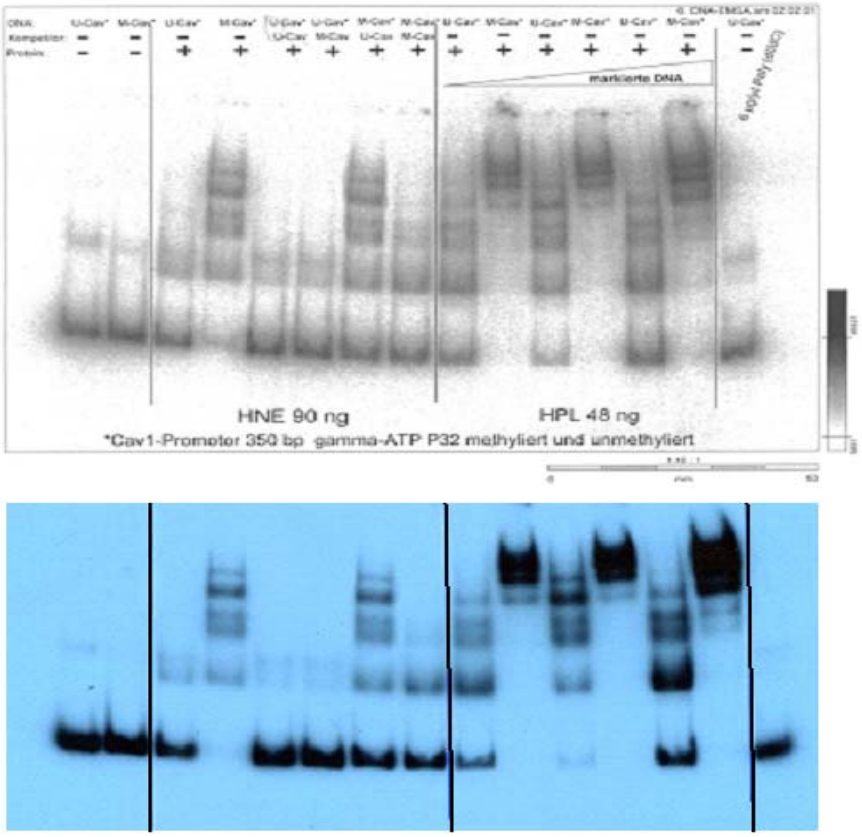


Abb. III-21: Kompetitionsexperiment mit den *CAV-1*-Promotor-Fragmenten. Abbildung oben stellt das Autoradiogramm dar, unten ist das Autoradiogramm als PhosphoImager-Bild abgebildet. 1. Spalte: Kontrolle der ^{32}P-markierten Promotor-Fragmente ohne Protein-Lysat. 2. Spalte: Kompetition in Anwesenheit von nukleärem HeLa-Extrakt (HNE). Ohne Kompetitor kam es nur mit dem methylierten *CAV-1*-Promotor zu einer spezifischen Wechselwirkung mit einem Protein. Diese ließ sich komplett verhindern, wenn unmarkierte DNA M-CAV zum Ansatz gegeben wurde, nicht jedoch wenn der U-CAV-DNA als Kompetitor fungierte. 3. Spalte: Zunehmende Konzentration an markierter DNA bei konstanter Menge an HeLa-Protein-Lysat (HPL). Je mehr DNA in den EMSA eingesetzt wurde, desto mehr DNA/Protein-Komplexe konnten sich bilden und umso stärker wurde das Signal. 4. Spalte: Bindungsexperiment mit Poly-(dI/dC).

Da eine spezifische DNA/Protein-Bindung untersucht werden sollte, wurde in einen Ansatz poly(dI/dC) verwendet, das gewöhnlich zur Immunpräzipitation eingesetzt wird. Das doppelsträngige poly(dI/dC) ähnelt in der großen Furche einem G-C- und in der kleinen Furche einem A-T-Basenpaar und fängt so viele unspezifisch bindende Proteine ab. Findet eine Interaktion zwischen der DNA und dem Protein statt, so wird die DNA auf Grund der Wechselwirkung mit dem Protein in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber der freien DNA-Sonde behindert. Wie der Versuch zeigt, führt poly(dI/dC) *per se* zu keiner Komplex-bildung.

Ohne Kompetitor-DNA zeigt sich eine spezifische Interaktion eines Proteins mit dem methylierten Promotor-Fragment, während unmethylierte *CAV-1*-DNA (U-CAV) ungehindert durch das Gel läuft. Gibt man nun zu dem Ansatz, in dem sich der DNA-Protein-Komplex ausbildet, unmarkierte nicht-methylierte DNA (U-CAV), so hat dies keine Auswirkung auf die Wechselwirkung der markierten methylierten DNA (M-CAV*) mit dem Protein. Erwartungsgemäß konkurriert jedoch unmarkierte methylierte Promotor-DNA (M-CAV) um den gleichen Bindungspartner und verdrängt das Signal. Dabei kann nur ein Teil der methylierten ^{32}P-DNA binden und eine Retention des Komplexes erzeugen, sodass die Signalstärke des Komplexes insgesamt schwächer ist.
Bei Zugabe höherer Konzentrationen an Promotor-DNA konnte eine deutliche Verstärkung des Signals erzielt werden, was am Beispiel von HeLa-Protein-Lysat (HPL) gezeigt werden konnte und entsprechend für das nukleäre Extrakt (HNE) gilt.
Mit Kompetitionsexperimenten konnte die Spezifität der Interaktion zwischen methylierten Promotor-Fragmenten und einem Kern-Protein bestätigt werden.

3.3.4 Ist MeCP2 ein Kandidat für die Bindung an das methylierte *CAV-1*-Promotor-Fragment?

Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden spielt bei der Kontrolle der Gen-Expression eine wichtige Rolle. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Interaktion dieser Stellen mit Proteinen, die an methylierte DNA binden können, um einen Repression der Expression zu vermitteln. Die meisten der methyl-CpG-bindenden Proteine benötigen CpG-Inseln für ihre Interaktion (126). Die hier untersuchte minimale Promotor-Region des *CAV-1*-Gens umfasst 356 bp genomischer DNA, die sieben einzelne CpG-Dinukleotide enthält. Die Mehrzahl der CpG-bindenden Proteine benötigt mehrere CpGs zur Bindung und dürfte für den *CAV-1*-Promotor keine Rolle spielen. Das einzige bislang bekannte Protein, das an einzelne methylierte CpGs

bindet, ist MeCP2 (Methyl-CpG binding Protein 2) und damit ein guter Kandidat für die Bindung an den *CAV-1*-Promotor.

Um der Frage nachgehen zu können, ob MeCP2 tatsächlich an eines der CpGs im Promotor des *CAV-1*-Gens bindet, wurde ein *MeCP2*-Expressionsvektor generiert und zur Kontrolle sequenziert, um eventuelle Einzel-Basen-Mutationen und frühe Stop-Codons auszuschließen. In Retikulozyten-Lysat erfolgte *in vitro* die Transkription und Translation des 53 kDa Proteins, das schließlich im EMSA eingesetzt wurde.

Allerdings konnte weder mit dem unmarkierten noch mit dem ^{32}P-markierten methylierten Promotor-Fragment eine spezifische Interaktion mit MeCP2 beobachtet werden (Abbildung III-22). Dies bedeutet, dass möglicherweise ein anderes Methyl-CpG-Binde-Protein für die Komplexbildung mit dem *CAV-1*-Promotor relevant ist.

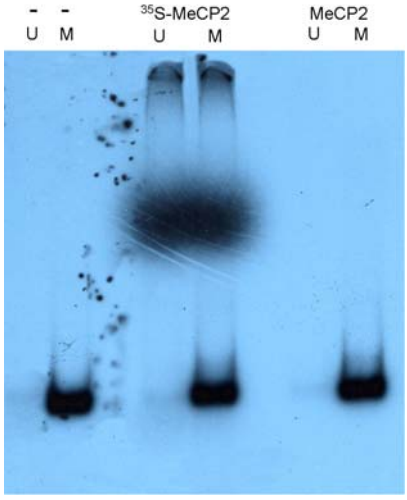


Abb. III-22: Autoradiogramm eines EMSA mit unmarkiertem (U) und ^{32}P-markiertem (M) methyliertem *CAV-1*-Promotor-Fragment und ^{35}S-markiertem bzw. unmarkiertem *in vitro* transkribiertem und translatiertem MeCP2-Protein. Es zeigte sich kein Protein-DNA-Komplex, d.h. MeCP2 bindet nicht an den methylierten *CAV-1*-Promotor. U=unmarkiertes Fragment, M=markiertes Fragment, ^{35}S-MeCP2=^{35}S-markiertes *in vitro* synthetisiertes MeCP2, MeCP2=MeCP2-Protein ohne ^{35}S-Markierung.

Auch steigende Konzentrationen an MeCP2 führten im EMSA zu keiner Kompetition, woraus geschlossen werden kann, dass MeCP2 nicht der Bindungspartner des *CAV-1*-Promotors und nicht für dessen Repression in LNCaP verantwortlich ist.

3.4 *CAV-1*, ein weiteres Gen mit Imprinting auf 7q3?

Gene, die dem Imprinting unterliegen, werden nur von einem der beiden elterlichen Chromosomen exprimiert und sind epigenetisch durch DNA-Methylierung gekennzeichnet. Sie treten geclustert in Domänen auf, und ihre Repression wird durch so genannte „imprinting control regions“ vermittelt (35; 48; 178). Ein solches Imprinting Cluster findet sich auf

Chromosom 7q32 (12; 93), in enger Nachbarschaft zum Gen *CAV-1*. Aus diesem Grund war es naheliegend, dessen allel-spezifische Expression zu überprüfen. Für die Unterscheidung zwischen maternalen und paternalen Allelen bei heterozygoten Personen wurde zunächst nach einem exprimierten Einzel-Basen-Polymorphismus gesucht. Dieser wurde mittels Datenbank-Recherche[5] in Form einer C->A-Substitution in der 3´UTR der *CAV-1*-DNA an Position 965 gefunden.

3.4.1 Unterliegt das humane *CAV-1* einem Imprinting?

Die allel-spezifische Expression wurde an kultivierten Fibroblasten einiger Familien untersucht, die beide Eltern mit mindestens einem Kind umfassten. Es handelte sich bei diesen Familien um Kontrollen oder Patienten, die im Rahmen eines NF-1-Projektes (Neurofibromatose 1) gesammelt worden waren und auf deren Fibroblasten-Kulturen nun zurückgegriffen werden konnte. In zwei der sechs geeigneten Familien fanden sich für diesen Polymorphismus heterozygote Kinder. Im nächsten Schritt wurde RNA aus den Kulturen eines jeden Familien-Mitglieds extrahiert und Erst-Strang-cDNA synthetisiert. Anschließend wurden die RT-PCR-Produkte mittels SNaPShot-Analyse genotypisiert, um die Proben auf Heterozygotie zu testen. Die zuvor verifizierte Heterozygotie auf DNA-Ebene fand sich auch auf RNA-Ebene in jeder der untersuchten Familien. Offensichtlich werden in Fibroblasten beide Allele transkribiert, was bedeutete, dass eine Allel-spezifische Abschaltung der Expression in Fibroblasten und damit Imprinting ausgeschlossen werden konnte.

Da Imprinting in Abhängigkeit vom Gewebe variieren kann, wurde nach mono-allelischer Expression in verschiedenen Geweben von heterozygoten Föten gesucht. Die aus Gesamt-RNA synthetisierten Erst-Strang-cDNAs wurden freundlicherweise von V.M. Kalscheuer, MPI, Berlin zur Verfügung gestellt. Bei diesen Proben handelte es sich um Skelett-Muskel, Haut, Gehirn, Niere, Nebenniere, Leber, Plazenta, Darm, Lunge, Zunge, Chorion und Amnion (**siehe 2.3.13**). Die cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend direkt sequenziert. Die Sequenz-Analyse zeigte, dass *CAV-1* in fötaler Lunge und Zunge mono-allelisch exprimiert ist (Abbildung III-23). Da jedoch die Eltern nicht verfügbar waren, konnte der parentale Ursprung des transkribierten Allels nicht bestimmt werden.

[5] NCBI HumanSNPdb http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/CMD=search&db=snp/

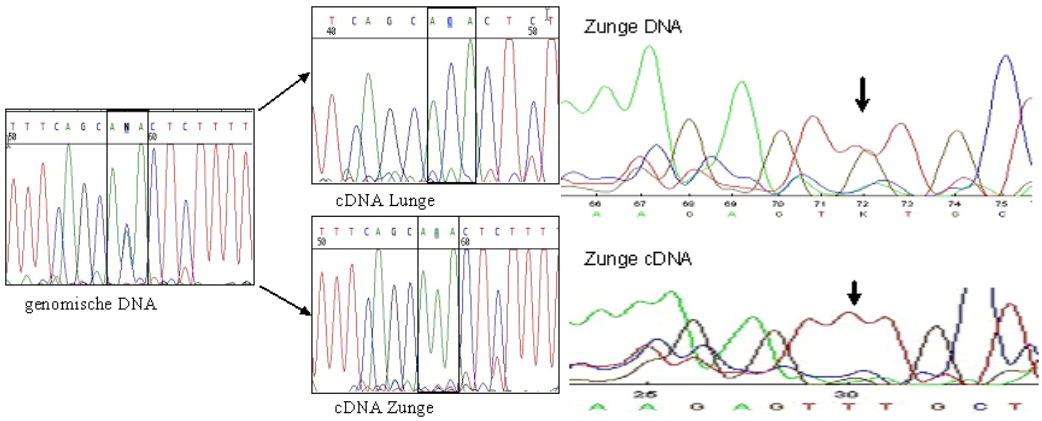


Abb. III-23: Fluorogramme der Imprinting-Analyse von *CAV-1* in humanem fötalen Gewebe. Direktes Sequenzieren parentaler genomischer DNA zeigte den bi-allelischen Zustand, während fötaler Lunge und Zunge mono-allelische Transkription von *CAV-1* aufwiesen, was auf gewebe-spezifisches Imprinting hinweist (linke Abbildung). Das rechte Bild verdeutlicht den Befund am Beispiel der Zunge. Bi-allelische Expression auf DNA-Ebene (oben) und mono-allelische Expression auf cDNA-Ebene (unten).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das *CAV-1*-Gen insgesamt nicht einem Imprinting unterliegt. Da es jedoch in humaner fötaler Lunge und Zunge nur von einem der elterlichen Allele transkribiert wird, kann man eine gewebe-spezifische mono-allelische Transkription nicht ausschließen. Leider konnte Prostata-Gewebe nicht untersucht werden.

3.4.2 Unterliegt *CAV-1* in der Maus einem Imprinting?

Imprinting ist wegen der Verfügbarkeit der Elterntiere und der Möglichkeit von Kreuzungen bei der Maus sehr viel leichter zu untersuchen als beim Mensch. Die Untersuchung auf allel-spezifische Transkription wurde an F1-Hybriden der Maus-Stämme *Mus musculus* und *M. spretus* durchgeführt. Diese beiden Stämme sind für die meisten Marker so verschieden, dass sie sich für eine derartige Studie gut eignen. Der humane Locus 7q31.1 ist syntän mit dem murinen Chromosom 6-A2. Die Suche in der Maus-Datenbank[6] ergab einen exprimierten Polymorphismus im *cav-1*-Gen mit unterschiedlichen Allelen in den beiden Maus-Stämmen. Dieser Polymorphismus konnte mittels SNaPShot-Analyse auf DNA- und cDNA-Ebene aus den Hybriden bestätigt werden. Bei den hier untersuchten Geweben handelte es sich um Leber, Milz und Muskel, sowie Zunge und Gehirn. Die SNaPShot-Analyse erfolgte mit dem für den Polymorphismus spezifischen Primern.
Die Untersuchungen an den Mäusen zeigten, dass *cav-1* bei der Maus nicht dem Imprinting unterliegt.

[6] NCBI MouseSNPdb http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/MouseSNP.cgi/

3.5 Besteht eine Assoziation zwischen genetischen Varianten des *CAV-1*-Gens und dem Prostata-Karzinom bzw. seiner aggressiven Form?

Ein wichtiger Ansatz zur Klärung genetischer Disposition sind Assoziationsstudien, mit denen man für einzelne Gene prüfen kann, ob eines der jeweiligen Allele mit einem erhöhten Krankheits-risiko einhergeht. Die Auswahl dieser Gene erfolgt sinnvollerweise aufgrund funktioneller Hinweise. Dies gilt z.B. auch für das Prostata-Karzinom, für das viele Gene untersucht wurden, die in Initiation oder Progression des Tumors involviert sein könnten. Ein weiteres, aber bislang nicht untersuchtes Gen ist aufgrund seiner Funktion und Lokalisation *CAV-1*, das im „aggressiveness locus" 7q31.1 lokalisiert ist.
Obwohl *CAV-1* als vermutlich relevantes Gen in die Entstehung einer Vielzahl verschiedener Tumoren involviert ist, gibt es bislang keine Studien, die untersucht hätten, ob dieses Gens eine genetische Prädisposition für das Prostata-Karzinom generell oder seine aggressive Form bedingen kann.

3.5.1 Prädisponieren genetische Veränderungen das *CAV-1*-Gen für das Prostata-Karzinom?

Um diese Situation zu klären, wurde zunächst eine Untergruppe von 24 Patienten aus 10 Familien mit einer aggressiven Form mittels Sequenzierung auf genetische Veränderungen des *CAV-1*-Gens untersucht. Diese Familien zeigten Kopplung der aggressiven Form der Krankheit zu Chromosom 7q31-33.
Bei der gezielten Suche nach Mutationen in den Familien konnten keine genetischen Veränderungen im kodierenden Bereich und im Promotor des *CAV-1*-Gens gefunden werden. Um eine Assoziation zwischen einem Risiko an PCa zu erkranken und Polymorphismen im *CAV-1*-Gen untersuchen zu können, wurde deshalb in der NCBI SNP Datenbank[7] nach Einzel-Basen-Austauschen in intronischen Regionen des Gens gesucht. Die Recherche lieferte vier SNPs im Intron 2 des Gens, die mittels SNaPShot-Analyse genotypisiert wurden.
Die Genotypisierung wurde auf Basis der ddNTP-Primer-Extension durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass ein Primer unmittelbar 5'-wärts der polymorphen Stelle bindet und um genau die gesuchte Base verlängert wird. Die Identifikation des eingebauten

[7] NCBI HumanSNPdb http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/CMD=search&db=snp/

fluoreszenz-markierten Nukleotids übernimmt ein Mehrfarben-Sequenzier-System anhand vier verschiedener Fluoreszenz-Markierungen.

Die Genotypisierung erfolgte an einem ausgewählten Probanden-Kollektiv, das den familiären und sporadischen Patienten geeignete Kontrollpersonen gegenüberstellte. Aus dem Ulmer Kollektiv wurden 191 gesunde Männer zur Untersuchung ausgewählt, denen 105 nicht verwandte betroffene Patienten mit familiärem Prostata-Karzinom sowie 190 sporadische Fälle gegenüberstanden. Die detaillierte klinische Charakterisierung ist in Tabelle 2-1 dargestellt.

Die Genotyp- und Allel-Frequenzen der Kontroll-Gruppe sowie für Personen mit sporadischem und familiärem PCa sind in Tabelle III-3 aufgeführt.

Tabelle III-3: Verteilung der *CAV-1*-Genotypen und die Allel-Frequenzen bei Kontrollen, sporadischen und familiären Fällen (Aus: Haeusler *et al*. (68))

Identität und Lokalisation* der SNPs	Lokalisation	Genotyp	Genotyp-Frequenzen, No. (%)			Allel-Frequenzen (%)		
			Kontrollen	Sporadisch	Familiär	Kontrollen	Sporadisch	Familiär
			n = 191	n = 190	n = 105			
rs1543293:+13431	Intron 2	**CC**	6 (3)	9 (5)	2 (2)	C (16)	C (21)	C (19)
		CG	48 (25)	61 (32)	35 (33)	G (84)	G (79)	G (81)
		GG	137 (72)	120 (63)	68 (65)			
HWE Test		***p-Wert***	**.42**	**.73**	**.52**			
Cochran Armitage Trend Test (Kontrollen vs. Fälle)		***p-Wert***	**0.093**					
rs3815412:+25576	Intron 2	**CC**	15 (8)	12 (6)	5 (5)	C (25)	C (26)	C (24)
		CT	67 (35)	74 (39)	40 (38)	T (75)	T (74)	T (76)
		TT	109 (57)	104 (55)	60 (57)			
HWE Test		***p-Wert***	**.31**	**.81**	**.61**			
Cochran Armitage Trend Test (Kontrollen vs. Fälle)		***p-Wert***	**0.91**					
rs1022436:+28113	Intron 2	**GG**	8 (4)	6 (3)	1 (1)	G (18)	G (17)	G (18)
		CG	52 (27)	53(28)	35 (33)	C (82)	C (83)	C (82)
		CC	131 (69)	131 (69)	69 (66)			
HWE Test		***p-Wert***	**.34**	**.82**	**.18**			
Cochran Armitage Trend Test (Kontrollen vs. Fälle)		*p-Wert*	0.84					
rs3757732:+28588	Intron 2	**AA**	14 (7)	14 (7)	6 (6)	A (26)	A (26)	A (24)
		AC	72 (38)	73 (38)	39 (37)	C (74)	C (74)	C (76)
		CC	105 (55)	103 (54)	60 (57)			
HWE Test		***p-Wert***	**.73**	**.83**	**.92**			
Cochran Armitage Trend Test (Kontrollen vs. Fälle)		***p-Wert***	**0.83**					

*Lokalisation relativ zum ersten Nukleotid des Transkriptionsstarts (nt Position +1): National Center for Biotechnology Information dbSNP identification number.

In diesen Gruppen lagen alle vier untersuchten SNPs im Hardy-Weinberg Gleichgewicht ($p > 0.18$ für alle Gruppen). Für keinen der untersuchten SNPs ergaben sich Unterschiede in der Genotyp-Verteilung zwischen nicht-betroffenen Kontrollen und einer der beiden Patienten-Gruppen unter Verwendung des Cochran Armitage Trend-Test auf dem 5% Niveau der Signifikanz. Auch ein Vergleich der Kontrollen mit allen Fällen (sporadische + familiäre) zeigte keine Assoziation der einzelnen SNPs mit dem Prostata-Karzinom.

Eine leichte, insignifikante Erhöhung von Heterozygoten bei den Betroffenen (p = 0.09) ergab sich für SNP rs1543293. Die allelischen Odds Ratios ergaben eine leichte Riskio-Erhöhung beim Vorhandensein des weniger häufigen C-Allels von rs1543293, bei den sporadischen Fällen (p = 0.07) deutlicher als bei den familiären.

Tabelle III-4: Odds Ratios der *CAV-1*-SNPs bei Fällen und Kontrollen (Aus: Haeusler *et al*. (68))

Identifizierung und Lokalisation[a] der SNPs	Allel	Sporadische Fälle vs. Kontrollen OR[b] (95% CI)	*p*	Familiäre Fälle vs. Kontrollen OR[b] (95% CI)	*p*	Alle Fälle vs. Kontrollen OR[b] (95% CI)	*p*
rs1543293:+13431	C vs. G	1.41 (.97 - 2.05)	**.07**	1.22 (.78 - 1.90)	**.37**	1.34 (.96 - 1.90)	**.09**
rs3815412:+25576	C vs. T	1.02 (.74 - 1.41)	**.90**	.92 (.62 - 1.35)	**.67**	.98 (.73 - 1.33)	**.91**
rs1022436:+28113	G vs. C	1.05 (.72 - 1.53)	**.80**	1.01 (.66 - 1.57)	**.96**	1.04 (.74 - 1.45)	**.84**
rs3757732:+28588	A vs. C	1.02 (.74 - 1.41)	**.90**	.91 (.61 - 1.33)	**.61**	.98 (.73 - 1.31)	**.89**

[a] Lokalisation relativ zum ersten Nukleotid des Transkriptionsstarts (nt Position +1): National Center for Biotechnology Information dbSNP identification number.
[b] OR=odds ratio, 95% CI=95% confidence interval

Dieser Unterschied in der Verteilung kann hauptsächlich den Fällen mit hohem Tumor-Grad (3 oder 4) zugeschrieben werden. Stratifizierte man die Fälle nach diesem Kriterium, war der Unterschied signifikant (p = 0.03); die entsprechende Odds Ratio betrug 1.56 bei einem 95% Confidence Intervall von 1.05-2.33.

Eine Stratifizierung der Fälle gemäß anderer Kriterien (Alter bei Erst-Diagnose, Lymphknoten-Befall, Fern-Metastasen und Tumor-Grad) zeigte keine Assoziation (p > 0.05) zwischen Krankheit und einem der SNPs.

Alle vier SNPs standen im Kopplungsungleichgewicht (LD, linkage disequilibrium) zueinander. Die paarweise Analyse lieferte ein D' größer 0.85. Das bestehende Kopplungsungleichgewicht ist relevant für die Interpretation der beobachteten Assoziation zu SNP rs1543293 und verlangt zugleich die Betrachtung von Haplotypen.

3.5.2 Gibt es eine Assoziation von *CAV-1*-Haplotypen mit dem Prostata-Karzinom-Risiko?

In die Haplotyp-Analyse flossen 590 Chromosomen der Fälle und 382 der Kontrollen ein. Tabelle III-5 gibt die Verteilung der Haplotyp-Frequenzen, die sich aus allen vier SNPs zusammensetzt, unter den betroffenen und nicht-betroffenen Männern wieder. Die Schätzung der Haplotyp-Frequenzen aus den beobachteten Genotypen erfolgte mittels FAMHAP. Es konnten elf Haplotypen definiert werden, deren Frequenzen zwischen Kontrollen und Fällen

verglichen wurden, von denen drei Häufigkeiten größer als 10% aufwiesen. Der Häufigste (g t c c) repräsentierte dabei mehr als 50% der untersuchten Chromosomen. Die Assoziationsanalyse wurde mittels χ^2-Test durchgeführt. Bei Betrachtung der gesamten Stichprobe kam keiner der Haplotypen unterschiedlich häufig in Kontrollen oder Fällen ($p > 0.05$) vor.

Tabelle III-5: Verteilung der Haplotypen bei Fällen und Kontroll-Probanden (Aus: Haeusler *et al.* (68))

Haplotyp	Haplotyp-Frequenzen	
	Betroffene (n = 590)	Nicht-Betroffene (n = 382)
c t c a	0.0077	0.0042
c t c c	0.1868	0.1529
c c c c	0.0017	0.0000
c t g c	0.0037	0.0000
g c c a	0.0785	0.0782
g c c c	0.0052	0.0006
g c g a	0.1603	0.1651
g c g c	0.0051	0.01
g t c a	0.0074	0.0114
g t c c	0.5397	0.5747
g t g a	0.0038	0.0029

Mit einer Ausnahme ergab die anschließende Stratifizierung der Fälle gemäß klinischer Kriterien keine Assoziation im Hinblick auf Alter bei Diagnosestellung, dem Lymphknoten-Befall, Fern-Metastasen und dem Tumor-Grad mit einem der SNPs ($p > 0.05$). Hingegen zeigte sich bei der Stratifizierung nach dem Tumor-Stadium, dass das zuvor assoziert befundene Allel C des SNPs rs1543293 eine Gruppe von vier Haplotypen definiert, die allesamt häufiger in Fällen mit lokal fortgeschrittenem Tumor (T3/4) zu finden sind als in Kontrollen. Die gefundene Assoziation mit dem SNP rs1543293 wird also durch den häufigen Haplotyp c t c c definiert. Jedoch können andere das C-Allel tragende Haplotypen bzgl. eines möglichen Krankheitseffektes aufgrund ihrer niedrigen Allel-Frequenzen nicht getrennt bewertet werden.
Dies gilt auch für Haplotypen, die aus Untergruppen benachbarter SNPs bestehen, wenn man das ganze Sample untersucht.

In Tabelle III-6 sind die Risiko-Haplotypen, die sich nach Stratifizierung auf den Tumor-Grad T3/T4 definieren ließen, dargestellt.

Tabelle III-6: Risiko-Haplotypen nach Stratifizierung auf Tumor-Grad T3/T4 (Aus: Haeusler *et al.* (68))

Lokalisation	Haplotyp	Frequenz der Fälle	Frequenz der Kontrollen	*p*
SNP1	c * * *	0.226	0.158	0.030
SNP1, SNP2	c t * *	0.219	0.157	0.049
SNP1, SNP2, SNP3	c t c *	0.220	0.158	0.043

Beschränkt man sich ausschließlich auf Patienten mit hohem Tumor-Grad, treten einige Haplotypen von nahe beieinander liegenden SNPs, die alle das C-Allel von rs1543293 einschließen, in Betroffenen im Vergleich zu Nicht-Betroffenen signifikant häufiger auf (0.226 vs. 0.158, p = 0.03; Tabelle III-6).

4 Diskussion

Für die Tumor-Entstehung relevante Gene sind in aller Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie entweder regelmäßig bei der Entstehung der entsprechenden Tumoren von Mutationen betroffen sind oder dadurch, dass eine bereits im konstitutiven Genotyp einer betroffenen Person vorhandene Mutation zur Tumorentstehung disponiert. Beide Charakteristika sind z. B. beim sporadischen bzw. familiären Retinoblastom gegeben und prädisponierende Mutationen finden sich beim Mamma-Karzinom in den Genen *BRCA1* und *2*. Sofern die Penetranz konstitutiver Mutationen hoch ist, kann das verantwortliche Gen durch Kopplungsanalyse und Positionsklonierung identifiziert werden. Bei unvollständiger Penetranz wird es immer schwieriger, eine Kausalbeziehung zwischen der disponierenden Mutation und der Tumor-Entstehung aufzufinden und nachzuweisen. Die Kopplungsanalyse versagt, wenn neben unvollständiger Penetranz auch Heterogenität vorliegt, so dass Hinweise auf eine disponierende genomische Variante nur noch aus Assoziationsstudien zu gewinnen sind. Wird hierbei tatsächlich eine Assoziation gefunden, bedarf es allerdings zusätzlicher funktioneller Belege, um einen Zusammenhang zwischen dem betreffenden Gen und der Tumor-Entstehung wahrscheinlich zu machen.

In einer Situation wie beim Prostata-Karzinom (eine Vielzahl sporadischer Fälle steht einem Anteil genetisch bedingter familiärer gegenüber) gibt es im Wesentlichen zwei Untersuchungsansätze, um genetische Faktoren zu identifizieren, wobei beide Ansätze auf unterschiedliche Probanden-Kollektive zurückgreifen, unterschiedliche Typen von Prädispositionen erfassen und damit zu ganz verschiedenen Aussagen führen.

Der eine Ansatz ist die klassische Kopplungsanalyse, wie sie seit langem mit über das gesamte Genom verteilten Markern als „*genome wide scan*“ durchgeführt wird und als Ziel die Identifikation eines entsprechenden Gens durch eine Positionsklonierung hat.

Der zweite Ansatz, der im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde und hier näher diskutiert werden soll, prüft in Form einer Fall-Kontroll-Studie, ob bestimmte Allele eines Gens zum Auftreten oder zur Manifestation eines Prostata-Karzinoms beitragen und deshalb bei Betroffenen häufiger zu finden sind als bei Kontrollen. Dieser Ansatz hat zur Voraussetzung, dass der zu untersuchende DNA-Marker sehr eng benachbart (i.d.R. nur einige wenige tausend Basenpaare) bei derjenigen Sequenz-Veränderung der DNA liegt, die für die Risiko-Erhöhung verantwortlich ist. Bislang sind solche Assoziationsstudien wegen der hohen Zahl notwendiger Marker nur innerhalb bzw. bei Kandidaten-Genen möglich.

Diese Situation war für das *CAV-1*-Gen und das Prostata-Karzinom gegeben. Den aus der Kopplungsanalyse stammenden Hinweisen auf die Relevanz dieses Gens für die Entstehung eines aggressiven Prostata-Karzinoms wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit deshalb zunächst mit einer Suche nach relevanten Mutationen nachgegangen und diese durch Assoziationsstudien in einem sehr viel größeren Kollektiv ergänzt.
Parallel hierzu wurde in einem zweiten Ansatz den für das Prostata-Karzinom als typisch beschriebenen Expressionsverlust des *CAV-1*-Gens systematisch untersucht und es konnte durch funktionelle Untersuchungen gezeigt werden, dass dieser Expressionsverlust durch Methylierung des Promotors bedingt ist.

4.1 Assoziation zwischen *CAV-1* und dem Prostata-Karzinom

In der für das Prostata-Karzinom typischen Situation, dass bei Manifestation der Erkrankung die Eltern kaum mehr verfügbar sind, hat eine Assoziationsstudie deutliche Vorteile. Noch deutlicher wird dies, wenn man bedenkt, dass selbst in der heute seltenen 4-Kinder-Familie und bei einem autosomal-dominanten Erbgang mit vollständiger Penetranz ein Großteil der durch ein solches Gen bedingten Fälle sporadisch erscheint. In Sammlungen von Familien für Linkage-Analysen gehen solche Familien zwangsläufig nicht ein und der hieraus resultierende Selektionseffekt bleibt schwer abschätzbar. Nahe liegend erscheint es, anzunehmen, dass einerseits in den Familien-Sammlungen sowohl die Penetranz eines prädisponierenden Gens als auch dessen Häufigkeit überschätzt werden. Andererseits darf man vermuten, dass in epidemiologischen Studien der Anteil der durch prädisponierende Gene verursachten Fälle deutlich unterschätzt wird und dementsprechend auch die Frequenz eines solchen prädisponierenden Allels. Beide Typen von Studien sind in den letzten Jahren für das Prostata-Karzinom mehrfach mit sehr unterschiedlichen Erfolgen durchgeführt worden.

4.1.1 Assoziation des Tumor-Suppressor-Gens *CAV-1* mit dem PCa

Mittels Assoziationsstudien kann für einzelne Gene geprüft werden, ob eines der jeweiligen Allele mit einer erhöhten Suszeptibilität für das Prostata-Karzinom einhergeht. Funktionelle Hinweise auf Gene, die in die Initiation oder Progression des Tumors

involviert sein könnten, entscheiden darüber, ob eine solche Analyse für das betreffende Gen lohnend scheint. Prinzipiell sind viele Ansätze von Assoziationsstudien zu potentiell an der Entstehung des Prostata-Karzinoms beteiligten Genen klar und sinnvoll, wobei Gene, die an der DNA-Reparatur (unter anderem *BRCA1* und *BRCA2*) oder an der Differenzierung und Proliferation beteiligt sind, sowie Tumor-Suppressor- und Onkogene sicherlich am meisten Erfolg versprechen. Die Vielzahl interessanter Gene macht eine sinnvolle Auswahl geeigneter Kandidaten-Gene schwierig, sodass vorausgehende funktionelle Untersuchungen am Tumor selbst diese Auswahl erleichtern dürften.

Zahlreiche molekular- und zytogenetische Ansätze, einschließlich Linkage- und LOH-Untersuchungen, lieferten Hinweise auf ein Prostata-Karzinom-Gen oder -Gene auf Chromosom 7. Dabei spielt das Chromsomensegment q22-q32 eine besondere Rolle (3; 31; 49; 80; 82; 83; 102; 186; 219). Mehr als 50% der untersuchten Tumoren hatten LOH von 7q. Diese chromosomale Region enthält zahlreiche Tumor-Suppressor-Gene, die mit dem PCa assoziiert sind (192; 217).
Andererseits haben auch Kopplungsanalysen einen Hinweis auf die Beteiligung dieser Region an der Suszeptibilität zum Prostata-Karzinom bzw. am Krankheitsverlauf ergeben. *Witte et al*. verwendeten den Gleason Score als Maß für die Aggressivität der Erkrankung bei Brüdern und die Ergebnisse dieser „sib pair"-Analyse lieferten u.a. 7q als Kandidaten-Region für PCa-Aggressivitätsgene (207). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte Kopplung des Prostata-Karzinoms zu Chromosom 7q31-32 in zehn Familien mit einer aggressiven Form der Krankheit nachweisen (139). Der Zusammenhang von 7q mit dem aggressiven PCa macht die Präsenz eines Tumor-Suppressor-Gens (TSG) wahrscheinlich.

Aufgrund seiner chromosomalen Lokalisation auf 7q31.1 und seiner Eigenschaft als TSG ist *CAV-1* ein guter Kandidat, der zur Progression und Aggressivität des Prostata-Karzinoms beitragen könnte. Obwohl es etliche Hinweise darauf gibt, dass *CAV-1* in vielen verschiedenen Tumoren eine entscheidende Rolle spielt, gab es bis jetzt noch keine Daten aus Untersuchungen, die genomische Varianten des *CAV-1*-Gens als Ursache für eine genetische Prädisposition für das Prostata-Karzinom in Erwägung ziehen.
In der hier vorgelegten Arbeit wurden Hinweise aus Kopplungsanalysen anhand von Mutationsuntersuchungen für das *CAV-1*-Gen verfolgt und durch Assoziationsstudien komplementiert. Im weiteren Verlauf wurde im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie explorativ untersucht, ob es eine Assoziation zwischen der Aggressivität des Prostata-

Karzinoms und genetischen Varianten im *CAV-1*-Gen gibt. Zur Analyse von Genotyp-Phänotyp-Assoziationen ist die Fall-Kontroll-Studie eine sehr effektive Methode. Der Vorteil liegt in der Verfügbarkeit von Fällen, die sofort genotypisiert und mit Kontrollen verglichen werden können. Da beim Sequenzieren der exonischen und der Promotor-Region der 24 familiären Fälle keine Veränderungen gefunden werden konnten, die direkt für das Krankheitsrisiko relevant sind, wurden vier intronische SNP aus der NCBI SNP Datenbank gewählt. Mit diesen SNPs sollte eine Assoziation zwischen PCa und Haplotypen des *CAV-1*-Gens untersucht werden. Die vier genotypisierten SNPs umschließen 15 kb des zweiten Exons des *CAV-1*-Gens und lagen in starkem Kopplungsungleichgewicht zueinander. Aus den Genotypen der Kontrollen und Patienten konnten 11 Haplotypen ermittelt werden, die eine gute Chance bieten, mit den gewählten Markern jede ursächliche Variante in diesem Locus zu erfassen.

In einem ersten Schritt wurden die Genotyp- und Allel-Häufigkeiten der einzelnen Polymorphismen bestimmt und als grober Anhaltspunkt für ein PCa-Risiko untersucht. Der Vergleich von Kontrollen, sporadischen und familiären Fällen lieferte zwar keine signifikanten Unterschiede, aber das C-Allel des SNP (rs1543293) zeigte einen etwas größeren Anteil an Heterozygoten unter allen unselektierten betroffenen Probanden. Diese Assoziation des weniger häufigen C-Allels von rs1543293 wurde signifikant bei Stratifizierung auf Patienten mit Stage 3 und 4 Tumoren ($p = 0.03$). Diese Beobachtung ist bemerkenswert im Hinblick auf die frühere Kopplungsanalyse aus unserer Arbeitsgruppe, in der Chromosom 7q bei aggressiven Prostata-Karzinomen beteiligt ist und nicht so sehr das Erkrankungsrisiko *per se* beeinflusst (139).

Im hier untersuchten Kollektiv wurde bzgl. anderer Indikatoren für ein aggressives PCa, wie z.B. frühe Diagnose, hoher histopathologischer Tumor-Grad sowie schlechter Krankheitsverlauf keine Assoziation beobachtet.

4.1.2 Assoziation eines *CAV-1*-Haplotyps mit dem Prostata-Karzinom-Risiko

Wie zu erwarten war, deckte die Haplotyp-Analyse beim Vergleich unselektierter PCa-Probanden mit Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in den Allel-Frequenzen auf. Allerdings stellte sich heraus, dass eine Assoziation zwischen dem Risiko an PCa zu erkranken und dem SNP rs1543293, die nach Stratifizierung auf hohen Tumor-Grad (T3/4) beobachtet wurde, auf einer Gruppe von vier Haplotypen basiert, von denen jeder in Fällen häufiger als in Kontrollen vorkommt. Einer dieser Haplotypen (c t c c) zeigte eine mittlere

Allel-Frequenz (p = 0.15), während es sich bei den Übrigen (c t c a, c c c c, c t g c) um seltene Allele handelt. Aus diesem Grund spiegelt sich die gefundene Assoziation mit SNP rs1543293 im Allgemeinen in dem häufigen Haplotyp c t c c wieder. Andere Haplotypen, die ebenfalls das C-Allel tragen, lassen sich aufgrund ihrer niedrigen Allel-Frequenzen nicht separat auf einen möglichen krankheitsverursachenden Effekt hin untersuchen. Der intronische Basenaustausch rs1543293 dürfte keine für die Funktion des Gens relevante Position betreffen und erklärt damit wohl nicht ursächlich die gefundene Assoziation. Es ist eher anzunehmen, dass die Assoziation auf einer kausalen Sequenz-Variante beruht, die innerhalb des spezifischen Haplotyps liegt.

Kopplung des aggressiven PCa auf 7q31-33 war bereits in unseren PCa-Familien aus Deutschland gezeigt worden (139). In dieser Studie war als Kriterium für ein aggressives Karzinom das Auftreten von mindestens zwei Tumoren mit hohem Grading verwendet worden. Dieses Kriterium ist zwar nicht identisch mit dem hier wegen der Verfügbarkeit der entsprechenden Information verwendeten Staging, aber in der überwiegenden Zahl der Fälle dürften beide Kriterien zusammenfallen oder zumindest die gleiche Tendenz anzeigen.
Betrachtet man die zehn wichtigen Familien mit dem aggressiven Prostata-Karzinom findet sich der häufigste assoziierte Haplotyp (c t c c) in drei Stammbäumen. Die Mehrzahl (7 von 9) der genotypisierten Fälle in diesen Familien trug das entscheidende Allel. Von den sieben betroffenen Trägern des Haplotyps c t c c hatten sechs ein hohes Tumor-Stadium und fünf ein lokal fortgeschrittenes Prostata-Karzinom (T3/T4). Aufgrund der geringen Größe des Kollektivs dürften diese Daten nur vorläufige Ergebnisse darstellen, aber nichtsdestotrotz zeigen sie eine Ko-Segregation des potentiellen Risiko-Allels mit den beiden Kriterien für ein Prostata-Karzinom mit schlechter Prognose.

4.1.3 Limitierung der Mutationsanalyse und das Stratifizierungsproblem

In der gleichen Untergruppe an Familien wurde das *CAV-1*-Gen sequenziert, um genetische Veränderungen im offenen Leserahmen und der Promotor-Region zu finden. Die Mutationsanalyse umfasste den 537 bp großen offenen Lese-Rahmen, 435 bp flankierender intronischer und UTR-Sequenz und 356 bp Promotor-Region des *CAV-1*-Gens. Bei keinem der untersuchten Probanden, einschließlich derer, die ein Allel tragen, das mit hohem Tumor-Stadium assoziiert ist, konnte eine Mutation gefunden werden. Die

angewendeten Methoden (EMD und Sequenzierung) sind zwar sehr effiziente Methoden zur Detektion von Basenaustauschen, kleineren Deletionen und Insertionen, sofern diese vollständig innerhalb des zur PCR-Amplifikation verwendeten Primerpaars liegen. Größere Deletionen können jedoch mit PCR-basierten Screeningverfahren nicht erfasst werden, da in einem solchen Fall die Ziel-Region allein anhand des intakten Allels amplifiziert werden würde. Somit stellen größere Deletionen eine nicht zu beurteilende Fehlerquelle dieser beiden Methoden dar. Um derartige Fehlerquellen so weit wie möglich auszuschließen und um die Suche auf Deletionen auszuweiten, wurden die Befunde mittels einer Fragment-Analyse verifiziert.
Da zahlreiche LOH-Studien Verlust zumindest eines Allels in PCas berichten (89; 102; 186), war es interessant DNA von Prostata-Karzinom-Patienten dieser Analyse zu unterziehen. Zu diesem Zweck wurden 50 Personen aus 14 Familien aus dem Ulmer Kollektiv auf Allel-Verlust infolge von Deletionen in der konstitutiven DNA untersucht. In der Literatur wird zwar LOH in Tumoren berichtet, aber es gibt keine Untersuchungen zu Deletionen in der konstitutiven DNA. In unserem Sample wurden allerdings auch keine Deletionen des *CAV-1*-Gens bei PCa-Patienten beobachtet.
Mit keiner der hier angewendeten Methoden konnten genetische Veränderungen im *CAV-1*-Gen gefunden werden. Folglich sind weitere Untersuchungen nötig, um eine kausale Sequenz-Variante zu identifizieren, die im potentiellen Risiko-Haplotyp liegt. Als Ursachen kommen nicht-kodierende regulatorische Elemente des *CAV-1*-Gens in Frage oder benachbarte Gene, falls ein weitreichendes LD sich auf flankierende Regionen des Gens erstrecht.

Obwohl sich keine deletären Mutationen im kodierenden und Promotor-Bereich des Gens finden ließen, die *CAV-1* eindeutig als krankheitsursächliches Gen auf 7q31.1 identifiziert hätten, gibt es eine Assoziation eines Haplotyps mit höherem Tumor-Grad (T3/4) des Prostata-Karzinoms.

Erschwert werden Assoziationsstudien zum PCa zudem ganz beträchtlich dadurch, dass ein hoher Prozentsatz aller Männer ein klinisch inapparentes Karzinom trägt, aber von diesen stummen Trägern nur etwa jeder fünfte tatsächlich manifest erkrankt. Wieder nur ein Teil der manifesten Prostata-Karzinome ist so maligne, dass die Betroffenen daran versterben. Weiterhin hängt die Diagnose individuell - aber auch die Diagnose-Häufigkeit bezogen auf die Population - entscheidend von den eingesetzten diagnostischen Methoden (z. B. PSA-

Screening) ab. Infolge dieser Situation ist es schwierig, geeignete Kontrollen zu definieren. Ein gelegentlich hierfür beschrittener Weg besteht in der Selektion älterer Männer, die nicht nur symptomfrei, sondern auch im Sinne üblicher Vorsorge-Untersuchungen (PSA-Screening und digitale-rektale Untersuchung) kein Prostata-Karzinom tragen. Hieraus sollte eine Selektion gegen Risiko-Allele resultieren, die eine bessere Chance bietet, die Signifikanzschwelle zu erreichen. Andererseits könnte man sich auf das manifeste Prostata-Karzinom beziehen und die Allel-Häufigkeit einfach mit denen unselektionierter „gesunder" Fälle der Normalbevölkerung vergleichen, also etwa Blutspendern, was eher eine Unterscheidung zwischen symptomfreien Karzinom-Trägern und manifest Erkrankten ermöglicht. Welcher Typ von Kontrolle angemessen ist und benötigt wird, hängt damit wesentlich vom Stadium bzw. Typ des Prostata-Karzinoms ab, auf das untersucht werden soll und damit auch vom Wirkmodus des jeweiligen Kandidaten-Gens. Auf Seiten der betroffenen Probanden stellt sich ein ähnliches Problem. Das Tumor-Stadium bei Diagnose-Stellung bzw. Therapie-Beginn lässt nur sehr bedingt auf Progredienz und Prognose der Erkrankung schliessen, obwohl dies die eigentlichen Ziel-Größen für eine Assoziationsstudie zum aggressiven Prostata-Karzinom wären.

4.1.4 Somatische Veränderungen in PCa-Zelllinien

Da Zelllinien, die aus entsprechenden Tumoren abgeleitet werden, häufig einen Hinweis auf relevante genetische Veränderungen geben können, wurden die PCa-Zelllinien ebenfalls der Mutationsanalyse unterzogen. Die *CAV-1*-Referenz-Sequenz aus der NCBI-Datenbank wurde an normalen diploiden Fibroblasten verifiziert. In von normalem Prostata-Gewebe stammenden Linien PNT1A, PNT1B und PNT2, sowie den Tumor abgeleiteten Zelllinien DU-145, LNCaP und PC-3, konnten keine Veränderungen in der kodierenden Sequenz des *CAV-1*-Gens gefunden werden. Genau wie in den zehn Index-Personen der Familien, die auf 7q Kopplung zur aggressiven Form des Prostata-Karzinoms aufwiesen, ließ sich auch in den Zelllinien keine Sequenzveränderung im *CAV-1*-Gen identifizieren, die in einem Verlust des Proteins resultieren würde.

Aus Mamma-Karzinomen ist die „invasion activating breast cancer mutation" im Codon 132 (P132L) (73) beschrieben und in fünf Tumoren des Mund-Nasen-Rachenraums wurde von acht Mutationen berichtet (71), die alle in Exon 3 gefunden wurden. Bei diesen Mutationen handelte es sich um eine Missense-Mutation (Ile141Phe) und sieben stille Mutationen der Codons 82, 84, 112, 124, 132, 161 und 163. Keine dieser Mutationen konnte aber in den untersuchten PCa-Zelllinien gefunden werden. Eine ähnliche Prolin zu

Leucin-Mutation (P104L) wurde im *CAV-3*-Gen bei Patienten mit Gliedergürtel-Muskel-Dystrophie (57; 128) entdeckt. Interessanterweise verhalten sich sowohl die *CAV-1*-Mutation im Brustkrebs als auch die *CAV-3*-Mutation der Dystrophie-Patienten dominant-negativ und verursachen die intrazelluäre Retention der Wild-Typ-Caveoline auf dem Level des Golgi-Komplexes (54; 105).
Außerdem gibt es keinen Hinweis auf LOH am *CAV-1*-Locus bei LNCaP, der den Verlust der Expression in dieser Zelllinie erklären könnte. Dies konnte durch die durchgeführte Fragment-Analyse mit verschiedenen polymorphen Mikrosatelliten-Markern (D7S486, D7S522 und D7S523), die die kritische Region 7q31.1 überspannten, belegt werden.

4.2 Funktionelle Untersuchungen zum *CAV-1*-Gen

4.2.1 Das *CAV-1*-Gen als potentielles Tumor-Suppressor-Gen auf 7q31.1 unterliegt keinem Imprinting

Der Expressionsverlust eines TSG, der letztlich zur Tumor-Entstehung führt, setzt eine Mutation in beiden Allelen, oder eine Mutation und LOH voraus. Gene, die dem Imprinting unterliegen, werden aber normalerweise bereits nur von einem elterlichen Allel transkribiert. Sollte ein TSG in einer Region lokalisiert sein, die dem Imprinting unterliegt, wäre nur noch eine einzige Mutation erforderlich, um das TSG zu inaktivieren und damit die Entstehung eines Tumors auszulösen.
Das Interval 7q31-q32 ist bekanntermaßen eine Region, die dem Imprinting unterliegt. In dieser Region sind die Gene *MEST* (93) und *γ2-COP* (12) lokalisiert, für die eine uni-parentale Expression aufgezeigt wurde.
Da das *CAV-1*-Gen in enger Nachbarschaft zum Imprinting-Cluster auf 7q32 lokalisiert ist, wurde in dieser Arbeit die allel-spezifische Expression von *CAV-1* untersucht. Ein mono-allelischer Nachweis in revers transkribierter RNA trotz Heterozygotie auf DNA-Ebene würde einen starken Hinweis auf Imprinting liefern. Zur Unterscheidung zwischen maternalen und paternalen Allelen in heterozygoten DNA-Proben wurde ein exprimierter SNP (eine C->A-Substitution in der 3´UTR) genutzt. Hiermit konnten kultivierte Fibroblasten einiger Familienmitglieder, beide Eltern mit mindestens einem Kind, untersucht werden, wobei zwei der sechs Familien heterozygot und damit informativ waren. Die verifizierte Heterozygotie auf DNA-Ebene fand sich auch auf RNA-Ebene in den beiden untersuchten Familien. Offensichtlich werden in Fibroblasten beide Allele

transkribiert, was bedeutet, dass eine Allel-spezifische Abschaltung der Expression in Fibroblasten und damit ein Imprinting ausgeschlossen werden kann.
Imprinting kann in Abhängigkeit vom Gewebe variieren. Aus diesem Grund wurde nach mono-allelischer Expression in verschiedenen Geweben von heterozygoten Feten gesucht. Untersucht wurden Skelett-Muskel, Haut, Gehirn, Niere, Nebenniere, Leber, Plazenta, Darm, Lunge, Zunge, Chorion und Amnion. Die Sequenz-Analyse der cDNAs dieser Gewebe der heterozygoten Feten zeigte eine mono-allelische Expression von *CAV-1* nur in fötaler Lunge und Zunge. Allerdings gibt es keine Hinweise darauf, von welchem der parentalen Allele die Transkription erfolgt, da keine DNA bzw. RNA der Eltern verfügbar war.
Aufgrund der Verfügbarkeit von Elterntieren, der Möglichkeit von Kreuzungen bei der Maus und der allelischen Unterschiede für die meisten Marker bei den hier untersuchten F1-Hybriden der Stämme *Mus musculus* und *M. spretus* eignet sich diese Spezies besonders gut für die Untersuchung auf allel-spezifische Transkription. Für die Untersuchungen an der Maus wurde ein exprimierter stamm-spezifischer Basenaustausch im *cav-1*-Gen (6-A2) zur Differenzierung der Allele verwendet. Die Untersuchungen zur gewebe-spezifischen mono-allelischen Transkription bei der Maus, die an Leber, Milz und Muskel, sowie Zunge und Gehirn durchgeführt wurden, zeigen, dass *cav-1* in dieser Spezies nicht imprintet ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde weisen darauf hin, dass das *CAV-1*-Gen insgesamt nicht einem Imprinting unterliegt. Da es jedoch in humaner fötaler Lunge und Zunge nur von einem der elterlichen Allele transkribiert wird, kann man eine gewebe-spezifische mono-allelische Transkription nicht ausschließen. Leider konnte Prostata-Gewebe nicht untersucht werden.

4.2.2 Das *CAV-1*-Gen weist zwei Transkripte auf

Das *CAV-1*-Gen kodiert zwei Protein-Isoformen (α und β), von denen angenommen wurde, dass sie aus einem einzigen Transkript entstehen (63). Beide Protein-Isoformen besitzen einen identischen hydrophoben Abschnitt an AS, die scaffolding Domäne und den acetylierten C-Terminus. Die 31 N-terminalen AS sind jedoch nur in *CAV-1α* zu finden. Zunächst war man davon ausgegangen, dass das Gen eine einzige mRNA kodiert und es wurde ausgeschlossen, dass diese beiden Isoformen aufgrund differentiellen Splicings entstehen (168). Es wurde daher angenommen, dass die β-Isoform durch Nutzung eines

internen Translationsstarts an Position 32 entsteht, der einen um 31 Aminosäuren (AS) kürzeren Amino-Terminus als die α-Isoform zur Folge hat und dementsprechend die Isoformen durch alternierende Translationsinitiation entstehen (168). Weiter konnte ausgeschlossen werden, dass die β-Isoform das Produkt einer Artefakt-Degradation ist, da diese Isoform *in vivo* selektiv phosphoryliert wird (166). Eine weitere Hypothese zur Entstehung wäre, dass *CAV-1* einer schnellen co- oder prost-translationalen proteolytischen Prozessierung durch eine spezifische Aminopeptidase oder einer Endopeptidase unterliegt, was zur β-Isoform führt. Die erschien aber weniger wahrscheinlich, da beide *CAV-1*-Isoformen direkt nach der CAV-Synthese präsent sind.

Im Zuge meiner Expressionsstudien stellte sich heraus, dass es ein zweites *CAV-1*-mRNA-Transkript gibt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals, zu zeigen, dass dieses zweite Start-Codon verwendet wird und beide mRNAs nachweisbar sind. Damit war gezeigt, dass die beiden humanen Isoformen nicht wie bislang angenommen von einer mRNA, sondern von zwei Transkripten kodiert werden. Meine Untersuchungen deckten exprimierte Sequenzen im Intron 1 des Gens auf, was sich im Sinne einer alternativen Spliceform deuten lässt. Der Transkriptionsstart dieser RNA liegt in Intron 1. Die genaue Position des Transkriptionsstarts blieb jedoch ungeklärt. Vor dem Transkriptionsstart ist ein für dieses Transkript verantwortlicher Promotor zu erwarten, also ebenfalls in Intron 1. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass *Engelman et al*. (44) eine stärkere Promotor-Aktivität in einem Promotor/Intron 1-Konstrukt als im Promotor-Konstrukt gefunden haben.

Der zweite Promotor liegt also vermutlich in Intron 1, da die β-Isoform nicht durch alternierende Nutzung eines weiteren Start-Codons in Exon 2 ausgehend von einer mRNA resultiert, sondern durch ein zweites Transkript gebildet wird.

CAV-1 besitzt ein zweites Methionin (ATG) an Position 32 (Abbildung IV-1), das in jeder bisher sequenzierten *CAV-1*-cDNA konserviert ist, was die Möglichkeit einer alternierenden Initiation der Translation wahrscheinlich macht. Dieses Methionin könnte als interner Start während der Initiation der Translation fungieren, was zu zwei Isoformen direkt nach der Synthese führen würde. Die Folge wäre eine um etwa 3 kDa kleinere β-Isoform, der spezifische N-terminale Protein-Sequenzen (AS 1-21) fehlen. Alternierende Initiation der Translation von einem einzigen mRNA-Transkript, wobei zwei Isoformen entstehen, ist nicht ungewöhnlich und findet sich z.B. auch beim Progesteron-Rezeptor (25) und dem Hefe-Gen MOD5 (179).

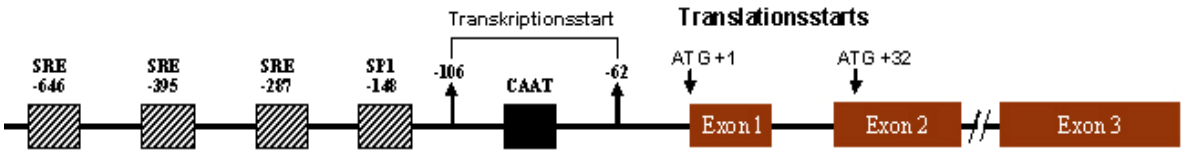


Abb. IV-1: Ein Teil des 5´-Promotors sowie Exon 1-3 des humanen *CAV-1*-Gens. Im Promotor befinden sich drei potentielle Sterol Regulatory Elements (SRE), eine CAAT-Box und eine SP1-Konsenus Sequenz. Zwei Transkriptionsstartstellen finden sich an Position -106 und -62 relativ zum Translationsstart 1, der als ATG+1 bezeichnet wird. Der zweite Translationsstart befindet sich an Position 32. Modifiziert nach: Bist A *et al.* (11)

Ob ein bestimmtes Methionin als Translationsstart fungiert, wird zum Teil durch sog. Kozak-Sequenzen (Abbildung IV-2) determiniert, die um das gegebene Methionin liegen. In der Tat stimmt das Methionin an Position 32 in der *CAV-1*-Sequenz mit der Kozak-Konsensus-Sequenz besser überein als das Start-Codon an Position 1.

-3 +4	
G C C (A/G) C C **A U G** G	Konsensus
G C C A C C **A U G** U	ATG+1
G C C G C C **A U G** G	ATG+32

Abb. IV-2: Die Kozak-Konsensus-Sequenz. Die Konsensus-Sequenz des Kozak-Elements zur Initiation der Translation (oben) im Vergleich zur Nukleotid-Sequenz am 1. Methionin des humanen *CAV-1*-Gens (M-1) bzw. des 2. Methionin-Start-Codons an Position 32 (M-32). Das A des Start-Codons wurde *per definitionem* als +1 bezeichnet (Kozak M (1991) J. Biol. Chem. 266, 19867-19870). Die Nukleotide an den Positionen -3 und +4 sind für die Wahl eines AUG als Start relevant. Modifiziert nach: Scherer PE *et al.* (168)

Die β-Isoform von *CAV-1* entsteht aber offensichtlich nicht durch die alternierende Nutzung eines ATG in Exon 2 auf Translationsebene, sondern bereits auf der Ebene der Transkription durch eine mRNA-Isoform. Dies wurde in der Zwischenzeit auch von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet und publiziert (94).

Die Untersuchung zur Verteilung der Expression in den PCa-Linien ergab, dass in fast allen Zelllinien sowohl die α- als auch die β-Isoform des *CAV-1*-Gens exprimiert werden. Nur LNCaP exprimiert keines der beiden Transkripte. Die Expressionsstärke variiert zwischen den einzelnen Linien, wobei das *CAV-1*β-Transkript in allen PCa-Linien in deutlich geringerer Menge vorhanden ist.

4.2.3 Die Expression des *CAV-1*-Gens

Aufgrund seiner Transformations-supprimierenden Eigenschaft in kultivierten Zellen würde man erwarten, dass Tumoren eine Reduktion der *CAV-1*-Expression aufweisen. Dennoch variiert der Level der *CAV-1*-Expression und ist abhängig vom Tumor-Zell-Typ vermindert, unverändert oder hoch-reguliert. Innerhalb von Karzinomen, die vom gleichen Gewebe stammen, ist die *CAV-1*-Expression in den meisten Fällen einheitlich. So ist z.B.

ein verminderter *CAV-1*-Level für Ovarial-, Lungen- und Mamma-Karzinome typisch. Auf der anderen Seite wird *CAV-1*-Überexpression durchweg in Blasen-, Ösophagial-, Thyroideal- und Prostata-Karzinomen gefunden (147). Beide Isoformen des CAV-1-Proteins, die durch unabhängige Transkripte des gleichen Gens entstehen, werden nahezu ubiquitär in verschiedenen Geweben (außer in Leukozyten und Gehirn) sowie in allen Prostata-Zelllinien (außer LNCaP) gleich stark exprimiert.

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Metastasierung von einer *CAV-1*-Hoch-Regulation begleitet wird (191). *CAV-1* wird sowohl im Maus-Zell-Kultur (212) als auch in humanen Prostata-Karzinom-Metastasen hochreguliert gefunden (213). In humanen Prostata-Tumoren korreliert die *CAV-1*-Expression positiv mit dem Gleason Score, der extra-prostatischen Ausdehnung und Lymph-Knoten-Beteiligung (162; 213). Außerdem ist *CAV-1* hoch reguliert in primären und metastatischen PCa nach Androgen-Entzugs-Therapie (109). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Berichten über eine verringerte bis fehlende *CAV-1*-Expression in PCa-Zellen (147; 185).

4.2.4 Keine Expression von *CAV-1* in LNCaP

Sowohl Northern Blot und RT-PCR als auch der direkte Protein-Nachweis mittels Western Blot zeigten deutlich, dass in der aus Metastasen etablierte Prostata-Karzinom-Zelllinie LNCaP keine Transkription und Translation von *CAV-1* stattfindet. Hingegen waren beide Isoformen des *CAV-1*-Gens in allen anderen hier untersuchten PCa-Zelllinien, d.h. sowohl in von normalem gesunden prostatischem Gewebe stammenden als auch in von Karzinom-gewebe stammenden Zell-Kulturen eindeutig nachweis- und detektierbar, auch wenn die Expression zwischen den Zelllinien in ihrer Stärke variierte.

Die Beobachtung, dass die *CAV-1*-Expression von der Proliferation abhängt, könnte die Expressionsunterschiede durch unterschiedliche Proliferationsraten erklären. *Cui et al*. konnten für ihre Prostata-Ca-Linien PC-3 und DU-145 eine mäßige immun-histochemische Färbung mit dem *CAV-1*-Antikörper zeigen, wobei proliferierende Zellen eine höhere Immunoreaktivität aufwiesen als „reife“ Zellen (32).

Die hier durchgeführte Expressionsanalyse ergab für die Tumor-Zelllinien eine hohe Expression von *CAV-1* in der Zelllinie PC-3 im Gegensatz zu DU-145 und LNCaP. Es ist nicht bekannt, ob dieser hohen *CAV-1*-Expression der Linie PC-3 eine Amplifikation von 7q zugrunde liegt oder ob sie eine andere Ursache hat.

Der Level der *CAV-1*-Expression, der mittels Northern Blot und RT-PCR bestimmt wurde, korrelierte gut mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse. Alle Zelllinien, sowohl von

Karzinom-Gewebe als auch von gesundem Prostata-Gewebe abgeleitete, zeigten auf RNA- und Protein-Ebene unterschiedlichen Mengen an *CAV-1*-Expression. PNT1A-Zellen exprimieren *CAV-1* am stärksten, während LNCaP kein Transkript und folglich auch kein Protein-Produkt exprimiert. Nach Befunden aus einem anderen Labor exprimieren LNCaP-Zellen aber sehr wohl *CAV-1*-Protein (147). Diese Unterschiede gehen eher auf Heterogenität unter den Sub-LNCaP-Linien als auf Kulturbedingungen oder unterschiedliche hohe Passagenzahlen zurück. Eigene Versuche zum Einfluss der Kulturbedingungen zeigten jedoch keinerlei Effekt auf die *CAV-1*-Expression. Auch die Verwendung von „jungen“ LNCaP-Zellen der Passage 13 - 30 (zur Verfügung gestellt von Dr. P. Thelen, Experimentelle Urologie; Göttingen) hatte im Vergleich zu den Zellen, die von Prof. G. Thalmann, Universität Bern, Schweiz zur Verfügung gestellt wurden (Passage 38 - 50) bzw. zu den Zellen unseres Labors (Passage 70) keine Auswirkung auf die Expression des *CAV-1*-Gens. Keine der hier verwendeten LNCaP-Sub-Kulturen exprimierte *CAV-1*.

4.2.5 Verlust der *cav-1*-Expression während der Embryonalentwicklung

Das Auftreten und die Veränderung der Expression des *cav-1*-Gens während der Embryonalentwicklung wurden mit Northern Blots zu verschiedenen Zeitpunkten in der frühen Maus-Entwicklung analysiert. Die Northern Hybridisierung auf RNAs von Maus-Embryonen, die Tag 7, 11, 15 und 17 repräsentierten ergab, dass die Expression an Tag 7 am stärksten ist, um bereits an Tag 11 wieder abzunehmen. Sie ist in den späteren Stadien (Tag 15, 17) nicht mehr nachweisbar. Auch bei der Maus zeigten beide Isoformen das gleiche Expressionsmuster. Die Expression in adulten Mäusen war bereits aus der Literatur bekannt (141). Hinweise zum Verständnis der funktionellen Rolle von *cav-1*/Caveolae lieferten *cav-1*-Null-Mäuse. Überraschenderweise sind junge *cav-1*-defiziente Mäuse (*cav-1* -/-) lebensfähig und auch fertil. Allerdings führt der Verlust von *cav-1* im Alter von 2-4 Monaten zu pathologischen Befunden im kardiovaskulären System (21; 143; 221), Bluthochdruck im Lungenkreislauf (221), Defekten im Lipid-Metabolismus (22; 150) und zur Hyper-Proliferation von Epithel- und Endothel-Zellen (105; 142; 151; 205). Außerdem haben *cav-1*-Null-Mäuse eine um ~50% geringere Lebenserwartung (141). Gleichermaßen macht das Fehlen des Gens in embryonalen Fibroblasten der Maus diese Zellen empfänglicher für eine Transformation und *cav-1*-Null-Mäuse entwickeln mehr Tumoren (206). All diese verschiedenartigen Dysregulationen, die durch das Fehlen des Gens und

seines Produktes auftreten, unterstreichen die funktionelle Bedeutung von *cav-1* in zahlreichen Organ-Systemen *in vivo*.

4.3 Epigenetische Modifikation der Transkription des *CAV-1*-Gens

4.3.1 Represssion der *CAV-1*-Expression ist bedingt durch Methylierung

Methylierung von CpG-Dinukleotiden, die im Vertebraten-Genom am häufigsten vorkommende epigenetische Modifikation, trägt essentiell zur Kontrolle der Gen-Expression bei. In Vertebraten ist das somatische Genom global methyliert. Eine Ausnahme stellen CpG-Inseln dar, GC-reiche DNA-Regionen, die sich durchschnittlich über etwa 1 kb erstrecken, von denen ~60% Promotoren der humanen von der RNA-Polymerase II-transkribierten Gene sind. Aberrante oder zufällige Methylierung von CpG-Inseln in Promotoren führt zum Abschalten der Expression dieser Gene.

In der normalen Embryonal-Entwicklung werden die Muster der Gen-Expression zu einem erheblichen Teil durch epigenetische Mechanismen festgelegt, also ohne Veränderungen der DNA-Sequenz. Einer der epigenetischen Mechanismen ist Methylierung, die bei Säugern auf Cytosine in CpG-Dinukleotiden beschränkt ist. Sie ändert nichts am Informationsgehalt der DNA, sondern nur an deren Umsetzung durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, und führt so oftmals zu inaktivem Chromatin. Deshalb ist „gene silencing“ häufig mit erhöhter Methylierung regulatorischer Sequenzen assoziiert. Signifikante Veränderungen in den Mustern der DNA-Methylierung treten allgemein in maligenen Tumoren auf, so auch im PCa. Zahlreiche Gene sind in >70% der Prostata-Karzinome hypermethyliert, darunter *GSTP1*, das das Glutathion Transferase π Isoenzym kodiert (115; 161). Der Einfluss von Methylierung auf die transkriptionelle Inaktivierung variiert in großem Maße von etwa 9% von RB1 beim Retinoblastom bis zu 84% von hMHL1 in Microsatelliten-instabilen kolorektalen Tumoren (78; 134; 148).
DNA-Methylierung ist neben Mutationen ein anderer, häufig auftretender Mechanismus, der ein Gen inaktivieren kann, und ist damit eine Möglichkeit, die fehlende *CAV-1*-Expression in LNCaP zu erklären. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit diese Möglichkeit näher untersucht.

Im menschlichen Genom findet sich DNA-Methylierung vorwiegend in den 5´-regulatorischen Regionen und den ersten Exons zahlreicher Gene. Hypermethylierte Cytosine sind in repetetiven Regionen und Transposons (29; 171) konzentriert, während CpG-Inseln in Promotoren von Genen in normalen Zellen unmethyliert sind (84).
Während beim PCa die Methylierung spezifischer Stellen im Genom erhöht ist, kann sie paradoxerweiser bei repetetiven Sequenzen, die in normalen Zellen den Hauptanteil an Methyl-Cytosinen enthalten, vermindert sein. Beim Prostata-Karzinom scheint diese globale Hypomethylierung stark mit der Tumor-Progression verknüpft zu sein (161).

4.3.2 Prostata-Zelllinien weisen eine verstärkte Methylierung auf

„Gene silencing“ in Tumoren ist häufig mit erhöhter, aberranter Methylierung regulatorischer Sequenzen assoziiert, was mich zur Überlegung führte, den 5´-Promotor des *CAV-1*-Gens auf Methylierung zu untersuchen. Für die hier untersuchten Prostata-Zelllinien wurde die Methylierung des Promotors des *CAV-1*-Gens untersucht, mit der Frage, ob Methylierung als Ursache für das Fehlen der *Cav-1*-Expression in LNCaP verantwortlich gemacht werden kann.
Alle PCa-Zelllinien zeigten im Gegensatz zu unmethylierten diploiden Fibroblasten eine deutliche Methylierung der CpGs an den Positionen –822, –777 und –772. Der Methylierungsgrad sinkt deutlich an Position –750. Die beiden proximalen CpGs an den Positionen –700 und –686 hingegen zeigen in allen Zelllinien äußerst geringe Methylierung. Auch das Dinukleotid bei –587 zeigte nur in LNCaP eine signifikant höhere Methylierung im Vergleich zu den anderen Zelllinien, die *CAV-1* exprimieren. Dies macht die Relevanz dieses CpGs für die Repression der *CAV-1*-Expression deutlich. Während normale diploide Fibroblasten keine Methylierung des *CAV-1*-Promotors aufweisen, ist im Gegensatz dazu die Karzinom-Zelllinie HeLa nahezu vollständig an sechs von sieben der hier untersuchten CpGs des *CAV-1*-Promotors methyliert. Obwohl eine Korrelation der Expressionsdaten der Zelllinien mit den Daten der Bisulfit-Sequenzierung zeigt, dass je höher der Grad an Gesamt-Methylierung des *CAV-1*-Promotors ist, desto niedriger der Expressionslevel, hat vermutlich der Methylierungseffekt bezogen auf eine spezifische CpG-Position eine größere Bedeutung. Bemerkenswerter Weise findet sich in HeLa-Zellen an Position -587 des *CAV-1*-Promotors nur sehr schwache Methylierung, und eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR zeigte, dass HeLa *CAV-1* exprimiert. Dies könnte

durchaus darauf hindeuten, dass dieses CpG-Dinukleotid allein für die Repression der Expression des *CAV-1*-Gens verantwortlich ist.

4.3.3 Aberrante Methylierung in Tumor-Gewebe im Vergleich zu normalem Prostata-Gewebe

Bestimmte Parameter wie Ploidie, Chromosomenanzahl, aber auch die globale und spezifische Methylierung können sich in Zelllinien aufgrund der Immortalisierung und Kultivierung verändern und machen sie somit zu einem artifiziellen System, das sich anders verhalten kann als die *in vivo* Situation. Aus diesem Grund wurde das Methylierungsprofil auch an frischem Tumor- vs. Normal-Gewebe von insgesamt sieben PCa-Patienten analysiert.

Die Sequenzanalyse der mit Bisulfit-behandelten DNAs von sieben Patienten zeigte, dass Normal-Gewebe der Prostata im Schnitt geringer methyliert ist als das entsprechende Tumor-Gewebe. Besonders deutlich sind die Unterschiede in der Methylierung zwischen Tumor und gesunder Prostata an den drei 3´gelegenen CpG-Dinukleotiden. Im Normal-Gewebe tritt an diesen Stellen nur sehr selten Methylierung im Vergleich zum Tumor auf. An diesen CpG-Dinukleotiden ist im Tumor deutlich stärkere Methylierung (45%) zu finden als im entsprechenden Normal-Gewebe (13%), während die Unterschiede in der Methylierung an den vier 5´-gelegenen CpGs zwischen beiden Geweben nicht so deutlich sind. Im Tumor findet sich ein signifikant höherer Methylierungsgrad auch am letzten CpGs verglichen mit Normal-Gewebe. Eine alleinige Relevanz eines einzelnen CpGs wird anhand der untersuchten Tumoren und Normal-Geweben nicht deutlich erkennbar.

4.4 Eingrenzung potentieller Mechanismen der *CAV-1*-Repression *in vitro*

4.4.1 Der *CAV-1*-Promotor wird durch Methylierung abgeschaltet

Im Anschluss an die Untersuchungen zu den Methylierungsprofilen sollte in zwei weiteren Experimenten, nämlich dem *in vitro* Reportergen-Assay und einer *in vivo* Behandlung der Zellen mit einem demethylierenden Agens, eine funktionelle Rolle der Methylierung verifiziert und eine kausale Verbindung zwischen *CAV-1*-Promotor-Aktivität und

Methylierung hergestellt werden. Beide Ansätze lieferten überzeugende Hinweise auf ein methylierungs-bedingtes Abschalten der Expression in LNCaP.

Zur Klärung des Effekts der CpG-Methylierung auf die Funktion des *CAV-1*-Promotors wurden Expressionsvektoren generiert, die das Reportergen *LUCIFERASE* (*luc*) unter die Kontrolle des 356 bp-Promotors bzw. von Kontroll-Fragmenten stellten. Auf diese Weise konnte im Reportergen-Assay anhand der Aktivität des *luc*-Gens auf die Stärke des jeweiligen Promotors im Konstrukt geschlossen werden.
Zur Amplifikation der im *luc*-Assay verwendeten Plasmide wurden Bakterien des Stammes *Escherichia coli* K-12 ER1647 verwendet. Dieser Stamm ist dadurch charakterisiert, dass er für die vier Restriktionssysteme anderer *E.coli*-Stämme defizient ist. Die vier spezifischen Restriktionssysteme, die Fremd-DNA erkennen, sind: McrA, McrBC, Mrr und *Eco*K. DNA, die sensitiv gegenüber einem oder mehreren dieser Systeme ist, wird biologisch inaktiviert, wobei die Endonuclease *Eco*K unmethylierte DNA abbaut und die anderen spezifisch methylierte DNA schneiden. McrA und McrBC inaktivieren dabei unabhängig voneinander DNAs, die ein Methylierungsmuster von Säugern aufweisen. Da Plasmid-DNA mit einer Cytosin-Methylierung degradiert würde, musste auf K-12 ER1647-Zellen zurückgegriffen werden, die kein derartiges Schutzsystem besitzen.
Wurde das unmethylierte *CAV-1*-Promotor-Konstruct pGL3-UCP transient in PC-3-Zellen transfiziert, führte dies zu einer 1.5fach höheren *luc*-Aktivität im Vergleich zum Kontroll-Vektor, der unter der Kontrolle des *SV40*-Promotors stand. Vom *SV40*-Promoter weiß man, dass er relativ stark ist; dies zeigt, dass das 356 bp Fragment des *CAV-1*-Promotors, der hier eingesetzt wurde, das relevante regulatorische Element ist. Eine *Sss*I-Methylierung dieses Fragments (pGL3-MCP) schaltete diese Aktivität beinahe vollständig aus. Diese Ergebnisse liefern gute Hinweise darauf, dass der *CAV-1*-Promotor durch Methylierung der sieben CpG-Dinukleotide stillgelegt wird, die sich im minimalen Promotor (–881 to –518 bp) befinden.
Die Experimente wurden in PC-3-Zellen durchgeführt, da diese Zelllinie *CAV-1* exprimiert. Somit konnte gewährleistet werden, dass im zellulären System alle zur Aktivierung des *CAV-1*-Promotors erforderlichen Bestandteile des Transkriptoms vorhanden waren.

4.4.2 Die fehlende *CAV-1*-Expression wird nicht durch eine hyperaktivierte Kinase bedingt

Die *CAV-1*-Interaktion mit Signal-Molekülen kann funktionell die GTPase-Aktivität von heterotrimeren G-Proteinen supprimieren und die Kinase-Aktivität von Tyrosin-Kinasen der Src-Familie, EGF-Rezeptor-Kinasen, Isoformen der Protein-Kinase C, Neu, und Komponenten der p42/44 MAP-Kinase-Kaskade nämlich MEK und ERK durch die sog. C*aveolin-scaffolding Domäne* inhibieren. Das Caveolin-Bindemotiv ist innerhalb der enzymatisch aktiven katalytischen Domäne eines gegebenen Signal-Moleküls lokalisiert. Im Falle von Tyrosin und Serine/Threonin-Kinaseen besteht die Kinase-Domäne aus elf konservierten Subdomänen (I-XI) (30; 30; 40; 135; 136). Das CAV-Bindemotiv liegt innerhalb der enzymatisch aktiven katalytischen konservierten Kinase-Subdomäne Nummer IX, was die Vermutung zulässt, dass *CAV-1* ein genereller Kinase Inhibitor ist.
Es konnte gezeigt werden, dass eine fehlende *CAV-1*-Expression maligne Transformation vermittelt und zu einer konstitutiven Hyper-Aktivierung der p42/44 MAP-Kaskade führt (55). Umgekehrt konnte z.B. durch Behandlung von H-Ras- (G12V) transformierten NIH3T3-Zellen mit PD98059 (einem potenten und spezifischen Inhibitor von MEK) die Expression der *CAV-1*-mRNA und des CAV-1-Proteins auf einen normalen Level, wie er in nicht-transformierten NIH3T3-Zellen zu beobachten ist, wiederhergestellt werden (41; 96). Diese Autoren berichten von einer negativen reziproken Regulation zwischen der Aktivierung der p42/44 MAP-Kinase und der *CAV-1*-Expression, indem sie zeigten:

(i) verstärkte *CAV-1*-Protein-Expression reguliert die p42/44 MAP-Kinase-Aktivität herunter (39), d.h. transiente Ko-Transfektion von CAV-1 mit MEK oder ERK blockiert deren Fähigkeit, ein *in vivo* Elk-Luciferase-Reportersystem in CHO-Zellen transkriptionell zu aktivieren;

(ii) das Herunterregulieren der *CAV-1*-Protein-Expression führt zu einer Verstärkung der p42/44 MAP-Kinase-Aktivität (55), d.h. die Expression eines *CAV-1*-antisense Konstrukts schaltet die *CAV-1*-Protein-Expression in NIH3T3-Zellen aus, was zu einer konstitutiven Aktivierung von MEK und ERK führt;

(iii) eine Aktivierung der p42/44 MAP-Kinase verstärkt die Expression von CAV-1-Protein (41; 116), d.h. die Expression von aktiviertem Ras in NIH3T3-Zellen führt zum Verlust der *CAV-1*-mRNA- und -Protein-Expression; und

(iv) das Herunterregulieren der p42/44 MAP-Kinase-Aktivität erhöht die *CAV-1*-Protein-Expression (41), d.h. die Behandlung Ras-transformierter NIH3T3-

Zellen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 reaktiviert die Expression des CAV-1-Proteins auf ein normales Niveau wie in nicht transformierten Zellen.

Es konnten zwei Signal-Kaskaden (Ras-p42/44 MAP und PKA) identifiziert werden, die die *CAV-1*-Promotor-Aktivität auf Transkriptionsebene abschalten können (45).

Ob dieser Mechanismus auch auf das Fehlen der *CAV-1*-Expression in LNCaP-Zellen erklärt, wurde durch Behandlung der Kulturen mit dem MEK-Inhibitor PD98059 sowie mit dem PKA-Inhibitor PKI getestet.

Anders als bei den oben genannten Beobachtungen konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit für die PCa-Zelllinie LNCaP bei Behandlung mit dem MEK-Inhibitor PD98059 keine Reaktivierung der *CAV-1*-Expression erzielt werden, was zeigt, dass das Abschalten der *CAV-1*-Gen-Expression in LNCaP unabhängig von einer p42/44 MAP-Kinase-Aktivierung ist. Die Expression des *CAV-1*-Gens wird also nicht negativ durch eine konstitutive Aktivierung dieses Signal-Transduktionsweges reguliert.

4.4.3 Keine Reaktivierung der *CAV-1*-Expression durch den cAMP-abhängigen Protein-Kinase A-Inhibitor PKI

Die Signalübertragung via cAMP (cyclic adenosine monophosphate), einem ubiquitären second messenger, ist einer der ersten bekannten und am besten untersuchten Signal-Transduktions-Wege. cAMP wird in Zellen als Antwort auf Hormone und Nährstoffe gebildet. Die Produktion von cAMP ist von zahlreichen verschiedenen Proteinen abhängig, die dessen Synthese und Degradation beeinflussen. cAMP-abhängige Prozesse sind für das Zell-Wachstum, Differenzierung und Homeostase essentiell.

Der vielleicht wichtigste Effektor der cAMP-Antwort ist die Protein-Kinase A (PKA), eine Serin/Threonin-Kinase, die aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten aufgebaut ist (51). Die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit bewirkt die Dissoziation und enzymatische Aktivierung der katalytischen Domänen der PKA. Die schnelle, direkte und effiziente Signal-Übertragung erfolgt durch die Interaktion und den Cross Talk zwischen verschiedenen Signal-Transduktionswegen innerhalb definierter zellulärer Kompartimente. Die Interaktion von *CAV-1* mit zahlreichen Signal-Molekülen erlaubt es diesem Protein auch den cAMP-vermittelten Signalweg zu dämpfen oder zu blockieren. Dass cAMP und die PKA Schüssel-Rollen bei der Phosphorylierung und Regulation von Enzym-Substraten übernehmen, die am Intermediär-Stoffwechsel beteiligt sind, ist bekannt. Eine neu entdeckte Rolle der Protein Kinase A ist ihre Beteiligung an der Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die

wichtig für die Kontrolle der Transkription von Genen als Antwort auf erhöhte cAMP-Spiegel sind.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des PKA-Pathways durch pharmakologische Agenzien (IBMX und forskolin) bzw. durch Überexpression der katalytischen Untereinheit der PKA die Promotor-Aktivität und damit die Expression des *CAV-1*-Gens inhibiert (45). Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Effekt des PKA-Signalwegs auf die *CAV-1*-Expression untersucht, indem LNCaP-Zellen mit dem PKA-Inhibitor PKI kultiviert wurden.

Im Gegensatz zur Erwartung aufgrund der Literatur, führte die Inkubation mit dem cAMP-abhängigen Protein-Kinase A-Inhibitor PKI zu keiner Reaktivierung der *CAV-1*-Expression in LNCaP. Weder eine Isoformen-spezifische noch Zeit-abhängige Reaktivierung der Expression von *CAV-1* nach Behandlung mit PKI in LNCaP war möglich.

4.4.4 Die transkriptionelle Repression von *CAV-1* wird nicht durch Chromatin-Modulation verursacht

Die reversible Acetylierung der NH2-terminalen Lysin-Reste von Histonen ist ein wichtiger Mechanismus für die Modulation der Chromatin-Topologie und für die transkriptionelle Repression von Genen (4; 18; 155; 199). Histon-Acetylierung relaxiert das normalerweise dicht gepackte Chromatin, was die Zugänglichkeit von Promotor-Regionen für DNA-Binde-Proteine verbessert, die die Transkription regulieren. Im Gegensatz dazu hält die Histon-Deacetylase (HDAC) das Chromatin in einem transkriptionell inaktiven Zustand. Bis jetzt konnten sechs HDAC-Enzyme identifiziert werden. HDAC1, HDAC2 und HDAC3 binden den E2F-Transkriptionsfaktor und reprimieren die Transkription über eine Assoziation mit dem Retinoblastoma-Protein (14). HDAC4, HDAC5 und HDAC6 bilden eine zweite Familie von Deacetylasen, die besonders in die Zell-Differenzierung involviert sind (195). Das Blockieren der HDAC-Aktivität führt einerseits zur Repression bestimmter Gene (194), aber andererseits auch zur transkriptionellen Aktivierung anderer Gene, wie dem Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor $^{p21Waf1/Cip1}$ (182). Trichostatin A ist ein nicht-kompetetiver reversibel bindender HDAC-Inhibitor, von dem gezeigt werden konnte, dass er Zellen in der G_1- und G_2-Phase des Zell-Zyklus arretiert, Differenzierung induziert, und die Transformation von Zellen in Kultur revertiert (214).

Es lag nahe in LNCaP zu prüfen, ob die Repression des *CAV-1*-Gens durch das Inhibieren der HDAC-Aktivität mittels Trichostatin A aufgehoben werden kann, was ein

methylierungs-unabhängiger Effekt wäre. Ziel dieses Ansatzes war es, die Histon-Deacetylase-Aktivität (HDAC) zu blockieren, eine Hyperacetylierung in den Zellen zu erzielen, um so die Repression der Transkription des *CAV-1*-Gens aufzuheben.

In diesem Experiment wurden LNCaP-Kulturen über sechs Tage mit TSA behandelt. Die Inkubation mit diesem Agens führte jedoch zu keiner Reaktivierung der *CAV-1*-Expression. Dies deutet darauf hin, dass das *CAV-1*-Gen nicht über eine Deacetylierung der Chromatin-Struktur reguliert wird, sondern dass die Ursache des Verlusts der Expression in LNCaP eher der Methylierung zuzuschreiben ist.

4.4.5 Reaktivierung der *CAV-1*-Expression durch 5-Aza-2´CdR

Obwohl man längst weiß, dass Cytosin-Methylierung in der Promotor-Region von Genen oft mit deren transktiptioneller Abschaltung korreliert ist, ist es nicht klar, ob durch diese epigenetische Modifikation nur das Binden von Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird, oder ob zuerst die Chromatin-Struktur verändert wird und dann die Transkription verhindert wird (88). Durch das Binden von Proteinen wie MeCP2 an methylierte DNA kann ein Multiprotein-Konplex, einschließlich des HDACs, rekrutiert werden, der zu einer verstärkten Packung des Chromatins führt (86; 131). Es wird deshalb angenommen, dass DNA-Methylierung die lokale Chromatin-Struktur effektiv modifiziert und hierdurch den potentiellen Zugang von Transkiptionsfaktoren an Promotor-Regionen reduziert (132; 154).
DNA-Methylierung scheint aber nur einer von vielen Auslösern lokaler Histon-Deacetylierung und Chromatin-Inaktivierung zu sein.

4.4.6 Der *CAV-1*-Promotor wird durch Methylierung inaktiviert

Neben Acetylierung von Histonen ist Methylierung von CpG-Dinukleotiden ist ein wichtiger Mechanismus, der Gene auf transkriptioneller Ebene regulieren kann. Methylierung von regulatorischen Bereichen von Genen können durch diese epigenetische Modifikation inaktiviert werden, was als „gene silencing“ bezeichnet wird.
Um methylierungs-bedingte Abschaltung des *CAV-1*-Gens in LNCaP-Zellen zu testen, wurden diese Zellen mit 5-Aza-2´dCR behandelt, da sie mindestens eine intakte Kopie des Gens besitzen, aber dennoch kein *CAV-1* exprimieren. Ziel dieses Experiments war das

Entfernen der Methylierung *in vivo* durch 5-Aza-2´dCR, um zu prüfen, ob sich die Aktivität des *CAV-1*-Promotors in LNCaP wiederherstellen lässt. 5-Aza-2´dCR verhindert die Methylierung (85) und wird als etablierte Methode zum Reaktivieren von Genen, die aufgrund Methylierung stillgelegt waren, eingesetzt (z.B. das *VHL*-Gen, (77).
Die Reaktivierung des *CAV-1*-Gens in LNCaP nach der Behandlung mit 5-Aza-2´dCR wurde mittels RT-PCR überprüft. Tatsächlich konnte eine Zunahme des Transkript-Signals mit steigender Konzentration an 5-Aza-2´dCR beobachtet werden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Annahme überein, dass die *CAV-1*-Transkriptions-Aktivität invers mit dem Grad an Methylierung in LNCaP-Zellen korreliert. Da sich durch Demethylierung die Expression wiederherstellen ließ, ist Methylierung als Ursache für die fehlende Expression von *CAV-1* in LNCaP-Zellen anzunehmen.
Die Untersuchungen zur Methylierung des *CAV-1*-Promotors belegen eindeutig, dass Methylierung die Promotor-Aktivität des untersuchten Fragments unterdrückt. Diese epigenetische Modifikation stellt einen ähnlichen selektiven Vorteil wie Mutationen oder Deletionen auf dem Weg von einer normalen zu einer transformierten Zelle dar und kann somit ein Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Tumors angesehen werden. Die Herunterregulierung der *CAV-1*-Protein-Expression, die während der Zell-Transformation beobachtet wird, ist schließlich für das abnorme Wachstumsverhalten von transformierten Zellen verantwortlich. Das p53-Tumor-Suppressor-Protein ist der intrazelluläre Regulator, der an der Modulation des Zellzyklus beteiligt ist. CAV-1 und p53 arbeiten synergetisch, wobei p53 ein positiver Regulator der *CAV-1*-Gen-Transkription und Protein-Expression ist und CAV-1 die Aktivität von p53 erhöht (56). Somit dürfte ein Abschalten der Expression von *CAV-1*, wie es in LNCaP der Fall ist, zu einem Verlust der Zell-Zyklus-Kontrolle via p53 und damit zu einem abnormen Wachstum der Zellen führen, der schließlich in Metastasierung enden könnte. Dies trifft genau auf LNCaP zu, bei denen es sich um epitheliale Zellen aus Metastasen eines supraclaviculären Lymphknotens handelt, während bei allen anderen Zelllinien *CAV-1*-Expression gefunden wurde und diese Zell-linien nicht von Metastasen stammten.

Eine Beteiligung des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumor-Suppressor-Gens *CAV-1* an der Entstehung des Prostata-Karzinoms ist sehr wahrscheinlich. Für die PCa-Zelllinie LNCaP kann man schließen, dass (i) weder LOH noch Mutationen den Verlust der *CAV-1*-Expression verursachen und (ii) das Fehlen der Expression nicht auf einer Hyperaktivierung des MAP-Kinase-Weges und auch nicht auf einer hyperaktivierten

Protein Kinase A beruht, sondern dass (iii) das *CAV-1*-Gen vermutlich durch DNA-Methylierung in diesen Zellen abgeschaltet ist.

Obwohl Methylierung von Promotoren mehr ein Indikator als die Ursache für die Inaktivierung vieler Gene zu sein scheint (**zur Übersicht siehe** (24)) gibt es drei mögliche Mechanismen, durch die Methylierung Einfluss auf die Gen-Expression nimmt: (i) Methylierung kann durch das Binden von ubiquitären Transkriptionsfaktoren einen direkten Einfluss nehmen, (ii) das Binden spezifischer Protein-Faktoren an methylierte DNA kann zur Repression eines Gens führen, und (iii) Methylierung kann eine Gen-Inaktivierung indirekt durch Veränderung der Chromatin-Struktur bewirken.

Zusätzliche Mechanismen können durch Behinderung der Bindung von Transkriptions-faktoren eine Gen-Inaktivierung durch Methylierung unabhängig von Histon-Deacetylasen verursachen (16; 53; 119).

4.5 Mechanismen der Repression von *CAV-1*

4.5.1 Ein methyl-CpG-Bindeprotein interagiert mit dem methylierten *CAV-1*-Promotor

Methylierte CpG-Stellen werden von einer Reihe metyhl-CpG-bindender Proteine erkannt, wobei diese gewöhnlich CpG-Inseln für die Bindung benötigen (126).

Neben zahlreichen methyl-CpG-Bindeproteinen, den MBDs, die alle mindestens zwei aufeinander folgende CpG-Stellen für ihre Interaktion benötigen, ist MeCP2 das einzige bis jetzt bekannte methyl-CpG-Binde-Protein, das an einzelne CpGs bindet. Diese Bindung wurde ursprünglich an einem einzelnen methylierten CpG des late *SV40*-Promotors gezeigt, das ausreichte, die Promotor-Aktivität zu reprimieren (50). Zahlreichen Faktoren, die an DNA binden, ist es nicht möglich, diese Bindung einzugehen, solange Nukleosomen präsent sind (104; 108; 118; 120). Für die Bildung eines funktionellen Transkriptions-komplexes ist aber das Entfernen oder Neu-Zusammensetzen von Nukleosomen nahe eines Promotors eine Voraussetzung (184), hauptsächlich, weil dies die Blockade der Bindung von Faktoren entfernt. MeCP2 scheint keine vorausgehende Auflösung des nukleosomalen Chromatins zu benötigen, um an die DNA zu binden. Die einfachste Erklärung hierfür ist, dass MeCP2 direkten Zugang zur DNA hat.

Aufgrund des Fehlens einer typischen CpG-Insel im *CAV-1*-Promotor und der Streuung der einzelnen CpGs über den ganzen Promotor schien MeCP2 ein guter Kandidat eines

Binde-Proteins zu sein. Die 356 bp *CAV-1*-Promotor-Region, die hier untersucht wurde, enthält nur sieben CpGs. Von diesen sind nur vier methyliert und diese treten nicht in Clustern auf, sondern sind vielmehr über den gesamten Promotor-Bereich verteilt.

Wurde *in vitro* synthetisiertes MeCP2-Protein in den Bindungsassays eingesetzt, konnte keine Komplex-Bildung dieses Proteins mit dem methylierten oder unmethylierten *CAV-1*-Promotor-Fragment detektiert werden. Dies schließt MeCP2 als Bindepartner aus. Allerdings zeigen die Bindungsassays mit verschiedenen Protein-Lysaten die Präsenz eines uns unbe-kannten CpG-bindenden Proteins, das an den methylierten *CAV-1*-Promotor bindet. Dieses Protein bindet wahrscheinlich an ein einziges methyliertes CpG. Meine Ergebnisse zeigen, dass dieses Protein sowohl in PC-3- als auch in HeLa-Zellen auftritt, und Komplexe mit dem *in vitro SssI*-methylierten *CAV-1*-Promotor, nicht aber mit dem unmethylierten Promotor-Fragment bildet. Weitere Untersuchungen, wie z.B. eine Analyse mittels MALDI-TOF, könnten helfen, dieses Protein zu identifizieren, konnten aber im zeitlich begrenzten Rahmen dieser Promotion nicht mehr durchgeführt werden.

Schlussfolgerungen

Mutationen, Deletionen bzw. LOH können das Fehlen der *CAV-1*-Expression in der Zelllinie LNCaP nicht erklären. Aberrante Methylierung von CpG-Inseln und damit die transkriptionelle Repression von Promotor-Sequenzen gilt als ein alternativer Mechanismus für die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen in einer Vielzahl von Tumoren, ein Mechanismus, der keine Punktmutationen oder genomische Deletionen oder LOH voraussetzt.

Die Beobachtungen, dass das *CAV-1*-Gen durch Methylierung inaktiviert ist und dass ein methyl-CpG-bindendes Protein an diesen methylierten Promotor bindet, stimmen mit der Annahme überein, dass *CAV-1* als Tumor-Suppressor in Tumoren durch aberrante Methylierung abgeschaltet ist, was mit der Literatur (32; 203; 204) übereinstimmt.

Untersuchungen an PCa-Gewebe haben gezeigt, dass CpG-Stellen im 5´ Promotor des Gens häufiger in Tumoren methyliert sind als in angrenzenden normalen Prostata-Zellen (32). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde lassen den Schluss zu, dass der Grad der CpG-Methylierung dabei CpG-spezifisch ist, und das letzte CpG-Dinukleotid im relevanten *CAV-1*-Promotor offensichtlich ausreicht, die *CAV-1*-Expression zu reprimieren. Deshalb ist die *CAV-1*-Promotor-Methylierung nicht nur ein Indikator der Repression für die Progression des humanen Prostata-Karzinoms, sondern eine direkte Ursache der Inaktivierung des Gens.

5 Zusammenfassung

Die Suche nach Kandidaten-Genen für das Prostata-Karzinom (PCa) hat eine Vielzahl von Suszeptibilitätsloci hervorgebracht. Die Region q31 von Chromosom 7 enthält Tumor-Suppressor-Gene, die für die Progression und Aggressivität des Prostata-Karzinom verantwortlich sein könnten. In dieser Region liegt das Gen *Caveolin-1* (*CAV-1*). Seine Lokalisation in einer häufig in Tumoren deletierten Region, seine molekular-biologischen Eigenschaften und der Verlust der Gen-Expression durch genetische oder epigenetische Ereignisse machen *CAV-1* zu einem für das Prostata-Karzinom relevanten Kandidaten-Gen.
Für das CAV-1-Protein waren bereits zwei Isoformen bekannt, von denen ich zeigen konnte, dass sie durch unabhängige Transkripte des gleichen Gens entstehen. Sie werden nahezu ubiquitär in verschiedenen Geweben (außer in Leukozyten und Gehirn) sowie in allen Prostata-Zelllinien (außer LNCaP) exprimiert.

Ob genomische Varianten des Gens mit einer erhöhten Suszeptibilität für das PCa einhergehen, wurde durch genomische Sequenzierung des kodierenden Bereiches sowie des Promotors des *CAV-1*-Gens in PCa-Zelllinien und in einem Patienten-Kollektiv untersucht, für das in der eigenen Arbeitsgruppe Kopplung zu Chromosom 7q31-33 in zehn Familien mit einer aggressiven Form des Prostata-Karzinoms beobachtet war. Die Suche nach Mutationen, einschließlich Deletionen bzw. Verlust der Heterozygotie (LOH, loss of heterozygosity), im *CAV-1*-Gen ergab weder für die Zelllinien noch für die untersuchten Patienten genetische Veränderungen.

In einer Fall-Kontroll-Studie wurden vier „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) bei 191 gesunden Männern, 190 sporadischen Fällen und 105 Fällen mit familiärem PCa auf Assoziation zum Prostata-Karzinom untersucht. Dabei wurde ein vollständiges Kopplungsungleichgewicht im *CAV-1*-Locus gefunden und es konnten elf Haplotypen identifiziert werden.
Das weniger häufige C-Allel von SNP rs1543293 zeigte bei den sporadischen Fällen im Unterschied zu den familiären Fällen eine leichte, insignifikante Überrepräsentation, die nach Stratifizierung auf hohen Tumor-Grad (T3/4) signifikant war. Andere Stratifizierungen der Fälle nach klinischen Kriterien zeigten keine Assoziation zwischen Krankheit und einem der SNPs. Das mit hohem T3/4-Stadium assoziierte C-Allel von rs1543293 kommt in einem häufigen Haplotyp (c t c c) mit einer Allel-Frequenz von etwa 18% vor, sodass die

Assoziation des PCa mit dem SNP rs1543293 mit dem häufigen Haplotyp c t c c zusammenfällt und ebenfalls bei hohem Tumor-Grad zum PCa assoziiert ist.

Da Sequenzveränderungen (Mutationen) als Ursache des Expressionsverlustes von *CAV-1* weitgehend ausgeschlossen waren, wurde in einem nächsten Schritt DNA-Methylierung im Promotor-Bereich des Gens untersucht. Untersuchungen an den Zelllinien machten die spezifische Rolle eines bestimmten CpGs für die Repression der Expression wahrscheinlich. Karzinom-Gewebe zeigte eine deutlich stärkere Methylierung als vergleichbares Normal-gewebe, v.a. am letzten CpG an Position -587. Dies weist auf eine möglicherweise spezifische Rolle dieses CpGs hin.

Die Hinweise auf eine Korrelation zwischen *CAV-1*-Promoter-Aktivität und Methylierung wurden im Reportergen-Assay bestätigt. Der Promotor-Bereich des *CAV-1*-Gens zeigte eine starke Aktivität, die durch *in vitro* Methylierung komplett gehemmt und in LNCaP-Zellen durch *in vivo* Behandlung mit 5-Aza-dCR aufgehoben werden konnte. Damit ist eindeutig eine durch Methylierung vermittelte Repression des *CAV-1*-Gens belegt.

Transkriptionsregulation im Sinne methylierungsabhängiger Repression wird durch Interaktion mit spezifischen Methyl-CpG-Proteinen vermittelt. Der Bindungsassay für methylierungsabhängige Proteinbindung an Promotor-DNA zeigte eine spezifische Bindung eines nicht identifizierten Methyl-CpG-Binde-Proteins, wobei der nahe liegenden Kandidat MeCP2 experimentell als Bindungspartner ausgeschlossen werden konnte.

Die Frage, ob *CAV-1* zu Recht als Kandidaten-Gen für die Entstehung und Progression des Prostata-Karzinoms angesehen werden kann, konnte nicht eindeutig beantwortet werden. Nichtsdestotrotz belegen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Beteiligung an der Entstehung und Progression bzw. der Aggressivität des Prostata-Karzinoms.

6 Literaturverzeichnis

1. Achille A, Biasi MO, Zamboni G, Bogina G, Magalini AR, Pederzoli P, Perucho M, and Scarpa A: *Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma*. **Cancer Res 56**: 3808-3813 (1996)

2. Ahlbom A, Lichtenstein P, Malmstrom H, Feychting M, Hemminki K, and Pedersen NL: *Cancer in twins: genetic and nongenetic familial risk factors*. **J Natl Cancer Inst 89**: 287-293 (1997)

3. Alers JC, Krijtenburg PJ, Rosenberg C, Hop WC, Verkerk AM, Schroder FH, van der Kwast TH, Bosman FT, and van Dekken H: *Interphase cytogenetics of prostatic tumor progression: specific chromosomal abnormalities are involved in metastasis to the bone*. **Lab Invest 77**: 437-448 (1997)

4. Allegra P, Sterner R, Clayton DF, and Allfrey VG: *Affinity chromatographic purification of nucleosomes containing transcriptionally active DNA sequences*. **J Mol Biol 196**: 379-388 (1987)

5. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland and In Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut: *Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends*. 64-67 (2002)

6. Aumuller G and Seitz J: *Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands*. **Int Rev Cytol 121**: 127-231 (1990)

7. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K: Short Protocols in Molecular Biology - *A compendium of methods from current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York, 3rd edition (1995)

8. Babaian RJ, Camps JL, Frangos DN, Ramirez EI, Tenney DM, Hassell JS, and Fritsche HA: *Monoclonal prostate-specific antigen in untreated prostate cancer. Relationship to clinical stage and grade*. **Cancer 67**: 2200-2206 (1991)

9. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, and Ewing LL: *The development of human benign prostatic hyperplasia with age*. **J Urol 132**: 474-479 (1984)

10. Bieche I, Champeme MH, Matifas F, Hacene K, Callahan R, and Lidereau R: *Loss of heterozygosity on chromosome 7q and aggressive primary breast cancer*. **Lancet 339**: 139-143 (1992)

11. Bist A, Fielding PE, and Fielding CJ: *Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol*. **Proc Natl Acad Sci U S A 94**: 10693-10698 (1997)

12. Blagitko N, Schulz U, Schinzel AA, Ropers HH, and Kalscheuer VM: *gamma2-COP, a novel imprinted gene on chromosome 7q32, defines a new imprinting cluster in the human genome*. **Hum Mol Genet 8**: 2387-2396 (1999)

13. Brawer MK: *Complexed PSA: the newest advance in PSA testing*. **Urology 54**: 2-3 (1999)

14. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, and Kouzarides T: *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. **Nature 391**: 597-601 (1998)

15. Brothman AR, Maxwell TM, Cui J, Deubler DA, and Zhu XL: *Chromosomal clues to the development of prostate tumors*. **Prostate 38**: 303-312 (1999)

16. Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, and Baylin SB: *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. **Nat Genet 21**: 103-107 (1999)

17. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, and Walsh PC: *Mendelian inheritance of familial prostate cancer*. **Proc Natl Acad Sci U S A 89**: 3367-3371 (1992)

18. Chahal SS, Matthews HR, and Bradbury EM: *Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function*. **Nature 287**: 76-79 (1980)

19. Champeme MH, Bieche I, Beuzelin M, and Lidereau R: *Loss of heterozygosity on 7q31 occurs early during breast tumorigenesis*. **Genes Chromosomes Cancer 12**: 304-306 (1995)

20. Chene L, Giroud C, Desgrandchamps F, Boccon-Gibod L, Cussenot O, Berthon P, and Latil A: *Extensive analysis of the 7q31 region in human prostate tumors supports TES as the best candidate tumor suppressor gene*. **Int J Cancer 111**: 798-804 (2004)

21. Cohen AW, Park DS, Woodman SE, Williams TM, Chandra M, Shirani J, Pereira dS, Kitsis RN, Russell RG, Weiss LM, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Shtutin V, Tanowitz HB, and Lisanti MP: *Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts*. **Am J Physiol Cell Physiol 284**: C457-C474 (2003)

22. Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE, and Lisanti MP: *Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue*. **Am J Physiol Cell Physiol 285**: C222-C235 (2003)

23. Cohen JH, Kristal AR, and Stanford JL: *Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk*. **J Natl Cancer Inst 92**: 61-68 (2000)

24. Collas P: *Modulation of plasmid DNA methylation and expression in zebrafish embryos*. **Nucleic Acids Res 26**: 4454-4461 (1998)

25. Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO, Schrader WT, and O'Malley BW: *The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA*. **Biochem Biophys Res Commun 149**: 493-501 (1987)

26. Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, and Vertino PM: *TMS1, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers*. **Cancer Res 60**: 6236-6242 (2000)

27. Costello JF, Berger MS, Huang HS, and Cavenee WK: *Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation*. **Cancer Res 56**: 2405-2410 (1996)

28. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su HH, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, and Plass C: *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. **Nat Genet 24**: 132-138 (2000)

29. Costello JF and Plass C: *Methylation matters*. **J Med Genet 38**: 285-303 (2001)

30. Couet J, Sargiacomo M, and Lisanti MP: *Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities*. **J Biol Chem 272**: 30429-30438 (1997)

31. Cui J, Deubler DA, Rohr LR, Zhu XL, Maxwell TM, Changus JE, and Brothman AR: *Chromosome 7 abnormalities in prostate cancer detected by dual-color fluorescence in situ hybridization*. **Cancer Genet Cytogenet 107**: 51-60 (1998)

32. Cui J, Rohr LR, Swanson G, Speights VO, Maxwell T, and Brothman AR: *Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer*. **Prostate 46**: 249-256 (2001)

33. Cunningham JM, Shan A, Wick MJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Tester DJ, Qian J, Takahashi S, Jenkins RB, Bostwick DG, and Thibodeau SN: *Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma*. **Cancer Res 56**: 4475-4482 (1996)

34. Dai Z, Lakshmanan RR, Zhu WG, Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Brena RM, Li B, Wright FA, Ross P, Otterson GA, and Plass C: *Global methylation profiling of lung cancer identifies novel methylated genes*. **Neoplasia 3**: 314-323 (2001)

35. Delaval K and Feil R: *Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting*. **Curr Opin Genet Dev 14**: 188-195 (2004)

36. Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Rosenzweig A, Seidman JG, and Smith DR: Short protocols in human genetics. John Wiley & Sons, New York, 2nd edition (1997)

37. Eeles RA: *Genetic predisposition to prostate cancer*. **Prostate Cancer Prostatic Dis 2**: 9-15 (1999)

38. Ehrlich M: *DNA methylation in cancer: too much, but also too little*. **Oncogene 21**: 5400-5413 (2002)

39. Engelman JA, Chu C, Lin A, Jo H, Ikezu T, Okamoto T, Kohtz DS, and Lisanti MP: *Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain*. **FEBS Lett 428**: 205-211 (1998)

40. Engelman JA, Lee RJ, Karnezis A, Bearss DJ, Webster M, Siegel P, Muller WJ, Windle JJ, Pestell RG, and Lisanti MP: *Reciprocal regulation of neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for human breast cancer*. **J Biol Chem 273**: 20448-20455 (1998)

41. Engelman JA, Wykoff CC, Yasuhara S, Song KS, Okamoto T, and Lisanti MP: *Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth*. **J Biol Chem 272**: 16374-16381 (1997)

42. Engelman JA, Zhang X, Galbiati F, Volonte D, Sotgia F, Pestell RG, Minetti C, Scherer PE, Okamoto T, and Lisanti MP: *Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy*. **Am J Hum Genet 63**: 1578-1587 (1998)

43. Engelman JA, Zhang XL, and Lisanti MP: *Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers*. **FEBS Lett 436**: 403-410 (1998)

44. Engelman JA, Zhang XL, and Lisanti MP: *Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island*

in the 5' promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. **FEBS Lett 448**: 221-230 (1999)

45. Engelman JA, Zhang XL, Razani B, Pestell RG, and Lisanti MP: *p42/44 MAP kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate caveolin-1 gene expression. Activation of Ras-MAP kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity*. **J Biol Chem 274**: 32333-32341 (1999)

46. Etzioni R, Penson DF, Legler JM, di Tommaso D, Boer R, Gann PH, and Feuer EJ: *Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends*. **J Natl Cancer Inst 94**: 981-990 (2002)

47. Feinberg AP and Vogelstein B: *"A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity".* Addendum. **Anal Biochem 137**: 266-267 (1984)

48. Ferguson-Smith AC and Surani MA: *Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes*. **Science 293**: 1086-1089 (2001)

49. Fournier G, Latil A, Amet Y, Abalain JH, Volant A, Mangin P, Floch HH, and Lidereau R: *Gene amplifications in advanced-stage human prostate cancer*. **Urol Res 22**: 343-347 (1995)

50. Fradin A, Manley JL, and Prives CL: *Methylation of simian virus 40 Hpa II site affects late, but not early, viral gene expression*. **Proc Natl Acad Sci U S A 79**: 5142-5146 (1982)

51. Francis SH and Corbin JD: *Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases*. **Annu Rev Physiol 56**: 237-272 (1994)

52. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, and Paul CL: *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. **Proc Natl Acad Sci U S A 89**: 1827-1831 (1992)

53. Fruhwald MC and Plass C: *Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential*. **Mol Genet Metab 75**: 1-16 (2002)

54. Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H, Jr., Kneitz B, Edelmann W, and Lisanti MP: *Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities*. **J Biol Chem 276**: 21425-21433 (2001)

55. Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, and Lisanti MP: *Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade*. **EMBO J 17**: 6633-6648 (1998)

56. Galbiati F, Volonte D, Liu J, Capozza F, Frank PG, Zhu L, Pestell RG, and Lisanti MP: *Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism*. **Mol Biol Cell 12**: 2229-2244 (2001)

57. Galbiati F, Volonte D, Minetti C, Chu JB, and Lisanti MP: *Phenotypic behavior of caveolin-3 mutations that cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGMD-1C caveolin-3 mutants within the golgi complex*. **J Biol Chem 274**: 25632-25641 (1999)

58. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, and Ehrlich M: *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. **Nucleic Acids Res 11**: 6883-6894 (1983)

59. Gambaro G, Anglani F, and D'Angelo A: *Association studies of genetic polymorphisms and complex disease*. **Lancet 355**: 308-311 (2000)

60. Gardiner-Garden M and Frommer M: *CpG islands in vertebrate genomes*. **J Mol Biol 196**: 261-282 (1987)

61. Ghadirian P, Howe GR, Hislop TG, and Maisonneuve P: *Family history of prostate cancer: a multi-center case-control study in Canada*. **Int J Cancer 70**: 679-681 (1997)

62. Gleason DF and Mellinger GT: *Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging*. **J Urol 111**: 58-64 (1974)

63. Glenney JR, Jr.: *The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles*. **FEBS Lett 314**: 45-48 (1992)

64. Gonzalgo ML, Bender CM, You EH, Glendening JM, Flores JF, Walker GJ, Hayward NK, Jones PA, and Fountain JW: *Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors*. **Cancer Res 57**: 5336-5347 (1997)

65. Goodchild J, Fellner P, and Porter AG: *The determination of secondary structure in the poly(C) tract of encephalomyocarditis virus RNA with sodium bisulphite*. **Nucleic Acids Res 2**: 887-895 (1975)

66. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, and Thun M: *Cancer statistics, 2001*. **CA Cancer J Clin 51**: 15-36 (2001)

67. Gronberg H, Damber L, and Damber JE: *Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population*. **J Urol 152**: 1484-1487 (1994)

68. Haeusler J, Hoegel J, Bachmann N, Herkommer K, Paiss T, Vogel W, and Maier C: *Association of a haplotype to familial aggressive prostate cancer*. **Publikation in Vorbereitung** (2005)

69. Hajkova P, El Maarri O, Engemann S, Oswald J, Olek A, and Walter J: *DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method*. **Methods Mol Biol 200**: 143-154 (2002)

70. Hammerer P and Huland H: *[Anatomy and sonography of the prostate]*. **Urologe A 28**: 311-316 (1989)

71. Han SE, Park KH, Lee G, Huh YJ, and Min BM: *Mutation and aberrant expression of Caveolin-1 in human oral squamous cell carcinomas and oral cancer cell lines*. **Int J Oncol 24**: 435-440 (2004)

72. Hansen RS, Gartler SM, Scott CR, Chen SH, and Laird CD: *Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene*. **Hum Mol Genet 1**: 571-578 (1992)

73. Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, and Hamaguchi M: *Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers*. **Cancer Res 61**: 2361-2364 (2001)

74. Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, and Iida S: *Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives*. **Biochemistry 9**: 2858-2865 (1970)

75. Hayes RB, Liff JM, Pottern LM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Schwartz AG, Swanson GM, Silverman DT, Brown LM, and Hoover RN: *Prostate cancer risk in U.S. blacks and whites with a family history of cancer*. **Int J Cancer 60**: 361-364 (1995)

76. Helpap B and Rübben H: Prostata-Karzinom. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1998)

77. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarra JR, Linehan WM, and .: *Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma*. **Proc Natl Acad Sci U S A 91**: 9700-9704 (1994)

78. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, and Baylin SB: *Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma*. **Proc Natl Acad Sci U S A 95**: 6870-6875 (1998)

79. Hsing AW, Tsao L, and Devesa SS: *International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality*. **Int J Cancer 85**: 60-67 (2000)

80. Huang H, Qian C, Jenkins RB, and Smith DI: *Fish mapping of YAC clones at human chromosomal band 7q31.2: identification of YACS spanning FRA7G within the common region of LOH in breast and prostate cancer*. **Genes Chromosomes Cancer 21**: 152-159 (1998)

81. Ito Y, Yoshida H, Nakano K, Kobayashi K, Yokozawa T, Hirai K, Matsuzuka F, Matsuura N, Kakudo K, Kuma K, and Miyauchi A: *Caveolin-1 overexpression is an early event in the progression of papillary carcinoma of the thyroid*. **Br J Cancer 86**: 912-916 (2002)

82. Jenkins R, Takahashi S, DeLacey K, Bergstralh E, and Lieber M: *Prognostic significance of allelic imbalance of chromosome arms 7q, 8p, 16q, and 18q in stage T3N0M0 prostate cancer*. **Genes Chromosomes Cancer 21**: 131-143 (1998)

83. Jenkins RB, Qian J, Lee HK, Huang H, Hirasawa K, Bostwick DG, Proffitt J, Wilber K, Lieber MM, Liu W, and Smith DI: *A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer*. **Cancer Res 58**: 759-766 (1998)

84. Jones PA and Baylin SB: *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. **Nat Rev Genet 3**: 415-428 (2002)

85. Jones PA and Taylor SM: *Hemimethylated duplex DNAs prepared from 5-azacytidine-treated cells*. **Nucleic Acids Res 9**: 2933-2947 (1981)

86. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, and Wolffe AP: *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. **Nat Genet 19**: 187-191 (1998)

87. Joos S, Bergerheim US, Pan Y, Matsuyama H, Bentz M, du MS, and Lichter P: *Mapping of chromosomal gains and losses in prostate cancer by comparative genomic hybridization*. **Genes Chromosomes Cancer 14**: 267-276 (1995)

88. Kass SU, Landsberger N, and Wolffe AP: *DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation*. **Curr Biol 7**: 157-165 (1997)

89. Kawana Y, Ichikawa T, Suzuki H, Ueda T, Komiya A, Ichikawa Y, Furuya Y, Akakura K, Igarashi T, and Ito H: *Loss of heterozygosity at 7q31.1 and 12p13-12 in advanced prostate cancer*. **Prostate 53**: 60-64 (2002)

90. Keetch DW, Rice JP, Suarez BK, and Catalona WJ: *Familial aspects of prostate cancer: a case control study*. **J Urol 154**: 2100-2102 (1995)

91. Kelly JM, Goddard JP, and Maden EH: *Evidence on the conformation of HeLa-cell 5.8S ribosomal ribonucleic acid from the reaction of specific cytidine residues with sodium bisulphite*. **Biochem J 173**: 521-532 (1978)

92. Kimura F, Florl AR, Seifert HH, Louhelainen J, Maas S, Knowles MA, and Schulz WA: *Destabilization of chromosome 9 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder*. **Br J Cancer 85**: 1887-1893 (2001)

93. Kobayashi S, Kohda T, Miyoshi N, Kuroiwa Y, Aisaka K, Tsutsumi O, Kaneko-Ishino T, and Ishino F: *Human PEG1/MEST, an imprinted gene on chromosome 7*. **Hum Mol Genet 6**: 781-786 (1997)

94. Kogo H and Fujimoto T: *Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs. Identification Of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing*. **FEBS Lett 465**: 119-123 (2000)

95. Koike M, Takeuchi S, Yokota J, Park S, Hatta Y, Miller CW, Tsuruoka N, and Koeffler HP: *Frequent loss of heterozygosity in the region of the D7S523 locus in advanced ovarian cancer*. **Genes Chromosomes Cancer 19**: 1-5 (1997)

96. Koleske AJ, Baltimore D, and Lisanti MP: *Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A 92**: 1381-1385 (1995)

97. Kolonel LN, Hankin JH, Whittemore AS, Wu AH, Gallagher RP, Wilkens LR, John EM, Howe GR, Dreon DM, West DW, and Paffenbarger RS, Jr.: *Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: a multiethnic case-control study*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9**: 795-804 (2000)

98. Kurzchalia TV, Dupree P, Parton RG, Kellner R, Virta H, Lehnert M, and Simons K: *VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles*. **J Cell Biol 118**: 1003-1014 (1992)

99. Laemmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. **Nature 227**: 680-685 (1970)

100. Lander ES and Schork NJ: *Genetic dissection of complex traits*. **Science 265**: 2037-2048 (1994)

101. Latil A, Baron JC, Cussenot O, Fournier G, Soussi T, Boccon-Gibod L, Le Duc A, Rouesse J, and Lidereau R: *Genetic alterations in localized prostate cancer: identification of a common region of deletion on chromosome arm 18q*. **Genes Chromosomes Cancer 11**: 119-125 (1994)

102. Latil A, Cussenot O, Fournier G, Baron JC, and Lidereau R: *Loss of heterozygosity at 7q31 is a frequent and early event in prostate cancer*. **Clin Cancer Res 1**: 1385-1389 (1995)

103. Laxman R, Currie JL, Kurman RJ, Dudzinski M, and Griffin CA: *Cytogenetic profile of uterine sarcomas*. **Cancer 71**: 1283-1288 (1993)

104. Laybourn PJ and Kadonaga JT: *Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II*. **Science 254**: 238-245 (1991)

105. Lee H, Park DS, Razani B, Russell RG, Pestell RG, and Lisanti MP: *Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a*

dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. **Am J Pathol 161**: 1357-1369 (2002)

106. Lee SW, Reimer CL, Oh P, Campbell DB, and Schnitzer JE: *Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells*. **Oncogene 16**: 1391-1397 (1998)

107. Lesko SM, Rosenberg L, and Shapiro S: *Family history and prostate cancer risk*. **Am J Epidemiol 144**: 1041-1047 (1996)

108. Li B, Adams CC, and Workman JL: *Nucleosome binding by the constitutive transcription factor Sp1*. **J Biol Chem 269**: 7756-7763 (1994)

109. Li L, Yang G, Ebara S, Satoh T, Nasu Y, Timme TL, Ren C, Wang J, Tahir SA, and Thompson TC: *Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells*. **Cancer Res 61**: 4386-4392 (2001)

110. Li S, Couet J, and Lisanti MP: *Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases*. **J Biol Chem 271**: 29182-29190 (1996)

111. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, and Hemminki K: *Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland*. **N Engl J Med 343**: 78-85 (2000)

112. Lilja H: *A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein*. **J Clin Invest 76**: 1899-1903 (1985)

113. Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, and Liaw YF: *Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis*. **Cancer Res 61**: 4238-4243 (2001)

114. Lin JC, Scherer SW, Tougas L, Traverso G, Tsui LC, Andrulis IL, Jothy S, and Park M: *Detailed deletion mapping with a refined physical map of 7q31 localizes a putative tumor suppressor gene for breast cancer in the region of MET*. **Oncogene 13**: 2001-2008 (1996)

115. Lin X, Tascilar M, Lee WH, Vles WJ, Lee BH, Veeraswamy R, Asgari K, Freije D, van Rees B, Gage WR, Bova GS, Isaacs WB, Brooks JD, DeWeese TL, De Marzo AM, and Nelson WG: *GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells*. **Am J Pathol 159**: 1815-1826 (2001)

116. Lisanti MP, Tang Z, Scherer PE, Kubler E, Koleske AJ, and Sargiacomo M: *Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation*. **Mol Membr Biol 12**: 121-124 (1995)

117. Lo KW, Cheung ST, Leung SF, van Hasselt A, Tsang YS, Mak KF, Chung YF, Woo JK, Lee JC, and Huang DP: *Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma*. **Cancer Res 56**: 2721-2725 (1996)

118. Lorch Y, LaPointe JW, and Kornberg RD: *Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones*. **Cell 49**: 203-210 (1987)

119. Lorincz MC, Schubeler D, Goeke SC, Walters M, Groudine M, and Martin DI: *Dynamic analysis of proviral induction and De Novo methylation: implications for a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression*. **Mol Cell Biol 20**: 842-850 (2000)

120. Losa R and Brown DD: *A bacteriophage RNA polymerase transcribes in vitro through a nucleosome core without displacing it*. **Cell 50**: 801-808 (1987)

121. Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, and Sidransky D: *A novel p16INK4A transcript*. **Cancer Res 55**: 2995-2997 (1995)

122. Matsuura K, Shiga K, Yokoyama J, Saijo S, Miyagi T, and Takasaka T: *Loss of heterozygosity of chromosome 9p21 and 7q31 is correlated with high incidence of recurrent tumor in head and neck squamous cell carcinoma*. **Anticancer Res 18**: 453-458 (1998)

123. McLaren A, Gonos ES, Carr T, and Goddard JP: *The conformation of tRNA genes. Chemical modification studies*. **FEBS Lett 330**: 177-180 (1993)

124. McNeal JE: *Morphogenesis of prostatic carcinoma*. **Cancer 18**: 1659-1666 (1965)

125. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, and Stamey TA: *Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread*. **Am J Surg Pathol 12**: 897-906 (1988)

126. Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, and Bird AP: *Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs*. **Cell 58**: 499-507 (1989)

127. Miller K and Weißbach L: *Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen*. **Urologe A 38**: 388-401 (1999)

128. Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, and Zara F: *Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy*. **Nat Genet 18**: 365-368 (1998)

129. Mitelman F: *Catalogue of chromosome aberrations in cancer*. **Cytogenet Cell Genet 36**: 1-515 (1983)

130. Moinova HR, Chen WD, Shen L, Smiraglia D, Olechnowicz J, Ravi L, Kasturi L, Myeroff L, Plass C, Parsons R, Minna J, Willson JK, Green SB, Issa JP, and Markowitz SD: *HLTF gene silencing in human colon cancer*. **Proc Natl Acad Sci U S A 99**: 4562-4567 (2002)

131. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, and Bird A: *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. **Nature 393**: 386-389 (1998)

132. Ng HH and Bird A: *DNA methylation and chromatin modification*. **Curr Opin Genet Dev 9**: 158-163 (1999)

133. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, and Lieber MM: *Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges*. **JAMA 270**: 860-864 (1993)

134. Ohtani-Fujita N, Dryja TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K, Watanabe Y, Hayashi K, Maeda K, Kinoshita S, Matsumura T, Ohnishi Y, Hotta Y, Takahashi R, Kato MV, Ishizaki K, Sasaki MS, Horsthemke B, Minoda K, and Sakai T: *Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma*. **Cancer Genet Cytogenet 98**: 43-49 (1997)

135. Oka N, Yamamoto M, Schwencke C, Kawabe J, Ebina T, Ohno S, Couet J, Lisanti MP, and Ishikawa Y: *Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide*. **J Biol Chem 272**: 33416-33421 (1997)

136. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, and Lisanti MP: *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane*. **J Biol Chem 273**: 5419-5422 (1998)

137. Otterson GA, Khleif SN, Chen W, Coxon AB, and Kaye FJ: *CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 2'deoxycytidine*. **Oncogene 11**: 1211-1216 (1995)

138. Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N, and Walsh P: *Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins*. **Prostate 33**: 240-245 (1997)

139. Paiss T, Worner S, Kurtz F, Haeussler J, Hautmann RE, Gschwend JE, Herkommer K, and Vogel W: *Linkage of aggressive prostate cancer to chromosome 7q31-33 in German prostate cancer families*. **Eur J Hum Genet 11**: 17-22 (2003)

140. Palade GE and Bruns RR: *Structural modulations of plasmalemmal vesicles*. **J Cell Biol 37**: 633-649 (1968)

141. Park DS, Cohen AW, Frank PG, Razani B, Lee H, Williams TM, Chandra M, Shirani J, De Souza AP, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Weiss LM, Tanowitz HB, and Lisanti MP: *Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span*. **Biochemistry 42**: 15124-15131 (2003)

142. Park DS, Lee H, Frank PG, Razani B, Nguyen AV, Parlow AF, Russell RG, Hulit J, Pestell RG, and Lisanti MP: *Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade*. **Mol Biol Cell 13**: 3416-3430 (2002)

143. Park DS, Woodman SE, Schubert W, Cohen AW, Frank PG, Chandra M, Shirani J, Razani B, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Weiss LM, Tanowitz HB, and Lisanti MP: *Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype*. **Am J Pathol 160**: 2207-2217 (2002)

144. Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T, Scherer PE, Mora R, Rodriguez-Boulan E, Peschle C, and Lisanti MP: *Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex*. **J Biol Chem 274**: 25718-25725 (1999)

145. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, and Walsh PC: *The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer*. **J Urol 150**: 110-114 (1993)

146. Parton RG: *Cell biology. Life without caveolae*. **Science 293**: 2404-2405 (2001)

147. Pflug BR, Reiter RE, and Nelson JB: *Caveolin expression is decreased following androgen deprivation in human prostate cancer cell lines*. **Prostate 40**: 269-273 (1999)

148. Prowse AH, Webster AR, Richards FM, Richard S, Olschwang S, Resche F, Affara NA, and Maher ER: *Somatic inactivation of the VHL gene in Von Hippel-Lindau disease tumors*. **Am J Hum Genet 60**: 765-771 (1997)

149. Razani B, Altschuler Y, Zhu L, Pestell RG, Mostov KE, and Lisanti MP: *Caveolin-1 expression is down-regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin-1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation*. **Biochemistry 39**: 13916-13924 (2000)

150. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, Li M, Tang B, Jelicks LA, Scherer PE, and Lisanti MP: *Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities*. **J Biol Chem 277**: 8635-8647 (2002)

151. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H, Jr., Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, and Lisanti MP: *Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities*. **J Biol Chem 276**: 38121-38138 (2001)

152. Razani B, Schlegel A, and Lisanti MP: *Caveolin proteins in signaling, oncogenic transformation and muscular dystrophy*. **J Cell Sci 113 (Pt 12)**: 2103-2109 (2000)

153. Razani B, Woodman SE, and Lisanti MP: *Caveolae: from cell biology to animal physiology.* **Pharmacol Rev 54**: 431-467 (2002)

154. Razin A: *CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection*. **EMBO J 17**: 4905-4908 (1998)

155. Reeves R: *Transcriptionally active chromatin*. **Biochim Biophys Acta 782**: 343-393 (1984)

156. Riggs AD and Jones PA: *5-methylcytosine, gene regulation, and cancer*. **Adv Cancer Res 40**: 1-30 (1983)

157. Robertson KD and Wolffe AP: *DNA methylation in health and disease*. **Nat Rev Genet 1**: 11-19 (2000)

158. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, and Anderson RG: *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. **Cell 68**: 673-682 (1992)

159. Rübben H: Uro-Onkologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Auflage (1997)

160. Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. **Proc Natl Acad Sci U S A 74**: 5463-5467 (1977)

161. Santourlidis S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC, and Schulz WA: *High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate*. **Prostate 39**: 166-174 (1999)

162. Satoh T, Yang G, Egawa S, Addai J, Frolov A, Kuwao S, Timme TL, Baba S, and Thompson TC: *Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients*. **Cancer 97**: 1225-1233 (2003)

163. Schaid DJ: *The complex genetic epidemiology of prostate cancer*. **Hum Mol Genet 13 Spec No 1**: R103-R121 (2004)

164. Scheel J, Srinivasan J, Honnert U, Henske A, and Kurzchalia TV: *Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in Caenorhabditis elegans*. **Nat Cell Biol 1**: 127-129 (1999)

165. Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, and Lisanti MP: *Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo*. **J Biol Chem 272**: 29337-29346 (1997)

166. Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, and Lodish HF: *Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles*. **J Cell Biol 127**: 1233-1243 (1994)

167. Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, and Lisanti MP: *Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family*. **Proc Natl Acad Sci U S A 93**: 131-135 (1996)

168. Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, and Lisanti MP: *Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe*. **J Biol Chem 270**: 16395-16401 (1995)

169. Schulz WA: *DNA methylation in urological malignancies (review)*. **Int J Oncol 13**: 151-167 (1998)

170. Schulz WA, Elo JP, Florl AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, Buchardt M, Seifert HH, and Visakorpi T: *Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma*. **Genes Chromosomes Cancer 35**: 58-65 (2002)

171. Selker EU: *Gene silencing: repeats that count*. **Cell 97**: 157-160 (1999)

172. Shapiro R, Braverman B, Louis JB, and Servis RE: *Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite*. **J Biol Chem 248**: 4060-4064 (1973)

173. Shen L, Fang J, Qiu D, Zhang T, Yang J, Chen S, and Xiao S: *Correlation between DNA methylation and pathological changes in human hepatocellular carcinoma*. **Hepatogastroenterology 45**: 1753-1759 (1998)

174. Shibata A and Whittemore AS: *Genetic predisposition to prostate cancer: possible explanations for ethnic differences in risk*. **Prostate 32**: 65-72 (1997)

175. Shridhar V, Sun QC, Miller OJ, Kalemkerian GP, Petros J, and Smith DI: *Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas*. **Oncogene 15**: 2727-2733 (1997)

176. Shuman S: *Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific*. **Proc Natl Acad Sci U S A 88**: 10104-10108 (1991)

177. Shuman S: *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase*. **J Biol Chem 269**: 32678-32684 (1994)

178. Sleutels F, Barlow DP, and Lyle R: *The uniqueness of the imprinting mechanism*. **Curr Opin Genet Dev 10**: 229-233 (2000)

179. Slusher LB, Gillman EC, Martin NC, and Hopper AK: *mRNA leader length and initiation codon context determine alternative AUG selection for the yeast gene MOD5*. **Proc Natl Acad Sci U S A 88**: 9789-9793 (1991)

180. Smiraglia DJ and Plass C: *The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning*. **Oncogene 21**: 5414-5426 (2002)

181. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, and Lisanti MP: *Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins*. **J Biol Chem 271**: 15160-15165 (1996)

182. Sowa Y, Orita T, Minamikawa S, Nakano K, Mizuno T, Nomura H, and Sakai T: *Histone deacetylase inhibitor activates the WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites*. **Biochem Biophys Res Commun 241**: 142-150 (1997)

183. Stephan C, Jung K, Diamandis EP, Rittenhouse HG, Lein M, and Loening SA: *Prostate-specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein markers for detection of prostate cancer*. **Urology 59**: 2-8 (2002)

184. Struhl K: *Chromatin structure and RNA polymerase II connection: implications for transcription*. **Cell 84**: 179-182 (1996)

185. Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li L, Goltsov A, Ittmann M, Morrisett JD, and Thompson TC: *Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer*. **Cancer Res 61**: 3882-3885 (2001)

186. Takahashi S, Shan AL, Ritland SR, Delacey KA, Bostwick DG, Lieber MM, Thibodeau SN, and Jenkins RB: *Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with tumor aggressiveness and progression*. **Cancer Res 55**: 4114-4119 (1995)

187. Tang Z, Okamoto T, Boontrakulpoontawee P, Katada T, Otsuka AJ, and Lisanti MP: *Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode Caenorhabditis elegans. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes*. **J Biol Chem 272**: 2437-2445 (1997)

188. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, and Lisanti MP: *Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle*. **J Biol Chem 271**: 2255-2261 (1996)

189. Taylor SM and Jones PA: *Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase. Use of 5-azacytosine-containing DNA*. **J Mol Biol 162**: 679-692 (1982)

190. Terwilliger JD and Ott J: *A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations*. **Hum Hered 42**: 337-346 (1992)

191. Thompson TC: *Metastasis-related genes in prostate cancer: the role of caveolin-1*. **Cancer Metastasis Rev 17**: 439-442 (1998)

192. Tobias ES, Hurlstone AF, MacKenzie E, McFarlane R, and Black DM: *The TES gene at 7q31.1 is methylated in tumours and encodes a novel growth-suppressing LIM domain protein*. **Oncogene 20**: 2844-2853 (2001)

193. Tuck-Muller CM, Narayan A, Tsien F, Smeets DF, Sawyer J, Fiala ES, Sohn OS, and Ehrlich M: *DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients*. **Cytogenet Cell Genet 89**: 121-128 (2000)

194. Van Lint C, Emiliani S, and Verdin E: *The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation*. **Gene Expr 5**: 245-253 (1996)

195. Verdel A and Khochbin S: *Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers*. **J Biol Chem 274**: 2440-2445 (1999)

196. Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ, and Kallioniemi OP: *Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization*. **Cancer Res 55**: 342-347 (1995)

197. Wang RY, Gehrke CW, and Ehrlich M: *Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues*. **Nucleic Acids Res 8**: 4777-4790 (1980)

198. Wang XL, Uzawa K, Miyakawa A, Shiiba M, Watanabe T, Sato T, Miya T, Yokoe H, and Tanzawa H: *Localization of a tumour-suppressor gene associated with human oral cancer on 7q31.1*. **Int J Cancer 75**: 671-674 (1998)

199. Waterborg JH and Matthews HR: *Patterns of histone acetylation in Physarum polycephalum. H2A and H2B acetylation is functionally distinct from H3 and H4 acetylation*. **Eur J Biochem 142**: 329-335 (1984)

200. Way M and Parton RG: *M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein [corrected and republished in FEBS Lett 1996 Jan 2;378(1):108-12]*. **FEBS Lett 376**: 108-112 (1995)

201. Whitmore WF, Jr.: *Proceedings: The natural history of prostatic cancer*. **Cancer 32**: 1104-1112 (1973)

202. Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, West DW, Teh CZ, and Stamey T: *Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada*. **Am J Epidemiol 141**: 732-740 (1995)

203. Wiechen K, Diatchenko L, Agoulnik A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schafer R, and Sers C: *Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene*. **Am J Pathol 159**: 1635-1643 (2001)

204. Wiechen K, Sers C, Agoulnik A, Arlt K, Dietel M, Schlag PM, and Schneider U: *Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas*. **Am J Pathol 158**: 833-839 (2001)

205. Williams TM, Cheung MW, Park DS, Razani B, Cohen AW, Muller WJ, Di Vizio D, Chopra NG, Pestell RG, and Lisanti MP: *Loss of caveolin-1 gene expression accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice*. **Mol Biol Cell 14**: 1027-1042 (2003)

206. Williams TM, Lee H, Cheung MW, Cohen AW, Razani B, Iyengar P, Scherer PE, Pestell RG, and Lisanti MP: *Combined loss of INK4a and caveolin-1 synergistically enhances cell proliferation and oncogene-induced tumorigenesis: role of INK4a/CAV-1 in mammary epithelial cell hyperplasia*. **J Biol Chem 279**: 24745-24756 (2004)

207. Witte JS, Goddard KA, Conti DV, Elston RC, Lin J, Suarez BK, Broman KW, Burmester JK, Weber JL, and Catalona WJ: *Genomewide scan for prostate cancer-aggressiveness loci*. **Am J Hum Genet 67**: 92-99 (2000)

208. Xie X and Ott J: *Estimating haplotype frequencies*. **Am J Hum Genet, suppl. 53**: 1107 (1993)

209. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, and Viegas-Pequignot E: *Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene*. **Nature 402**: 187-191 (1999)

210. Yamada E: *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*. **J Biophys Biochem Cytol 1**: 445-458 (1955)

211. Yang G, Addai J, Ittmann M, Wheeler TM, and Thompson TC: *Elevated caveolin-1 levels in African-American versus white-American prostate cancer*. **Clin Cancer Res 6**: 3430-3433 (2000)

212. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT, and Thompson TC: *Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer*. **Clin Cancer Res 4**: 1873-1880 (1998)

213. Yang G, Truong LD, Wheeler TM, and Thompson TC: *Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker*. **Cancer Res 59**: 5719-5723 (1999)

214. Yoshida M, Horinouchi S, and Beppu T: *Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function*. **Bioessays 17**: 423-430 (1995)

215. Yoshida M, Kijima M, Akita M, and Beppu T: *Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A*. **J Biol Chem 265**: 17174-17179 (1990)

216. Zenklusen JC, Bieche I, Lidereau R, and Conti CJ: *(C-A)n microsatellite repeat D7S522 is the most commonly deleted region in human primary breast cancer*. **Proc Natl Acad Sci U S A 91**: 12155-12158 (1994)

217. Zenklusen JC, Conti CJ, and Green ED: *Mutational and functional analyses reveal that ST7 is a highly conserved tumor-suppressor gene on human chromosome 7q31*. **Nat Genet 27**: 392-398 (2001)

218. Zenklusen JC, Thompson JC, Klein-Szanto AJ, and Conti CJ: *Frequent loss of heterozygosity in human primary squamous cell and colon carcinomas at 7q31.1: evidence for a broad range tumor suppressor gene*. **Cancer Res 55**: 1347-1350 (1995)

219. Zenklusen JC, Thompson JC, Troncoso P, Kagan J, and Conti CJ: *Loss of heterozygosity in human primary prostate carcinomas: a possible tumor suppressor gene at 7q31.1*. **Cancer Res 54**: 6370-6373 (1994)

220. Zenklusen JC, Weitzel JN, Ball HG, and Conti CJ: *Allelic loss at 7q31.1 in human primary ovarian carcinomas suggests the existence of a tumor suppressor gene*. **Oncogene 11**: 359-363 (1995)

221. Zhao YY, Liu Y, Stan RV, Fan L, Gu Y, Dalton N, Chu PH, Peterson K, Ross J, Jr., and Chien KR: *Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice*. **Proc Natl Acad Sci U S A 99**: 11375-11380 (2002)

222. Zhu WG, Dai Z, Ding H, Srinivasan K, Hall J, Duan W, Villalona-Calero MA, Plass C, and Otterson GA: *Increased expression of unmethylated CDKN2D by 5-aza-2'-deoxycytidine in human lung cancer cells*. **Oncogene 20**: 7787-7796 (2001)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation habe ich in der Abteilung Humangenetik der Universität Ulm unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Walther Vogel angefertigt. Mein Dank gilt allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders danken möchte ich….

• **Herrn Prof. Dr. Walther Vogel** dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in der Abteilung Humangenetik anzufertigen und für die Bereitstellung des interessanten und aktuellen Themas, für die sehr gute Betreuung, die anregenden Diskussionen und die produktive Zusammenarbeit sowie für die kritische Durchsicht der Manuskripte und dieser Arbeit, seiner ausdauernde Geduld und seine Großzügigkeit;

• **Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler** für die Bereitschaft, als Gutachter der Arbeit einzutreten;

• **Herrn PD Günter Assum** für seine Einwilligung als Berichterstatter einzutreten, für seine Anregungen und Hilfestellungen;

• **Herrn Prof. Dr. Thomas Paiss** für seine Bereitschaft, die Aufgabe des Wahlberichterstatters zu übernehmen und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung der Patienten- und Kontroll-DNAs;

• **Herrn Prof. Dr. Walter Just** für sein offenes Ohr und seine Hilfen;

• **Herrn Dr. Josef Högel** für die statistischen Berechnungen;

• **Frau Dr. Christiane Maier** für die gute und konstruktive Zusammenarbeit und den Spaß;

• **Frau Dipl. Biol. Andrea Striebe**l für die gute Freundschaft, ihre Hilfe und den hohen Spaßfaktor;

• **Herrn Dr. Jürgen Häussler**, der zu Beginn die Arbeit betreut hat;

• **Herrn Herbert Heinz** für die Lösung aller Computer-Probleme und noch viel mehr;

• den **Patienten** und ihren **Familien** für ihre Mitarbeit.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung möchte ich für die sehr angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfe und Unterstützung danken.

Besonders dankbar bin ich den Mitgliedern „meiner“ Arbeitsgruppe:

• **Frau Petra Reutter** und **Frau Margot Brugger** für den Spaß, die gute Zusammenarbeit und ganz besonders ihre stetige technische Unterstützung, ohne die die Masse der Untersuchungen kaum zu bewältigen gewesen wäre.

• **Frau Regina Heidenreich** für die stets helfende Hand.

Auch allen nicht erwähnten Mitarbeitern danke ich für das gute Arbeitsklima. Ich habe sehr gerne in dieser Abteilung gearbeitet und werde mit Freude an diese Zeit zurückdenken.