

Anterior Gradient 2 Genprodukte als Marker und Regulatoren der Prostatakrebsprogression

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Stefanie Bormann

aus Emmerich am Rhein

2012

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
Referent: Prof. Dr. Andrew C. B. Cato
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Kämper
Tag der mündlichen Prüfung: 20.4.2012

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation eigenständig angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommenes Gedankengut als solches gekennzeichnet. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis habe ich in der gültigen Fassung beachtet. Ich versichere außerdem, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Karlsruhe, den 6. März 2012

Stefanie Bormann
(Diplom Biologin)

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die zur Zeit häufigste Krebserkrankung bei Männern in Deutschland. Da es derzeit keine Heilung für die Erkrankung gibt, sind ein besseres Verständnis der Vorgänge während der Progression von Prostatakrebs und eine verbesserte Früherkennung wichtig.

In einem Vergleich der Genexpressionsprofile von benignem um Prostatakrebsgewebe konnte human Anterior Gradient 2 (AGR2) als im Krebs überexprimiert identifiziert werden. Aufgrund eines N-terminalen Signalpeptids wird AGR2 von Prostatakrebszellen sekretiert und ist deswegen auch als möglicher neuer Marker für Prostatakrebs interessant. Da AGR2 in einer Reihe weiterer Karzinome überexprimiert wird, ist die Nutzung des AGR2 Proteins in seiner Spezifität eingeschränkt. Aus diesem Grund wurde der Nachweis von AGR2 mRNA getestet und konnte als nutzbarer Marker im Urinsediment von Prostatakrebspatienten charakterisiert werden. Für eine weitere Optimierung der Prostataspezifität wurden verschiedene Zelllinien auf das Vorkommen von AGR2 Spleißvarianten hin untersucht. Sechs Spleißvarianten konnten identifiziert werden, wovon eine Variante Prostataspezifität zeigte und fünf gesteigerte Expression in Gewebeproben von Prostatakrebspatienten im Vergleich zu benignen Proben. Sie werden daher weiter als mögliche Prostatakrebsmarker charakterisiert.

Für die Bestimmung der Rolle von AGR2 bei der Progression von Prostatakrebs wurden 22Rv.1 Zellen mit einer stabilen AGR2 Überexpression generiert. Die Zellen zeigten verringerte Proliferation, hervorgerufen durch einen G2/M Arrest, was zu geringerer Tumorgröße in *in vivo* Xenograft Mausmodellen führte. Gleichzeitig führte die AGR2 Überexpression zu gesteigerter Migration und Invasion, was eine Rolle von AGR2 in der Metastasierung vermuten lässt, wie es auch schon für andere Karzinome angenommen wurde. Überraschenderweise führte auch ein AGR2 Knock Down zu verringerter Proliferation, was auf eine genaue Regulation der AGR2 Expression hinweist. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression von AGR2 und dem homologen Protein AGR3 invers miteinander korrelieren und dass sowohl die Überexpression als auch der Knock Down von AGR2 einen negativen Einfluss auf die Expression seiner bekannten Regulatoren FoxA1 und FoxA2 hat.

Basierend auf diesen Ergebnissen scheint AGR2 eine Rolle bei der Metastasierung und der EMT zu spielen. Dies scheint im Zusammenhang mit der positiven Regulation von AGR2 und zellulären Stressbedingungen zu stehen.

Abstract

Prostate cancer is currently the most common cancer among men in Germany. As there is so far no curative treatment for the disease, a better understanding of the processes during prostate cancer progression and an improvement of the early detection of the carcinoma are of importance.

Comparisons of the gene expression profile of benign prostate and prostate cancer tissue identified the human Anterior Gradient 2 (AGR2) as overexpressed in cancer. Due to an N-terminal signal peptide AGR2 is secreted by prostate cancer cells and is therefore also interesting as a possible new marker for prostate cancer. Since AGR2 is also expressed in other carcinomas, the usage of the AGR2 protein is limited in its specificity. For this reason, the presence of AGR2 mRNA in urine sediment of prostate cancer patients has been analysed and found to be a more useful and reliable marker of the disease. To further increase the prostate specificity, cell lines of different tumour and non-tumour origin were screened for the expression of AGR2 splice variants. Six splice variants were identified, one of which showed a clear prostate specificity. However in tumour biopsies, all but one splice variant showed increased expression in prostate cancer tissue compared to benign tissue. These splice variants will be further characterized as possible prostate cancer markers.

To analyse the role of AGR2 during prostate cancer progression, 22Rv.1 cells with a stable AGR2 overexpression were generated. These cells showed decreased proliferation, which can be correlated to a G2/M cell cycle arrest, and they also showed a decreased tumour size in *in vivo* Xenograft mouse models. At the same time AGR2 overexpression bestowed on prostate cancer cells increased migratory and invasive properties, suggesting a role of AGR2 in the metastasis formation. Intriguingly, AGR2 knock down also caused decreased proliferation, suggesting a role of distinct levels of AGR2 protein in the control of prostate tumour growth. Further studies showed that AGR2 level was inversely correlated with the level of expression of its homologue AGR3 and that overexpression as well as a knock-down of AGR2 had a negative effect on the expression of its regulators, FoxA1 and FoxA2.

Based on these results, a role of AGR2 in metastasis formation and the EMT seems likely. This seems to be connected to the positive regulation of AGR2 in cellular stress conditions.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Prostatakrebs	1
1.2 AGR2 als möglicher Marker für das Prostatakarzinom?	3
1.3 Anterior Gradient	4
1.3.1 <i>Xenopus</i> und Salamander Anterior Gradient (XAG und nAG)	4
1.3.2 Maus Anterior Gradient (mAG)	5
1.4 Humanes Anterior Gradient (AGR oder hAG)	6
1.4.1 AGR2 und AGR3 in Krebs	8
1.4.2 AGR2 in der Unfolded Protein Response	10
2. Zielsetzung	13
3. Material	14
3.1 Chemikalien und Bezugsquellen	14
3.1.1 Allgemeine Chemikalien	14
3.1.2 Zellkulturchemikalien	15
3.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte	16
3.3 Antikörper	16
3.3.1 Primäre Antikörper	16
3.3.2 Sekundäre Antikörper	17
3.4 Oligonukletidprimer	17
3.4.1 Primer zur Klonierung	17
3.4.2 Primer für die Identifizierung von AGR2 Spleißvarianten	18
3.4.3 Primer für die cDNA Synthese	18
3.4.4 Primer für die Realtime PCR	18

	Seite
3.5 Plasmide und Lentiviruspartikel (shRNA)	19
3.6 Bakterienstämme	20
3.7 Enzyme	20
3.8 Zelllinien	20
3.8.1 Prostata(karzinom)zelllinien	20
3.8.2 Andere Zelllinien	21
3.9 Puffer, Lösungen und Medien	21
4. Methoden	23
4.1 DNA- und RNA-Methoden	23
4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA („Miniprep“ und „Maxiprep“)	23
4.1.2 Isolierung von gesamt-RNA aus Zellen	24
4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	24
4.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	25
4.1.5 Generierung von cDNA	25
4.1.6 Realtime PCR	26
4.1.7 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen	26
4.2 Klonierungstechniken	27
4.2.1 Scheiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen und Ligation von DNA	27
4.2.2 Transformation kompetenter Bakterien	27
4.2.4 Klonierung von AGR2 Spleißvarianten	28
4.3 Zellkulturmethoden	28
4.3.1 Kulturbedingungen	28
4.3.2 Passagieren von Zellen	28
4.3.3 Bestimmung der Zellzahl	29
4.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
4.3.5 Transfektion von Zellen	29
4.3.6 Generierung einer Zelllinie mit stabiler AGR2 Überexpression	30
4.3.7 Generierung einer Zelllinie mit stabilem AGR2 Knock Down	30
4.3.8 Koloniebildungsassays	30

	Seite
4.3.9 Bestimmung der Zellproliferation	31
4.3.10 Analyse des Zellzyklusprofils mit FACS	32
4.3.11 Induktion von ER Stress	32
4.3.12 Immunfluoreszenzfärbungen	32
4.3.13 Wundheilungsassays	33
4.3.14 Boyden-Kammer Assay	33
4.4 Proteinmethoden	34
4.4.1 Präparation von Proteinen aus Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	34
4.4.2 Präzipitation von Proteinen aus Zellkulturüberstand	34
4.4.3 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	35
4.4.4 Immuniblot-Analyse von Proteinen (Western Blot)	35
4.4.5 Strippen von Western Blot-Membranen	36
4.5 Xenograft Tumor-Modelle in athymischen Nacktmäusen	36
4.6 Statistik	37
5. Ergebnisse	38
5.1 AGR2 wird von verschiedenen benignen und malignen Prostatazelllinien exprimiert und sekretiert	38
5.2 Charakterisierung von AGR2 als potentieller Marker für das Prostatakarzinom	40
5.2.1 Identifikation von AGR2 Spleißvarianten	40
5.2.2 Quantitativer Nachweis der identifizierten AGR2 Spleißvarianten in verschiedenen Karzinomzelllinien	44
5.2.3 Quantitativer Nachweis der identifizierten AGR2 Spleißvarianten in Gewebeproben von Prostatakrebspatienten	46
5.3 Funktionelle Charakterisierung von AGR2 durch Überexpression	49
5.3.1 AGR2 ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert	49
5.3.2 AGR2 vermindert das Zellwachstum in einem Koloniebildungsassay	52
5.3.3 AGR2 beeinflusst die Proliferation von Prostatakrebszellen	55
5.3.4 AGR2 Überexpression verursacht einen G2/M Zellzyklusarrest	56
5.3.5 AGR2 Level beeinflussen die Cyclin B1 und cdc2 Expression	58

	Seite
5.3.6 AGR2 Überexpression führt zu gesteigerter Migration und Invasivität von Prostatakrebszellen	60
5.3.7 AGR2 Überexpression führt zu vermindertem Tumorwachstum <i>in vivo</i>	62
5.4 Funktionelle Charakterisierung von AGR2 durch Knock Down	64
5.4.1 AGR2 beeinflusst die Proliferation von Prostatakrebszellen	64
5.4.2 AGR2 Knock Down verursacht einen G1/G0 Zellzyklusarrest	65
5.5 AGR2 und AGR3 Expressionslevel korrelieren invers	67
5.5.1 AGR2 Level beeinflussen die FoxA1 und FoxA2 Expression	70
5.6 ER Stress führt zu gesteigerter AGR2 Expression	71
5.6.1 Ein AGR2 Knock Down hat keinen Effekt auf die ER Stressreaktion	74
6. Diskussion	78
6.1 AGR2 Spleißvarianten als mögliche Marker für das Prostatakarzinom	79
6.2 AGR2 in Prostatakrebs – eine Rolle bei der Metastasierung?	80
6.2.1 AGR2 verringert die Zahl der Kolonien in einem Koloniebildungsassay	80
6.2.2 AGR2 verringert die Proliferation und induziert Migration und Invasion	81
6.2.3 Die Inhibierung der Proliferation durch AGR2 geschieht über einen G2/M und/ oder einen G1/G0 Zellzyklusarrest	83
6.2.4 AGR2 Überexpression führt zu verminderter Tumorgröße in <i>in vivo</i> Xenograft Tumormodellen	84
6.2.5 AGR2 wird in späten Prostatakrebsstadien weniger stark exprimiert als in frühen Stadien	85
6.2.6 ER Stress führt zu gesteigerter AGR2 Expression	87
6.3 AGR2 und AGR3 Expression korrelieren invers	90
6.3.1 AGR2 beeinflusst FoxA1 und FoxA2 Proteinlevel	91
7. Literatur	94
Danksagung	102
Curriculum Vitae	103

Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 1	Aminosäuresequenz von AGR2 und AGR3	7
Abb. 2	Schematische Darstellung der drei Hauptsignalwege der Unfolded Protein Response PERK, IRE1 und ATF6	11
Abb. 3	Western Blot Analyse der Expressions- und Sekretionslevel von AGR2 in verschiedenen Prostatakrebszelllinien und zwei benignen Prostataepithellinien	39
Abb. 4	Expression des kurzen und langen AGR2 Transkript in verschiedenen Zelllinien	42
Abb. 5	Schematische Darstellung der aus cDNA verschiedener Prostata-(krebs)zelllinien isolierten ARG2 Spleißvarianten sowie deren Expression in verschiedenen Prostata(krebs)zelllinien (nicht quantitative PCR)	43
Abb. 6	Quantitative Analyse der Expression der zuvor identifizierten AGR2 Spleißvarianten C, E, F, G und H in verschiedenen Zelllinien	45
Abb. 7	Analyse der Expression (relative mRNA Menge) des kurzen und langen AGR2 Transkripts (AGR2 ST/ LT) und von AGR3 in Gewebeproben von Prostatakrebspatienten	47
Abb. 8	Analyse der Expression (relative mRNA Menge) der AGR2 Spleißvarianten C, E, F, G und H in Gewebeproben von Prostatakrebspatienten	48
Abb. 9	Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von AGR2	51
Abb. 10	Koloniebildungsassay in 22Rv.1, PC3 und Du145 Zellen	52
Abb. 11	Koloniebildungsassay mit Expressionsvektoren von Wildtyp AGR2 (AGR2 WT), AGR2 mit einem mutierten PDI Motiv (C81A, AGR2 PDI mut) und AGR2 ohne KTEL Motiv (L172Stop, AGR2 trunc KTEL)	54
Abb. 12	Analyse des Einflusses einer AGR2 Überexpression auf die Proliferation von 22Rv.1 Prostatakrebszellen	56
Abb. 13	Analyse des Zellzyklusprofils von 22Rv.1 AGR2 überexprimierenden Klonen (pooled Clones)	57

		Seite
Abb 14	Nachweis der Expression und Phosphorylierung von an der G2/M Grenze beteiligten Proteinen in AGR2 überexprimierenden 22Rv.1 Zellen	59
Abb. 15	Einfluss von AGR2 Überexpression auf Migration und Invasion von 22Rv.1 Zellen	61
Abb. 16	<i>In vivo</i> Xenograft Experiment mit AGR2 überexprimierenden Klonen und entsprechenden Leervektor Kontrollklonen in athymischen Nacktmäusen	63
Abb. 17	Analyse des Einflusses eines AGR2 Knock Downs auf die Proliferation von VCaP Prostatakrebszellen	65
Abb. 18	Bestimmung des Einflusses eines AGR2 Knock Downs auf das Zellzyklusprofil von VCaP Zellen	66
Abb. 19	Analyse eines möglichen Zusammenhangs der AGR2 und AGR3 Expression in VCaP Zellen	68
Abb. 20	Western Blot Analyse der Proteinlevel von FoxA1, FoxA2 und Androgenrezeptor (AR) als bekannte AGR2 und AGR3 Regulatoren	70
Abb. 21	Regulation von AGR2 unter ER Stressbedingungen	73
Abb. 22	Untersuchung des Effekts eines AGR2 Knock Downs auf basalen ER Stress über die Bestimmung von GRP78	74
Abb. 23	AGR2, AGR3 und GRP78 Proteinlevel und mRNA Mengen in VCaP Kontroll- (C-1, C-2) und AGR2 Knock Down Klonen (2-1, 2-2, 2-3, 2-4) nach Induktion von ER Stress	76
Abb.24	Hypothese zur Rolle von AGR2 bei der Entstehung und Progression von Prostatakrebs	89

Abkürzungsverzeichnis

AGR	Anterior Gradient
AR	Androgen-Rezeptor
BSA	engl. <i>bovine serum albumine</i>
DEPC	Diethylen Pyrocarbonat
cDNA	copy DNA
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
ECL	engl. <i>enhanced chemofluorescence</i>
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
et al.	lateinisch: et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
GS	engl. <i>Gleason score</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Poly-Acrylamid Gelelektrophorese
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCa	engl. <i>Prostate cancer</i> (Prostatakrebs)
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase (Familie)
Pdi	Protein Disulfid Isomerase (Protein)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
shRNA	engl. <i>Short/ small hairpin RNA</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	engl. <i>Tris buffered saline</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

Einheiten

°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pmol	Picomol
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
U	Unit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin(säure)
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin

L	Leu	Leuzin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin(säure)

1. Einleitung

1.1 Prostatakrebs

Das Prostatakarzinom ist mit 26% die derzeit häufigste Krebserkrankung bei Männern in Deutschland und verursacht 10% aller Sterbefälle durch Krebs (GEKID 2010). Das Risiko einer Prostatakrebskrankung kann durch eine Reihe von Faktoren erhöht werden. Dazu gehören neben einer familiären Prädisposition (Bostwick et al. 2004) auch die Ernährung (Hori et al. 2011) und (chronische) Entzündungen (De Marzo et al. 2007). Die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN), eine dysplastische Veränderung des sekretorischen Epithels der Prostata, kann eine direkte Vorstufe von Prostatakrebs sein (Keetch et al. 1995). Eine weitere besondere Rolle spielt das Androgen Testosteron, welches auch für das Wachstum des normalen Prostatagewebes wichtig ist. Dies zeigt sich unter anderem bei dem Vergleich ethnischer Gruppen in Hinblick auf Testosteronlevel und Prostatakrebsfälle: So haben afroamerikanische Männer ein um 15% höheres Testosteronlevel als europäisch-amerikanische Männer, was mit einem doppelt so hohen Prostatakrebsrisiko einhergeht (Ross et al. 1986).

Aufgrund der Rolle der Androgene bei der Entstehung und Weiterentwicklung von Prostatakrebs wird häufig eine Androgenablationstherapie nach der Entfernung der Prostata zur Therapie des Karzinoms angewendet. Diese kann 1) in Form einer Kastration oder durch den Einsatz von Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) Analoga, wodurch die Testosteronlevel herabgesetzt werden, 2) durch Behandlung mit Anti-Androgenen wie Flutamide oder Bicalutamide, welche die Bindung des Hormons an seinen Rezeptor, den Androgenrezeptor, verhindern oder 3) durch eine Kombination aus Androgenablation und Anti-Androgenen (maximale Androgen Blockade, MAB) erfolgen (Debes und Tindall 2002). Diese Art der Behandlung führt in vielen Fällen zunächst zu einer erfolgreichen Bekämpfung des Karzinoms, allerdings kann es im Verlauf der Behandlung zur Entwicklung eines androgenunabhängigen Phänotyps des Tumors kommen, d.h. dass dieser unabhängig von Androgenen wächst (sog. kastrationsresistente Tumore). Für die Entwicklung dieses kastrationsresistenten Stadiums von Prostatakrebs werden verschiedenen Ursachen vermutet. Eine Hauptrolle spielen dabei Mutationen im Androgenrezeptorgen bzw. in den Genen von Faktoren, die

für die Funktion des Androgenrezeptors wichtig sind. Durch diese Mutationen kann es zum Beispiel zu einer gesteigerten Sensitivität für Androgene, zur Aktivierung des Androgenrezeptors durch andere Liganden als Testosteron/ Dihydrotestosteron, zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors oder zur Aktivierung der Expression Androgen-regulierter Gene unabhängig vom Androgenrezeptor kommen (Feldmann und Feldmann).

Während die Zahl der Neuerkrankungen steigt, ist die Sterberate durch Prostatakrebs rückläufig, was auf verbesserte Früherkennungsmaßnahmen zurückzuführen ist. Die Früherkennung erfolgt in der Regel durch eine digital-rektale Untersuchung der Prostata sowie durch die Bestimmung von molekularen Markern des Karzinoms im Blut. Seit Mitte der 1980er Jahre wird die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Serum von Patienten zum Nachweis des Prostatakarzinoms eingesetzt. PSA ist eine Serin-Protease, die von Prostataepithel sekretiert wird. Allerdings ist PSA zwar prostataspezifisch, aber nicht prostatakrebspezifisch (Zhang et al. 2005). Hinzu kommt, dass auch bei gutartigen Veränderungen der Prostata wie der benignen Prostatahyperplasie (BPH) und der Prostatitis das PSA-Level ansteigt bzw. ansteigen kann (Nadler et al. 1995). Die Überschneidung von PSA-Werten bei Patienten mit benignen Veränderungen der Prostata und Patienten mit Prostatakrebs sowie eine große Zahl an Einflüssen, die den PSA-Wert verändern können, limitieren PSA als Prostatakrebsmarker. Da PSA in einer freien und in einer an Proteine gebundenen Form vorliegt, wird zur Optimierung der Genauigkeit von PSA als Marker neben der Bestimmung des freien PSA auch das Verhältnis zwischen freiem und protein-gebundenem PSA bestimmt (Tosoian and Loeb 2010). Darüber hinaus liegt freies PSA in verschiedenen Isoformen wie z.B. proPSA vor, welche ebenfalls zur Erhöhung der Genauigkeit des Prostatakrebsnachweises genutzt werden können (Tosoian und Loeb 2010).

Trotz der allgemeinen Nutzung und Akzeptanz von PSA als Marker für das Prostatakarzinom besteht nach wie vor der Bedarf nach einem spezifischeren Marker. Optimal wäre dabei ein Marker, der auch die Möglichkeit bietet aggressive von weniger aggressiven Tumoren unterscheiden zu können. Mögliche Kandidaten für einen solchen Marker können mRNA oder Proteinprodukte von Genen sein, die in Prostatakrebs spezifisch überexprimiert werden. Auf Basis dessen konnten in einem Vergleich von benignem Prostatagewebe und Prostatakrebsgewebe neben einer Vielzahl

unterschiedliche regulierter Gene die beiden Gene human Anterior Gradient 2 und 3 (AGR2 und AGR3) als im Karzinom verstärkt exprimiert und als mögliche neue Markerkandidaten identifiziert werden (Cato und Nestl (online)).

1.2 AGR2 als möglicher Marker für das Prostatakarzinom?

Die beiden homologen Proteine AGR2 und AGR3 werden von Prostatakrebsgewebe überexprimiert und sezerniert (Zhang et al. 2005). Die Expression von AGR3 ist dabei geringer als die von AGR2, weshalb zunächst nur die Nutzung von AGR2 als möglicher Marker für das Prostatakarzinom untersucht wurde. AGR2 Protein und mRNA konnten bereits in Urinproben von Prostatakrebspatienten nachgewiesen werden, während bei gesunden Männern kein oder nur sehr geringe Mengen mRNA bzw. Protein detektiert werden konnten (Bu et al. 2011, Wayner et al. 2011).

Bei der Nutzung von AGR2 als Marker für das Prostatakarzinom ist allerdings die große Zahl verschiedener Gewebe, für die eine verstärkte Expression von AGR2 bei maligner Veränderung beschrieben wurde, nicht außer Acht zu lassen. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass AGR2 zwar ein krebspezifischer aber kein prostatakebspezifischer Marker wäre. So wurde zum Beispiel die Nutzung von AGR2 als Marker in Gastrointestinal- und Brustkrebs (da Costa et al. 2011, Valladares-Ayerbes et al. 2008) sowie zum Nachweis von Blasenkrebs (Marin-Aguilera et al. 2012) ebenfalls bereits untersucht. Auch die Möglichkeit AGR2 im Serum bzw. Plasma von Frauen mit Eierstockkrebs (Edgell et al. 2010, Park et al. 2011, Rice et al. 2010) und im Pankreassaft bei frühen Pankreaskrebsstadien nachzuweisen (Chen et al. 2010), wurde bereits gezeigt.

Das so auftretende Problem der fehlenden Spezifität für Prostatakrebs kann zum Beispiel dadurch umgangen werden, dass der AGR2 mRNA Nachweis in Urinproben von Prostatakrebspatienten mit dem bisher verwendeten PSA Nachweis, also vor dem Hintergrund eines prostataspezifischen Proteins, kombiniert wird. Für eine solche Kombination, genauer die Bestimmung des AGR2 mRNA/ PSA Verhältnisses, konnte bereits eine höhere Spezifität und Sensitivität im Vergleich zum Nachweis von PSA alleine gezeigt werden (Bu et al. 2011). Neben der Wildtyp mRNA von AGR2 besteht die Möglichkeit, dass AGR2 mRNA auch in verschiedenen Spleißvarianten auftritt. Die

Wahrscheinlichkeit dafür ist hoch, da sowohl in Prostatakrebs als auch in Leberkarzinomen verschiedene AGR2 Transkripte bereits nachgewiesen werden konnten (Vivekanandan et al. 2009, Zhang et al. 2005, Zheng et al. 2006). Ob es in bösartig verändertem Prostatagewebe tatsächlich zu alternativen Spleißvorgängen kommt, wurde noch nicht untersucht. Falls dabei prostata- oder sogar prostatakrebsspezifische mRNA Transkripte entstehen, könnten diese für eine Optimierung der Nutzung von AGR2 mRNA als Marker dienen.

Neben der Untersuchung ob es möglich ist, AGR2 als neuen Marker für das Prostatakarzinom zu nutzen, ist auch die Charakterisierung der Funktion von AGR2 in Prostatakrebs von Bedeutung. Durch das bessere Verständnis der an der Entstehung und Entwicklung von Prostatakrebs beteiligten Faktoren können neue Ansatzpunkte für die Behandlung des Karzinoms bestimmt werden.

1.3 Anterior Gradient

Die Anterior Gradient (AG) Proteine kodierenden Gene bilden eine evolutiv konservierte Gruppe von Genen bzw. Proteinen, die bereits in *Xenopus* (XAG-1 und XAG-2), Salamandern (nAG), Kugelfisch (tAG-2), Lachs (sAG-2), Zebrafisch (zAG-2), Maus (mAG-2 und mAG-3) und Mensch (hAG oder AGR2 und AGR3) beschrieben wurden (Aberger et al. 1998, Shih et al. 2007). Die jeweiligen AG-Proteine zeigen eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz, die größten Unterschiede finden sich jeweils im N-terminalen Bereich (Shih et al. 2007). Die Funktionen der Proteinen scheinen sich im jeweiligen Organismus zu unterscheiden, können aber dennoch Hinweise auf die Funktion des humanen Proteins geben, welche bislang nur unvollständig bekannt ist.

1.3.1 *Xenopus* und Salamander Anterior Gradient (XAG und nAG)

Im Krallenfrosch *Xenopus laevis* finden sich zwei homologe Proteine, *Xenopus* Anterior Gradient 1 und 2 (XAG-1/ XAG-2). Es konnte gezeigt werden, dass XAG-2 eine Rolle bei der Entwicklung und Spezifizierung des embryonalen Ectoderms spielt. Das

Protein wird in der Mucus bildenden Zementdrüse exprimiert und von den Zellen sezerniert (Aberger et al. 1998). Die Expression von XAG-2 wird dabei positiv von durch Organisatorgewebe gebildeten Proteinen wie Chordin, Noggin, Cerberus oder Follistatin reguliert, die alle an der Induktion der Bildung der Zementdrüse sowie von Neuralgewebe beteiligt sind. XAG-2 selber induziert die Marker für neurales Gewebe, wie N-Cam (neurale cell adhesion molecule), otx2 (orthodenticle homeobox 2) und XIF3 (*Xenopus intermediate filament gene 3*) über Fibroblast Growth Factor (FGF) Signalwege (Aberger et al. 1998).

Die zeitliche und räumliche Expression von XAG-2 sowie die beteiligten induzierenden und induzierten Faktoren zeigen eine Rolle von XAG-2 bei der Musterung des dorsoanterioren Neuralgewebes und bei der Bildung der Zementdrüse. Obwohl XAG-1 in einem ähnlichen zeitlichen und räumlichen Muster wie XAG-2 exprimiert wird, konnte bisher noch keine Funktion des Proteins gezeigt werden (Aberger et al. 1998).

In Salamandern konnte nAG als Ligand für das Zelloberflächenprotein Prod1 identifiziert werden. Das Protein spielt eine Rolle bei der Festlegung der proximodistalen Achse während der Neubildung amputierter Gliedmaßen, einem Prozess zu welchem Salamander fähig sind (Kumar et al. 2007). Während die Expression und Sekretion von nAG in unverletztem Gewebe eher schwach war, stiegen sie nach der Amputation einer Gliedmaße stark an. Es konnte gezeigt werden, dass sezerniertes nAG über die Bindung an Prod1 die Proliferation der Blastemzellen im Bereich der Wunde direkt positiv beeinflusst und damit die frühe Regeneration einer abgetrennten Gliedmaße herbeiführt (Kumar et al. 2007). Bisher konnte kein Homolog für Prod1 in anderen Vertebraten beschrieben werden (Garza-Garcia et al. 2009).

1.3.2 Maus Anterior Gradient (mAG)

Die Funktion des Maus-Homologs von AGR2 konnte unter anderem über AGR2 Knock Out Mäuse charakterisiert werden. Der AGR2 Knock Out hatte keinen Einfluss auf das Überleben der Tiere in frühen Entwicklungsphasen. Allerdings zeigten die Tiere verminderte Mucusproduktion, eine vermehrte Expression von Genen, welche mit Entzündungen assoziiert werden, sowie häufiges auftreten von Mastdarmvorfällen

(Park et al. 2009). Diese Beobachtungen konnten darauf zurückgeführt werden, dass AGR2 in intestinalen Becherzellen eine Rolle als Protein-Disulfid-Isomerase, also als Chaperon bei der Produktion und Reifung des Mucin-Proteins MUC2 (Mucin 2) im Endoplasmatischen Retikulum übernimmt (Park et al. 2009).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das ER Chaperon GRP78 (Glukose-reguliertes Protein 78 kDa), welches als Marker für ER Stress genutzt wird (Ron und Walter 2007), in Dünndarmzellen von AGR2 Knock Out Mäusen verstärkt exprimiert wurde (Zhao et al. 2010). Gleichzeitig konnte die gespleißte mRNA eines weiteren Stressmarkers (Xbp1, X-Box Bindeprotein 1) nur in AGR2 Knock Out Mäusen, nicht aber in den Wildtypmäusen nachgewiesen werden. Dies weist auf eine mögliche Funktion von AGR2 unter ER Stressbedingungen hin. Vermutlich übernimmt AGR2 dabei ähnlich wie bei der Reifung von MUC2 eine Rolle als Chaperon bei der Wiederherstellung der ER Homöostase, wenn diese z.B. durch die Anreicherung ungefalteter Proteine gestört wird.

1.4 Humanes Anterior Gradient (AGR oder hAG)

Die für AGR2 und AGR3 (nach alter Nomenklatur hAG2 und 3), die beiden humanen Homologe der AG Proteine, kodierenden Gene liegen auf Chromosom 7, Position 21.3, wo sie durch etwa 60 kb genomischer DNA voneinander getrennt sind (Petek et al. 2000). Die resultierenden Proteine stimmen zu 64% in ihrer Aminosäuresequenz überein und sind zu 74% aus chemisch ähnlichen Aminosäuren aufgebaut. Die meisten Unterschiede finden sich im Bereich einer N-terminalen hydrophoben Signalsequenz (Fletcher et al. 2003). Das AGR2 Gen besitzt 8 Exons und kodiert im Open Reading Frame (ORF) für 175 Aminosäuren. Das resultierende Protein hat ein ungefähres Molekulargewicht von 17 kDa. In Prostatagewebe wurden zwei unterschiedliche AGR2 mRNA Transkripte beschrieben, ein kürzeres mit etwa 0,9 Kilobasenpaaren („kurzes Transkript“) und ein längeres mit einem verlängerten 3' nicht translatierten Bereich und 1,6 kb („langes Transkript“). Beide mRNAs kodieren für das gleiche Protein, die kürzere Form findet sich in Gewebeproben allerdings häufiger als die lange. Das lange Transkript wurde hingegen als spezifisch für Prostatagewebe und -zellen beschrieben (Zhang et al. 2005, Zheng et al. 2006). Auch das AGR3 Gen besitzt 8 Exons und wird von

einer 751 bp großen mRNA zu 166 Aminosäuren translatiert. Das auf dem Gen kodierte Protein hat ein ungefähres Molekulargewicht von 19 kDa.

Die ersten 20 Aminosäuren der AGR2 bzw. die ersten 23 Aminosäuren der AGR3 Aminosäuresequenz umfassen ein N-terminales Signalpeptid, dessen Prozessierung zur Sekretion von AGR2 und AGR3 durch die Zellen in den extrazellulären Raum führt (Fletcher et al. 2003, Ramachandran et al. 2008). Ein zentrales CXXS Motiv ordnet beide Proteine der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) zu (Abb. 1) (Persson et al. 2005). PDIs sind als Chaperone innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums aktiv und spielen eine Rolle bei der Proteinreifung indem sie inkorrekte Disulfidbrücken auflösen und/ oder neue schaffen. Ob humanes AGR2 wie das Maushomolog eine Funktion als PDI übernimmt, ist noch nicht geklärt, allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass humanes AGR2 wie viele PDI Familienmitglieder unter ER Stressbedingungen vermehrt exprimiert wird (Higa et al. 2011, Persson et al. 2005).

1	M E K I P V S A F - L L L V A L S Y T L A R D T T V K P G A	AGR2
1	M M L H S A L G L C L L L V T V S - - - - - S N L A I A I	AGR3
30	K K D T K D S R P K L P Q T L S R G E G D Q L I W T Q T Y E	AGR2
25	K K E K R - - - - P P Q T L S R G E G D D I T W V Q T Y E	AGR3
60	E A L Y K S K T S N K P L M I I H H L D E C P H S Q A L K K	AGR2
50	E G L F Y A Q K S K K P L M V I H H L E D C Q Y S Q A L K K	AGR3
90	V F A E N K E I Q K L A E Q - F V L L N L V Y E T T D K H L	AGR2
80	V F A Q N E E I Q E M A Q N K F I M L N L M H E T T D K N L	AGR3
119	S P D G Q Y V P R I M F V D P S L T V R A D I T G R Y S N R	AGR2
110	S P D G Q Y V P R I M F V D P S L T V R A D I A G R Y S N R	AGR3
149	L Y A Y E P A D T A L L L D N M K K A L K L L K T E L	AGR2
140	L Y T Y E P R D L P L L I E N M K K A L R L I Q S E L	AGR3

Abb. 1: Aminosäuresequenzen von AGR2 und AGR3. Die grauen Felder markieren übereinstimmende Aminosäuren in beiden Sequenzen. Die rot unterlegten Kästen zeigen das N-terminale Signalpeptid, das zentrale PDI Motiv CXXS sowie das C-terminale KTEL bzw. QSEL Motiv (nach Fletcher et al. 2003).

Am C-terminalen Ende beider Proteine findet sich wie bei vielen anderen PDIs (Persson et al. 2005) ein KTEL (AGR2) bzw. ein QSEL Motiv (AGR3), eine Variante eines KDEL Motivs, welches von Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum erkannt wird und zur Lokalisation eines Proteins im ER führt (Abb. 1) (Lewis und Pelham 1990). Die Lokalisation von AGR2 im Endoplasmatischen Retikulum von Zellen konnte bereits gezeigt werden (Higa et al. 2011).

1.4.1 AGR2 und AGR3 in Krebs

AGR2 und AGR3 wurden zuerst als in Brustkrebs überexprimierte Proteine beschrieben (Adam et al. 2003, Fletcher et al. 2003, Thompson und Weigel 1998). Dabei konnte gezeigt werden, dass AGR2 und AGR3 in der Mehrzahl der untersuchten Proben miteinander coexprimiert werden (Fletcher et al. 2003). Für AGR2 konnte auch eine Coexpression mit dem Estrogenrezeptor nachgewiesen werden (Thompson und Weigel 1998). Neben Brustkrebsgeweben konnte eine vermehrte Expression von AGR2 und AGR3 im Vergleich zu unveränderten Geweben außerdem in Prostatakrebs (Cato and Nestl, Zhang et al. 2007) und in Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden (Edgell et al. 2010, King et al. 2011).

AGR2 wird darüber hinaus in weiteren Geweben exprimiert. Dabei handelte es sich hauptsächlich um ektodermale Gewebe mit Mucus sezernierenden Zellen und/ oder Organe, die eine endokrine Funktion übernehmen (Thompson und Weigel 1998). Eine gesteigerte Expression von AGR2 in bösartig veränderten Geweben im Vergleich zum benignen Gewebe konnte neben Brustkrebs (Innes et al. 2006, Thompson and Weigel 1998) und Prostatakrebs (Zhang et al. 2005, Zhang et al. 2007) im Gastrointestinalkarzinom (Valladares-Ayerbes et al. 2008), in Pankreaskrebs (Ramachandran et al. 2008), Lungenkrebs (Fritzsche et al. 2007), Leberkrebs (Vivekanandan et al. 2009), Magenkrebs (Lee do et al. 2011) und im Barrett-Karzinom der Speiseröhre (Wang et al. 2008) nachgewiesen werden. Eine verringerte Expression im Vergleich zum benignem Gewebe zeigte sich hingegen in Kolonkarzinomen (Lee et al. 2006). Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung kann das AGR2 Maushomolog liefern, bei welchem eine Verringerung der Expression im Dünndarm von Mäusen zu verminderter Mucusproduktion, verstärkter Expression von entzündungsassoziierten

Proteinen sowie zu einem erhöhten Vorkommen von Kolitis führt (Park et al. 2009, Zhao et al. 2010).

Für gesteigerte Level von AGR2 konnte außerdem gezeigt werden, dass sie in Brustkrebs mit frühen Tumorstadien sowie mit einer schlechten Prognose für die Patienten korrelieren (Hrstka et al. 2010, Innes et al. 2006). Ähnliches gilt für Prostatakrebspatienten: Auch hier zeigen frühe Tumorstadien die stärkste AGR2 Expression, gleichzeitig korrelieren hohe AGR2 Level mit einer schlechten Prognose (Bu et al. 2011, Zhang et al. 2007). In späten Prostatakrebsstadien korrelieren niedrige AGR2 Level hingegen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für ein erneutes Auftreten des Tumors nach einer Prostatektomie (Maresh et al. 2010).

Welche Funktion das AGR3 Protein in Zellen übernimmt und welche Rolle es bei der malignen Veränderung von Geweben spielt ist noch unklar. Die Zugehörigkeit zur Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen sowie Erkenntnisse über eine Funktion von AGR2 können allerdings jeweils Hinweise auf die mögliche Funktion von AGR3 geben. Die folgenden Ausführungen werden sich aus diesem Grund auf AGR2 konzentrieren.

Die Rolle von AGR2 bei der Entstehung von malignen Veränderungen scheint zu sein, dass die Überexpression des Proteins in Karzinomzellen diesen einen Wachstumsvorteil verschafft. So konnte gezeigt werden, dass Zellen des Pankreaskarzinoms verstärkt in die Apoptose gehen, wenn sie mit chemotherapeutischen Agenzien behandelt werden, nachdem die AGR2 Expression durch Knockdown herabgesetzt wurde (Ramachandran et al. 2008). Entsprechend führte die Überexpression von AGR2 in Brustkrebszellen zu einer erhöhten Viabilität der Zellen bei Behandlung mit Chemotherapeutika (Hrstka et al. 2010). Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass AGR2 mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle in Stressreaktionen von Zellen übernimmt. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von AGR2 in Zellen des Barrett-Ösophagus zu einem Stopp des Zellzyklus in G₂/M führt, wenn die DNA der Zellen geschädigt war. Dies und die zusätzliche Beobachtung, dass AGR2 die Aktivität von p53 bei DNA-Schäden vermindert, lässt vermuten, dass AGR2 ein Survival Factor ist (Pohler et al. 2004). Diese Vermutung wird unterstützt von der Feststellung, dass auch physiologischer Stress, wie z.B. Hypoxie oder die verminderte Versorgung mit Nährstoffen (zum Beispiel durch geringe Serumkonzentrationen in der Zellkultur) zu einer starken Induktion der AGR2 Expression führt (Zweitzig et al. 2007).

Neben dieser Rolle von AGR2 unter Stressbedingungen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von AGR2 in einer Ratten Mammazelllinie (Rama37) bei Injektion in Ratten zur Bildung von Metastasen des Primärtumors führt, während die mit dem Leervektor transfizierten Zellen den nicht metastasierenden Phänotyp der Zelllinie zeigten. Die Größe der Primärtumore zeigte dabei keine Unterschiede, allerdings wurden die AGR2 Tumore von einer größeren Zahl Blutgefäße vaskularisiert (Liu et al. 2005). Wurden die AGR2 Expressionslevel durch Knockdown in einer Ösophaguskarzinom-Zelllinie (SEG-1) verringert, zeigten die Zellen vermindertes verankerungsunabhängiges Wachstum und die von diesen Zellen in einem *in vivo* Xenograft-Experiment gebildeten Tumore waren kleiner als die der Kontrolle (Wang et al. 2008). Auf Basis dieser Beobachtungen lässt sich eine Rolle von AGR2 bzw. der erhöhten AGR2 Expression bei der Metastasierung von Tumoren vermuten. Dafür spricht auch, dass eine Überexpression von AGR2 in Brustkrebszellen sowie in Prostatakrebszellen zu verbesserter Invasivität und, wie auch in Zellen des Ovarialkarzinoms, zu vermehrter Migration führt (Bu et al. 2011, Park et al. 2011, Zhang et al. 2010). Eine Verminderung der AGR2 Expression durch Knockdown führte entsprechend zu verminderter Invasivität von Zellen (Bu et al. 2011, Ramachandran et al. 2008, Zhang et al. 2010) sowie zu vermindertem anheftungsunabhängigem Wachstum (Vanderlaag et al. 2010).

1.4.2 AGR2 in der Unfolded Protein Response

Neben einer möglichen Rolle von AGR2 bei der Bildung von Metastasen übernimmt das Protein mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle in Stressreaktionen der Zelle. Aufgrund der ER Lokalisation des Proteins und der Zugehörigkeit zur Chaperon-Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass AGR2 eine Rolle bei ER Stressreaktionen, genauer der Unfolded Protein Response (UPR) spielt. Die Unfolded Protein Response ist eine Reaktion auf die Anreicherung von ungefalteten oder inkorrekt gefalteten Proteinen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Dabei wird zunächst die Neusynthese von Proteinen transient gestoppt, anschließend werden Chaperongene vermehrt exprimiert um die korrekte Faltung von Proteinen wieder gewährleisten zu können. Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung der ER-assozierten

Proteindegradation (ERAD), einem System in dem inkorrekt gefaltete Proteine im Proteasom abgebaut werden (Lai et al. 2007). Die Regulation und Aktivierung der UPR geschieht dabei über drei Hauptsignalwege bzw. über drei im ER lokalisierte Stresssensoren IRE1 (inositol-requiring 1), PERK (PRKR-like endoplasmic reticulum kinase) und ATF6 (activating transcription factor 6) (Abb. 2) (Lai et al. 2007).

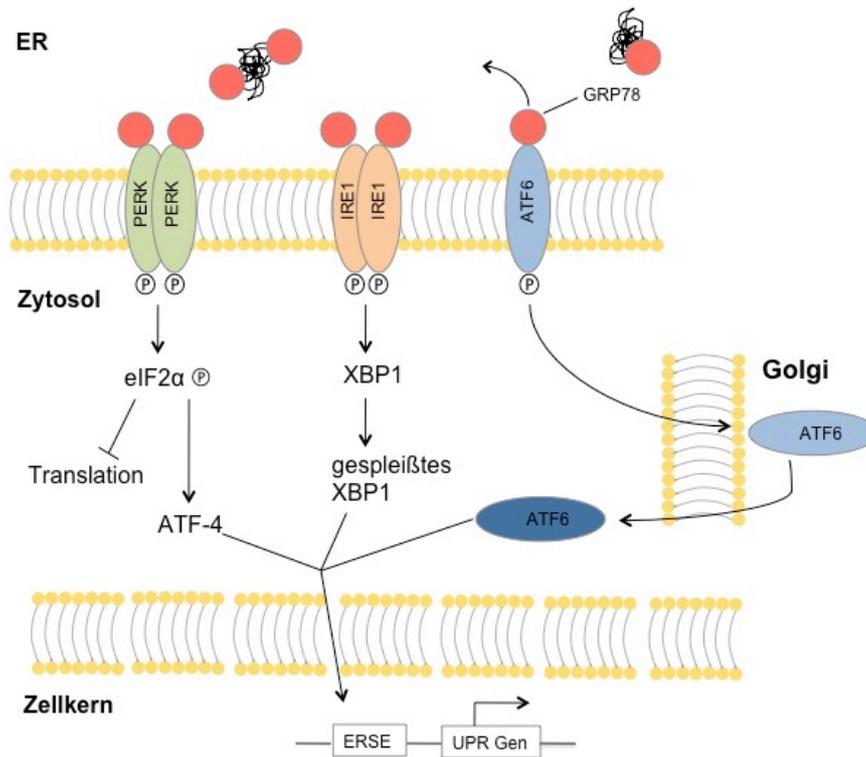


Abb. 2: Schematische Darstellung der drei Hauptsignalwege der Unfolded Protein Response PERK, IRE1 und ATF6. Bei der Akkumulation ungefalteter Proteine im Lumen des ER dissoziiert GRP78 von den drei Stresssensoren, welche daraufhin phosphorylieren und dimerisieren (PERK, IRE1) bzw. im Golgi prozessiert werden (ATF6). PERK phosphoryliert und inaktiviert eIF2α, wodurch die Translation gestoppt wird. ATF-4 (activating transcription factor 4) Translation wird selektiv aktiviert. Die Aktivierung von IRE1 führt zu einem alternativen Spleißevent bei XBP1, welches dadurch aktiviert wird. ATF6 wird bei ER Stress in den Golgiapparat transloziert und dort in seine aktive Form prozessiert. ATF4, gespleißtes XBP1 und prozessiertes ATF6 translozieren anschließend in den Zellkern, wo sie an ER Stress responsive Elemente (ERSEs) binden und die Expression von an der UPR beteiligten Genen, wie z.B. Chaperone und PDIs, aktivieren.

Eine fehlerhafte Regulation der Unfolded Protein Response Signalwege oder einzelner UPR Komponenten wird mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, z.B. neurodegenerative Krankheiten oder Stoffwechselstörungen wie Diabetes. Letztere wurde in Mausmodellen durch Xbp1 oder Perk Knockout und eIF2 α Mutationen ausgelöst (Malhotra und Kaufman 2007, Ozcan et al. 2004, So et al. 2009). Neben diesen Krankheiten ist auch in Krebs die UPR häufig gestört. So kommt es bei vielen Tumortypen zu einer Überexpression verschiedener UPR Proteine (Ma und Hendershot 2004, So et al. 2009). Gesteigerte GRP78 Level konnten zum Beispiel in Krebszelllinien der Brust, des Kolons und aus Adenokarzinomen nachgewiesen werden, wo die erhöhten Level in der Regel auch mit einem größeren Tumolvolumen korrelierten. In Leberzellkarzinomen werden zusätzlich auch Xbp1 und ATF6 verstärkt exprimiert (Scriven et al. 2007, So et al. 2009).

Die Rolle von Proteinen der Unfolded Protein Response bei der Entstehung und Progression von Prostatakrebs ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings konnten erhöhte GRP78 Level in kastrationsresistenten Prostatakrebsstadien nachgewiesen werden, was einen Hinweis auf eine mögliche Rolle der UPR in Prostatakrebs gibt (Pootrakul et al. 2006). In einem Mausmodell verschiedener Prostatakrebsstadien konnte gezeigt werden, dass die Expression einer großen Zahl von an der UPR beteiligten Genen mit dem Fortschreiten der Krankheit herunterreguliert wird. Gleiches gilt auch für kastrationsresistente Stadien und bezieht sich auf alle drei Signalwege der UPR (Ouyang et al. 2008, So et al. 2009).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass AGR2 in Zervix- sowie in Leberkarzinomzellen unter ER-Stressbedingungen verstärkt exprimiert wird und dass die Regulation des AGR2 Levels über die IRE1 und ATF6 Signalwege der UPR geschieht. Ein Knock Down von AGR2 führt im Gegenzug zu einer erhöhten Sensibilität der Zellen auf ER Stress (Higa et al. 2011). In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass AGR2 über neu gebildete Proteinketten mit den Ribosomen am rauen Endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist, was für eine Rolle des Proteins als PDI Chaperon bei der Faltung neuer Proteine spricht (Higa et al. 2011).

Neben der erhöhten Sensibilität von Zellen auf ER Stress bei einem AGR2 Knock Down konnte außerdem gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von AGR2 Komponenten der ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD) wie Edem1 (ER degradation enhancer mannosidase alpha-like 1) verstärkt exprimiert werden. War die Expression von Edem1

und AGR2 gleichzeitig vermindert, wurden vermehrt Autophagiesignalwege aktiviert, was darauf hinweist, dass AGR2 vermutlich die Balance zwischen ER assoziierter Degradation und Autophagie kontrolliert (Higa et al. 2011).

2. Zielsetzung

Die beiden homologen Proteine human Anterior Gradient 2 und 3 (AGR2 und AGR3) werden in der in Deutschland derzeit häufigsten Krebserkrankung bei Männern, dem Prostatakarzinom, überexprimiert. Die genaue Rolle, die diese beiden Proteine in Prostatakrebszellen übernehmen, ist noch nicht bekannt. Aufgrund der Zugehörigkeit zur Chaperon-Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen besteht die Möglichkeit, dass AGR2 und AGR3 eine Rolle in ER Stressreaktionen der Zelle übernehmen. Untersuchungen in verschiedenen Karzinomen unterstützen diese Vermutung für AGR2 und zeigen außerdem, dass AGR2 eine Rolle bei der Metastasierung von Tumoren spielt. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass AGR2 als Marker für das Prostatakarzinom genutzt werden kann.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der Rolle von AGR2 bei der Progression von Prostatakrebs. Dabei sollen außerdem Prostatakrebszelllinien und -gewebe auf das Vorkommen bisher nicht beschriebener Spleißvarianten untersucht werden, welche als mögliche Marker für das Prostatakarzinom in Frage kommen.

3. Material

3.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit entsalztem Wasser angesetzt und wenn nötig und möglich autoklaviert.

3.1.1 Allgemeine Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquellen
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ampizillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
CellTiter Blue	Promega, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxy-Nukleosid-triphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
DiI Cell Labelling Solution	Life Technonolgies, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
ECL-Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
DNA-Gel-Extraktionskit	Peqlab, Erlangen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Peqlab, Erlangen
Hefeextrakt (für Bakterien-Medien)	Roth, Karlsruhe
Insta-Gel Plus (Scintillation Counting)	PerkinElmer, Waltham, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kristall-Violett	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergrünzburg
1 kb-Marker (DNA-Marker)	Peqlab, Erlangen

2-β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Boehringer, Mannheim
peqGold RNA Pure	Peqlab Erlangen
Phosphatpuffer (PBS)	Gibco, Eggenstein
Promega Plasmid Miniprep Kit	Promega, Mannheim
Protease-Inhibitor-Mix (PIC)	Sigma, Steinheim
Protein-Ladder (Proteinmarker)	Peqlab, Erlangen
Röntgenfilme (ECL und MP)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfat SDS	Roth, Karlsruhe
StrataClean Resin	Stratagene, Amsterdam
SYBR-Green Mix	Qiagen, Hilden
Thapsigargin	Life Technologies, Karlsruhe
5' ³ H-Thymidin	Hartman Analytic, Braunschweig
Trypton (für Bakterien-Medien)	Roth, Karlsruhe
Tunicamycin	Sigma, Steinheim
Tween-20	Roth, Karlsruhe
QIAGEN Plasmid Maxiprep Kit	QIAGEN, Düsseldorf

3.1.2 Zellkulturchemikalien

Chemikalien	Bezugsquellen
CCS (Charcoal stripped Calf Serum)	Perbio, Logan (USA)
Dulbecco`s Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe
Fibronectin	Life Technologies, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS)	PAA, Pasching
Fugene	Roche, Mannheim
Geneticin (G418)	Sigma, Steinheim
Insulin	Sigma, Steinheim
Matrigel	BD Bioscience, Heidelberg

Poly-L-Lysin-Hydrobromid	Sigma, Steinheim
Puromycin	Calbiochem, Bad Soden
RPMI 1640 (synthetisches Kulturmedium)	Gibco, Karlsruhe
Trypsin (0,25%)	Life Technologies, Karlsruhe

3.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die Verbrauchsmaterialien für Labor- und Zellkulturexperimente wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham (Braunschweig); FujiFilm (Düsseldorf); Greiner (Frickenhäuser); Millipore (Eschbronn); Thermo Scientific (Langenselbold).

Geräte	Bezugsquellen
Steri-Cult CO ₂ Inkubator	Labotect, Göttingen
Kühlzentrifuge Typ 5417R	Eppendorf, Hamburg
Liquid Scintillation Counter	Wallac ADL, Freiburg
PCR-Maschine PTC 200	MJ Research, Watertown
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
StepOne Plus (Realtime)	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank EN12469	CleanAir
Tomtec Cell Harvester	Wallac ADL, Freiburg

3.3 Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-AGR2	Monoklonal aus Maus, Abcam
Anti-AGR3	Monoklonal aus Maus, Abcam
Anti-AR (N20)	Monoklonal aus Kaninchen, Santa Cruz
Anti-β-Aktin	Polyklonal aus Maus, Sigma

Anti-Cyclin B1	Monoklonal aus Maus, Cell Signalling
Anti-cdc2	Monoklonal aus Maus, Cell Signalling
Anti-pcdc2 (Y15)	Monoklonal aus Kaninchen, Cell Sign.
Anti-FoxA1	Monoklonal aus Maus, Abcam
Anti FoxA2	Monoklonal aus Maus, Abcam
Anti-GRP78 (BIP)	Monoklonal aus Ziege, Santa Cruz
Anti- α -Tubulin	Monoklonal aus Maus, Santa Cruz

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Anti-Maus, HRP-konjugiert	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Anti-Ziege, HRP-konjugiert	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Alexa Fluor 488 anti Maus (Immunhisto.)	Life Technologies, Karlsruhe

3.4 Oligonukleotidprimer

3.4.1 Primer zur Klonierung

AGR2 (BamHI) F: 5' GCG GGA TCC AGA GTT GCC ATG GAG AAA ATT CCA 3'

AGR2 (EcoRI) R: 5' GCG GAA TTC TTA CAA TTC AGT CTT CAG CAA CTT 3'

AGR2 PDI mut F: 5' CTT GGA TGA GGC CCC ACA CAG TC 3'

AGR2 PDI mut R: 5' GAC TGT GTG GGG CCT CAT CCA AG 3'

AGR2 trunc KTEL F: 5' CTC AAG TTG CTG TAG ACT GAA TTG T 3'

AGR2 trunc KTEL R: 5' ACA ATT CAG TCT ACA GCA ACT TGA G 3'

3.4.2 Primer für die Identifizierung von AGR2 Spleißvarianten

AGR2 Exon 1L F: 5' GGG GAA AGG AAG GTT CGT TTC 3'
AGR2 Exon 1 F: 5' CGA CTC ACA CAA GGC AGG T 3'
AGR2 Exon 2 F: 5' ATG GAG AAA ATT CCA GTG TCA GCA 3'
AGR2 Exon 8 R: 5' TCC ACA CTA GCC AGT CTT CTC A 3'

3.4.3 Primer für die cDNA-Synthese

β-Aktin (für die Kontroll-PCR)

Forward: 5' CTC CTG AGC GCA AGT ACT CC 3'
Reverse: 5' GTC ACC TTC ACC GTT GTT CCA GT 3'

3.4.4 Primer für die Realtime PCR

Rib34B4 (humane ribosomale Untereinheit):

Forward: 5' GAA GGC TGT GGT GCT GAT GG 3'
Reverse: 5' GTC ACC TTC ACC GTT CCA GT 3'

AGR2, Langes Transkript:

99 Forward: 5' TCA GCC ACG ATG AAT TAG GA 3'
307 Reverse: 5' GCA AGA ATG CTG ACA CTG GA 3'

AGR2, kurzes Transkript:

16 Forward: 5' CGA CTC ACA CAA GGC GCT 3'
143 Reverse: 5' GCT CCA GGT TTG ACT GTG GT 3'

AGR3: 140 Forward: 5' GCAATA AAA AAG GAA AAG AGG CC 3'

320 Reverse: 5' GGG CAA ATA CTT TCT TTA GTG CTT GA 3'

GRP78: Forward: 5' GGT GCT GAT GTC CCT CTG TC 3'

Reverse: 5' TTG GAG GTG AGC TGG TTC TT 3'

SV C: Forward: 5' CAC AAG GCA GAG TTG CCA TGG 3'

SV E: Forward: 5' ATC TGG TCA CCC ATC TCT GA 3'

SV F: Forward: 5' GGA AAT CCA GAC CCA TCT CTG 3'

SV G: Forward: 5' AAG GCA GGT ACA GCT CTG 3'

Reverse SV C, E, F G: 5' TCC ACA CTA GCC AGT CTT CTC A 3'

SV H Forward: 5' ATG GAG AAA ATT CCA GTG TCA GCA 3

Reverse: 5' AGA CAT ATG AAG AAC CTC TCA AGT 3'

3.5 Plasmide und Lentiviruspartikel (shRNA)

pcDNA3.1 und pcDNA3.1 AGR2 (Wildtyp, PDI mutc, trunc KTEL)

5428 bp großer Leervektor mit einer Ampizillin-Resistenz für die Bakterien-Selektion und einer Neomycin-Resistenz für die Selektion von Säugerzellen mit G418. Zur Sequenzierung des Vektor-Inserts wurde ein T7-Primer verwendet. Der Vektor wurde in dieser Arbeit als Leervektor für Kontrolltransfektionen, sowie für die Generierung eines AGR2-Vektorkonstruktes verwendet. pcDNA3.1 AGR2 wurde außerdem für die Generierung von AGR2 PDI und KTEL Mutanten durch Quickchange PCR eingesetzt.

Lentiviruspartikel

Zur Generierung eines stabilen AGR2 Knockdowns wurden MISSION® shRNA Lentiviral Transduction Particles der Firma Sigma-Aldrich verwendet (TRCN0000146537 NM_06408.2-400sc1c). Sequenz:

CCGGGACAAACACCTTTCTCCTGATCTCGAGATCAGGAGAAAGGTGTTTGTCTTTTTTG

3.6 Bakterienstämme

Der für Klonierungen verwendete Bakterienstamm DH5 α zählt zu der Zellbank des Instituts für Toxikologie und Genetik (ITG) und hat folgenden Genotyp:

F, *endA1*, *hsdR17* (*rk*-, *mk*+), *supE44* Δ *lacU169*(ϕ 80*lacZ* Δ *M15*), *thi-1*, *1*;
recA1, *gyrA96*, *relA1*

3.7 Enzyme

Alle erwähnten Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt), Gibco (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot) und Roche (Mannheim) bezogen.

3.8 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien stammen aus der Zellbank des Instituts für Toxikologie und Genetik. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturschalen der Firma Greiner aus Frickenhausen in einem Inkubator bei 37°C, 6% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, in RPMI Medium mit 10% FCS kultiviert.

3.8.1 Prostata(karzinom)zelllinien

BPH-1: Humane Zelllinie, gewonnen aus einer benignen Prostata-Hyperplasie.

DuCaP: Humane Zelllinie aus Dura Mater-Gewebe eines Mannes mit Prostatakrebs.

Du-145: Humane Zelllinie aus einem Tumor im Gehirn eines Mannes mit PCa.

LNCaP (LNCaP(F)): Humane Zelllinie, die aus einer Lymphknoten-Metastase eines PCa-Patienten. Die Zellkulturplatten wurden vor dem Aussähen der Zellen mit Poly-L-Lysin Hydrobromid beschichtet.

LNCaP abl: Von der LNCaP-Zelllinie abstammende menschliche Zelllinie, die durch Kultivierung von androgen-sensitiven LNCaP-Zellen in Medium ohne Androgen gewonnen wurde. LNCaP abl/78 wurden in RPMI 1640 plus 10% CCS kultiviert. Die Zellkulturplatten wurden vor dem Aussähen der Zellen mit Poly-L-Lysine Hydrobromid beschichtet.

PC3: Humane Zelllinie aus einer Lendenwirbelmetastase eines Prostatakarzinoms.

PNT2: Humane Zelllinie aus normalem Prostataepithel

22Rv.1: Humane Zelllinie aus einem primären Prostatakarzinom.

VCaP: Humane Zelllinie aus einer Prostatakrebsmetastase in einem Wirbel.

3.8.2 Andere Zelllinien

Hek-293T: Humane embryonale Nierenepithelzelllinie.

HeLa: Humane Zervixkarzinomzelllinie.

HepG2: Humane Leberkarzinomzelllinie.

Ishikawa: Humane Endometriumkarzinom-Zelllinie. DMEM Medium.

JEG-3: Humane Chorionkarzinomzelllinie.

T47-D: Humane Zelllinie aus dem Pleuraerguss einer Brustkrebspatientin. Dem Medium wurde 0,6 µg/ml Insulin zugegeben.

MCF-7: Humane Zelllinie aus dem Pleuraerguss einer Frau mit Brustkrebs. DMEM Med.

3.9 Puffer, Lösungen und Medien

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der nicht käuflich erworbenen Puffer, Lösungen und Medien aufgelistet.

Laemmli Elektrophoresepuffer

Tris	25 mM
Glyzin	192 mM
SDS	0,1 %

1x LB-Medium (1 Liter in H₂O; autoklaviert verwendet):

Trypton	10 g
Natriumchlorid	10 g
Hefeextrakt	5 g

Lysispuffer (für Zellen):

NaCl	50 mM
Tris pH 8,0	50 mM
EDTA pH 8,0	5 mM
Nonidet P40	1 %
PIC	10 µl/ml (bei Gebrauch zugeben)

2x SDS-Probenpuffer:

Tris pH 6,8	160 mM
SDS	4 %
Glycerol	20 %
2-β-Mercaptoethanol	4 %

Färbung durch Zugabe von etwas Bromphenolblau.

Stripping Lösung (für Westernblot-Membranen):

1M Tris, pH 6,8	3,2 ml
20% SDS	5 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
H ₂ O	41,4 ml

50x TAE-Puffer

Tris Base	40 mM
Konz. Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM
pH 8,9	

TBS

Tris base	25 mM
NaCl	137 mM
pH 7,6	

10x Westernblot-Transferpuffer

Tris	20 mM
Glyzin	192 mM
Methanol	20%

4. Methoden

4.1 DNA- und RNA-Methoden

4.1.1 Präparation von Plasmid-DNA („Miniprep“ und „Maxiprep“)

Für die Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA wurde das Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim) verwendet. Dabei wurde 1 ml einer Bakterien- Übernachtskultur für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Zell-Resuspensionslösung resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Lysispuffer unter Zugabe von 10 µl alkaliner Protease für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Durch Zugabe von 350 µl Neutralisierungslösung wurde die Lyse gestoppt. Das Lysat wurde für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf eine DNA-bindende Säule gegeben. Das Lysat wurde in der Säule für 1 min abzentrifugiert und die Säule mit 750 µl Waschpuffer gewaschen. Nach 1 min bei 13.000 rpm wurde der Waschschrift mit 250 µl Puffer wiederholt. Um den Waschpuffer vollständig zu entfernen, wurde die Säule für 1 min trocken zentrifugiert und die DNA anschließend mit 80 µl Nuklease-freiem Wasser durch Zentrifugation in ein frisches Eppendorfgefäß eluiert.

Für die Präparation von großen Mengen Plasmid-DNA wurden Materialien aus dem Plasmid-Purification-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die mit dem entsprechenden Plasmid transformierten Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 220 rpm in 300 ml 1xLB Kulturmedium hochgeschüttelt. Die Kultur wurde anschließend bei 6000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml Resuspensionspuffer resuspendiert. Zu der Suspension wurden 10 ml Lysispuffer sowie nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur 10 ml Neutralisationspuffer. Das Lysat wurde daraufhin 20 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Die zur Aufreinigung verwendete DNA-bindende Säule wurde mit 10 ml Äquilibriumspuffer QBF gewaschen und mit dem Überstand des Lysats beladen. Nachdem dieser vollständig aus der Säule getropft war, wurde diese zweimal mit dem Waschpuffer gewaschen und die DNA mit 15 ml Elutionspuffer in ein Falcontube eluiert. Durch Zugabe der 0,7-fachen Menge an Isopropanol wurde die DNA gefällt und für 40

min bei 4000 rpm pelletiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit eiskaltem 80% Ethanol gewaschen, dazwischen erfolgte je eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 min. Anschließend wurde die DNA unter dem Abzug getrocknet und in 350 µl Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop, die Lagerung der DNA bei -20°C.

4.1.2 Isolierung von gesamt-RNA aus Zellen

Zur Isolation von RNA wurden ausschließlich RNase-freie Materialien sowie Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Die Zellen, aus denen RNA isoliert werden sollte, wurden in 1 ml PeqGold RNA Pure (peqlab, Erlangen) aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Probe für 15 sec kräftig gevortext. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die Probe für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere, die RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Eppi überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Die Probe wurde erneut gevortext und wie zuvor zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein Eppi mit 5 µl Glycogen pipettiert. Durch Zugabe des gleichen Volumens Isopronaol und Inkubation auf Eis für 15 min wurde die RNA gefällt. Durch Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 10 min bei 4°C wurde die RNA anschließend pelletiert. Die RNA wurde zweimal mit 75% EtOH (in DEPC-Wasser) gewaschen und danach an der Luft getrocknet. Nach vollständigem Verdampfen des Ethanols wurde die RNA in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Durch Erhitzen auf 37°C für 10 min und 65°C für 5 min wurde die RNA gelöst und die Konzentration anschließend am NanoDrop bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Gerät NanoDrop ND-1000 verwendet. Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) einer Probe bei 260 nm. Eine $OD_{260}=1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA.

4.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Für die Amplifizierung von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde die Matrizen-DNA mit 1/10 Volumen 10x PCR-Probenpuffer, 1/30 Volumen 10mM dNTPs, 1/10 Volumen der beiden Primer (Forward und Reverse; 10 pmol) sowie 2 U Taq-Polymerase versetzt. Die Reaktion lief in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen ab: Die Denaturierung der DNA erfolgte für 45 sec bei 95°C, die Anlagerung der Primer für 45 sec bei 50°C und die DNA-Synthese für 1,5 min bei 72°C. Insgesamt wurden 30 solche Zyklen durchlaufen.

Für die Amplifizierung von AGR2 Spleißvarianten wurde eine Touchdown PCR verwendet: Denaturierung für 20 sec bei 94°C, Annealing bei 65°C für 1,5 min, Elongation für 6 min bei 72°C (fünf Zyklen); 20 sec 94°C, 1 min 60°C, 6 min 72°C (10 Zyklen), 20 sec 94°C, 30 sec 55°C, 72°C 5 min (30 Zyklen).

Für die Generierung der AGR2 PDI mut und AGR2 KTEL trunc Konstrukte wurde pcDNA3.1 AGR2 mit entsprechenden, die Mutation tragenden Primern in einer Quickchange PCR amplifiziert (18 Zyklen; 30 sec 95°C, 1 min 55°C, 6 min 68°C (1min je kb Konstrukt)).

4.1.5 Generierung von cDNA

Für die Generierung von cDNA aus RNA wurde 1 µg RNA mit 1 µl Random Primer (200 ng/µl) versetzt und für 5 min bei 70°C erhitzt. Anschließend wurden 2 µl dNTP (10mM), 1 U MLRVT Reverse Transkriptase (RT) und die entsprechende Menge 5x Puffer zugegeben (+RT-Proben). Im Thermocycler wurde die DNA unter folgenden Bedingungen generiert: 10 min 25°C, 1 h 50°C und 15 min 70°C. Gleichzeitig wurde ein Kontrollansatz ohne MLRVT inkubiert (-RT-Proben). Nach Ablauf der cDNA-Synthese wurden die Proben mit nukleasefreiem Wasser auf 250 µl je Probe aufgefüllt.

Zur Kontrolle auf Kontamination mit genomischer DNA wurde β-Aktin in den +RT und RT- Proben in einer Kontroll-PCR amplifiziert. Dazu wurden 4 µl der cDNA mit je 1 µl der β- Aktin Forward und Reverse Primer, 0,5 µl 10mM dNTP, 4 µl 5x Puffer und 0,25 µl Taq Polymerase versetzt. Im Thermocycler wurden die Proben für 2 min auf 95°C erhitzt. In den folgenden 30 Zyklen erfolgte die Denaturierung der DNA für 30 sec bei

95°C, die Anlagerung der Primer für 40 sec bei 55°C und die Elongation für 45 sec bei 72°C. Nach Ablauf aller Zyklen wurden die Proben für 10 min bei 72°C erhitzt. Anschließend wurden sie in einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Bei kontaminierten –RT-Proben wurden die zugehörigen cDNA-Proben neu synthetisiert und kontrolliert.

4.1.6 Realtime PCR

Für die Kontrolle der Genexpression auf mRNA-Ebene wurden 4 µl der aus RNA generierten cDNA mit je 1 µl der Forward und Reverse Primer (10 pmol/µl) des zu untersuchenden Gens sowie 10 µl SYBR-Green Mix auf 96-well-Platten in Duplikaten pipettiert. Das Gesamtvolumen wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Zur Kontrolle auf Kontamination wurde für jedes untersuchte Gen eine Negativkontrolle mit Wasser geladen. Die Realtime PCR wurde in der StepOne Plus (Applied Biosystems, Darmstadt) nach dem Herstellerprotokoll für den SYBR-Green Mix durchgeführt.

4.1.7 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Gelelektrophorese von DNA erfolgte in Gelen aus 2% Agarose in 1x TAE. Die eingewogene Agarose wurde im entsprechenden Puffervolumen durch Erhitzen gelöst und mit 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) je 100 ml Gelvolumen versetzt. Das Gel wurde in eine Kammer gegossen und ein Kamm mit benötigtem Taschenvolumen eingesetzt. Nach vollständigem Abkühlen und Aushärten des Gels wurde es mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm gezogen. Die mit einem Ladepuffer gemischten Proben wurden in die Taschen geladen und bei 100 V aufgetrennt. Zur Größenkontrolle wurde ein 1 kb-Marker (peqlab, Erlangen) auf das Gel geladen. Die DNA Banden wurden durch UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das Extraktionskit der Firma peqlab (Erlangen) verwendet. Zunächst wurde die entsprechende DNA-Bande am UV-Tisch ausgeschnitten und in 250 µl Bindepuffer bei 65°C gelöst. Die Lösung wurde auf eine DNA-bindende Säule gegeben und die Flüssigkeit bei 10000 rpm für eine Minute abzentrifugiert. Die Säule wurde mit 100 µl Waschpuffer gewaschen, erneut wie oben

zentrifugiert und nach Verwerfen des Durchflusses trocken zentrifugiert. Durch Zugabe von 30 μl Elutionspuffer auf die Säule und Zentrifugation bei 10000 rpm für 1 min wurde die DNA von der Säule eluiert. 2 μl des Eluats wurden mit 5 μl Ladepuffer und 3 μl Wasser versetzt und zur Kontrolle auf ein 2%-iges Agarosegel geladen. Anschließend wurde das isolierte DNA-Fragment für die Ligation in einen Vektor verwendet.

4.2 Klonierungstechniken

4.2.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen und Ligation von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte mit den jeweils für das DNA-Fragment geeigneten Enzymen. Dazu wurde die DNA mit 1-2 U des Enzyms und 1/10 Volumen des zugehörigen Puffers versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend aus diesem isoliert. Für eine Ligation von DNA Fragmenten wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente mit 1 μl T4-DNA-Ligase und 5 μl 2x Ligationspuffer versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Insert wurde dabei im Überschuss zum Vektor verwendet. Das Ligationsprodukt wurde anschließend in Bakterien transformiert.

4.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

50 μl kompetenter Bakterien wurden mit 5 μl des Ligationsansatzes oder 1 μg Plasmid-DNA versetzt und für 20 Minuten auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock für 5 min bei 37°C wurden 450 μl 1x LB-Medium zugegeben und die Kultur für 1h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100 und 200 μl der Kultur auf Ampizillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die entstandenen Kolonien wurden am nächsten Tag mit einer Pipettenspitze gepickt und in 3 ml 1xLB 1:1000 Ampizillin über Nacht bei 37°C und 220 rpm hochgeschüttelt. Aus den Kulturen wurde anschließend mit einer Miniprep die Plasmid-DNA isoliert.

4.2.3 Klonierung von AGR2 Spleißvarianten

Die Klonierung von AGR2 Spleißvarianten erfolgte mit dem TA Cloning Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Für die Amplifizierung der Spleißvarianten aus cDNA in einer Touchdown PCR, wurden Vorwärtsprimer in den AGR2 Exons 1 und 2 und ein Rückwärtsprimer in Exon 8 verwendet. Die Amplifikate wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, aus diesem isoliert und anschließend in einer weiteren PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über Nacht bei 4°C in einen pCR2.1 Vektor über T/A-Überhänge ligiert. Anschließend wurden die Vektoren in Bakterien transformiert, die DNA in einer Miniprep isoliert und sequenziert. Zur Bestätigung der Spleißvarianten wurde die Klonierung mit jeweils spezifischen Primern wiederholt.

4.3 Zellkulturmethoden

4.3.1 Kulturbedingungen

Alle genannten Zelllinien wurden in Zellkulturschalen der Firma Greiner (Nürtingen) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 6% CO₂, 95% Luftfeuchte und 37°C. Alle Arbeiten mit den Zellen erfolgten an einer Sterilbank und mit zuvor sterilisierten Materialien. Die Medien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

4.3.2 Passagieren von Zellen

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit einer 0,25%igen Trypsin-Lösung gespült. Die Lösung wurde abgenommen und erneut eine geringe Menge Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen einige Minuten im Brutschrank inkubiert, bis sie sich von der Kulturschale lösten. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung auf neue Zellkulturschalen verteilt.

4.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer *advanced* Zählkammer. Dazu wurden 10 µl einer Zellsuspension 1:10 mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt und 10 µl dieser Verdünnung auf die Zählkammer gegeben. Alle vier Großquadrate der Zählkammer wurden ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl pro Milliliter errechnet sich aus dem Mittelwert der Zellzahl der vier Großquadrate multipliziert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 10. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Zellzahl pro Milliliter mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension multipliziert.

4.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zellen wurden diese von einer großen Kulturplatte mit einer 0,25 prozentigen Trypsin-Lösung abgelöst und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert und in 2 ml Einfriermedium, bestehend aus 70% Komplett-Medium (RPMI 1640 oder DMEM plus 10% FCS), 20% FCS und 10% DMSO resuspendiert. In Kryoröhrchen wurden die Zellen in einer Einfrierbox langsam über Nacht auf -80 °C herunter gekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten und die Zellen anschließend auf eine vorbereitete Kulturplatte pipettiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt um tote Zelle zu entfernen.

4.3.5 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion von DNA in Zellen mit FuGene wurden die Zellen auf dem benötigten Format (6-Well oder 10 cm Kulturschale) so ausgesät, dass sie 24 h später etwa 50% konfluent waren. Die entsprechende Menge der zu transfizierenden DNA (2-10 µg) wurden anschließend mit Fugene im Verhältnis 1:1,5 und serumfreiem Medium in einem Gesamtvolumen von 100 µl versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde danach auf die Zellen getropft.

4.3.6 Generierung einer Zelllinie mit stabiler AGR2 Überexpression

Für die Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie wurden 22Rv.1 Zellen auf 10 cm-Platten mit 10 µg DNA (pcDNA3.1-AGR2 bzw. der pcDNA3.1 Leervektor als Kontrolle) durch Fugene transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 und 1:10 auf 15 cm Kulturschalen gesplittet und dort in Selektionsmedium (RPMI 1640, 10% FCS, 800 µg/ml G418) weitergezogen. Sobald gut sichtbare Kolonien auf den Kulturschalen zu finden waren, wurden diese mit Hilfe einer Pipettenspitze unter dem Mikroskop auf 96-Well-Platte übertragen. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen auf 12-Well-Platten übertragen und dort weitergezogen. Durch Western Blot wurde die Expression von AGR2 in den Klonen kontrolliert. Die weitere Kultivierung der stabilen Klone erfolgte in Selektionsmedium. Für die Durchführung von Experimenten wurde Medium ohne Antibiotika verwendet.

4.3.7 Generierung einer Zelllinie mit stabilem AGR2 Knock Down

Für einen AGR2 Knock Down wurden VCaP Zellen in einer Dichte von 3000 Zellen je well auf eine 96 well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden 2, 5, 10 und 15 µl der Lentiviruspartikel (Sigma, Steinheim) auf die Zellen gegeben und für 18 Stunden im Inkubator inkubiert. Das Medium wurde am folgenden Tag abgenommen, durch 120 µl frisches Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde Selektionsmedium (RPMI 10% FCS, 0,5 µg/ml Puromycin) zu den Zellen gegeben und auf transduzierte Zellen selektiert. Die Effizienz des Knock Downs wurde mittels Western Blot nachgewiesen.

4.3.8 Koloniebildungsassay

PC3-, Du145- oder 22Rv.1-Zellen wurden auf 10cm Zellkulturplatten ausgesät und mit einem pcDNA3.1-AGR2 Konstrukt bzw. dem pcDNA3.1 Leervektor als Kontrolle mit Fugene transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen gezählt und je 50.000 Zellen bei PC3-Zellen, 250.000 Zellen bei Du145-Zellen, bzw. 25.000 Zellen bei

22Rv.1-Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Das Aussäen erfolgte je in Triplikaten. Die stabil transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von 600 µg/ml (PC3, Du145) oder 800 µg/ml (22Rv.1) G418 zum Medium selektiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Sobald die wachsenden Kolonien mit bloßem Auge sichtbar waren (etwa zwei bis drei Wochen nach Beginn der Selektion), wurden das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe von -20°C kaltem MeOH wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Kolonien wurden für 30 Minuten mit einer 0,5%igen Kristall-Violett-Lösung gefärbt und nach zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser ausgezählt.

4.3.9 Bestimmung der Zellproliferation

Das Zellwachstum wurde mit dem CellTiter Blue Assay (Promega) oder durch ³H Thymidin Inkorporation bestimmt. Dazu wurden je 3000 Zellen der zu untersuchenden Zelllinie in Triplikaten auf 96-well-Platten in 100 µl Medium ausplattiert. Für die Bestimmung der Proliferation mittels CellTiter Blue wurde über 5 Tage hinweg jeweils am Tag der Messung 20 µl einer CellTiter Blue-Lösung zu den Zellen gegeben und diese für weitere 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde im Fluoreszenzreader bei 540 nm die Extinktion und bei 590 nm die Emission der Proben bestimmt und daraus im Vergleich zu Tag 0 das Zellwachstum berechnet.

Für die Bestimmung der Proliferation über ³H Thymidin Inkorporation wurde eine 96-well-Platte mit 20 µl CellTiter Blue-Lösung versetzt und nach einer Stunde wie beschrieben ausgemessen um einen indirekten Nachweis der ausgesäten Zellzahl zu erhalten. Die Werte wurden zur Normalisierung der durch ³H Thymidin Inkorporation gewonnenen Proliferation genutzt. Eine zweite Platte wurde je Well mit 7,2 ng 5' ³H Thymidin versetzt. Nach acht Stunden im Inkubator unter normalen Kulturbedingungen wurde das Medium von den Zellen abgenommen und 40 µl Trypsin je Well zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten im Inkubator wurden die Zellen mit einem Tomtec Cell Harvester (Wallac-ADL) auf eine Filtermatte (Perkin Elmer) geerntet, welche anschließend mit Insta-Gel Plus Liquid Scintillation Counting Cocktail (Perkin Elmer) befeuchtet wurde. Die Detektierung erfolgte mit einem Liquid Scintillation Counter (1450 Microbeta, Wallac Jet).

4.3.10 Analyse des Zellzyklusprofils mit FACS

Für die Analyse des Zellzyklusprofils wurden Zellen bei maximal 80% Konfluenz durch eine etwa 15 minütige Behandlung mit 5 mM EDTA in PBS geerntet. Anschließend wurden die Zellen in PBS mit Kalzium und Magnesium gewaschen und über Nacht oder für mindestens zwei Stunden bei 4°C in kaltem 70% Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit PBS rehydriert und mit 5 µM Draq5™ (Biostatus Limited, Shepshed, UK) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur gefärbt. Das Zellzyklusprofil wurde durch *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) über die Bestimmung des DNA-Gehalts analysiert.

4.3.11 Induktion von ER Stress

Für die Induktion von ER Stress wurden $0,25 \times 10^6$ Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät. Am Tag nach der Aussaat wurden die Zellen mit 10 µg/ml Tunicamycin (Sigma Aldrich), 300 nM Thapsigargin (Life Technologies) oder den entsprechenden Lösemittelkontrollen DMSO oder EtOH behandelt. Nach 16 Stunden wurden die Zellen entweder lysiert oder die RNA isoliert.

4.3.12 Immunfluoreszenzfärbungen

Für den Nachweis der intrazellulären Lokalisation von AGR2 wurden 22Rv.1 Zellen am Tag vor dem Experiment mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Am nächsten Tag wurden $0,025 \times 10^6$ Zellen pro cm² auf Chamberslides ausgesät, welche zuvor mit 100 µg/ml Fibronectin beschichtet (1h 37°C oder 4°C über Nacht) wurden. Einen Tag nach der Aussaat wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch 0,2%ige Triton-X-100-Lösung in D-PBS für 5 Minuten permeabilisiert, erneut gewaschen und danach für 5 min in Blocklösung (4% Ziegen Serum in D-PBS) überführt. Die Primärantikörper (anti-AGR2, anti-PDI je 1:1000) wurden für 20 Minuten in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen und der Zweitantikörper für 20 min bei RT im

Dunkeln inkubiert (Alexa 546 anti Maus, 1:1000 in Blocklösung). Nach drei weiteren Waschschrritten in PBS wurde der Chambersliderand abgetrennt, der Objektträger in Wasser getaucht und vorsichtig am Rand trockengetupft. Anschließend wurde der Objektträger in PVA eingedeckt und über Nacht im Dunkeln getrocknet.

4.3.13 Wundheilungsassays

Für die Bestimmung der Migration wurden Zellen auf 12-Well Platten bis zu 100% Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde dem Zellrasen mit einer Pipettenspitze eine Wunde zugefügt. Abgelöste Zellen wurden durch dreimaliges Waschen der Wells mit 1x PBS entfernt und die verbliebenen Zellen weiter kultiviert. Die Zellen wurden 6, 12 und 18 Stunden nach Zufügen der Wunde an der jeweils gleichen Stelle im Well bzw. an der Wunde mikroskopisch dokumentiert und die von Zellen nicht besiedelte Fläche ausgemessen. Die Schließung der Wunde wurde relativ zur Fläche der Wunde am Zeitpunkt null berechnet.

4.3.14 Boyden-Kammer Assay

Für die Bestimmung der Invasivität von Zellen wurde das Boyden-Kammer Assay verwendet. Dazu wurde vor Versuchsbeginn Matrigel mit RPMI Medium auf eine Endkonzentration von 2mg/ml verdünnt und 100 µl in das obere Kompartment eines 24-Transwell-Systems (Boyden-Kammer; BD Bioscience, Heidelberg) mit 8 µm Poren pipettiert. Die Polymerisation des Matrigel-Medium-Mixes erfolgte für 60 min bei 37°C. Die zu untersuchenden Zellen wurden in 1x PBD geerntet und dreimal mit phenolrotfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit DiI (15 µl/ml in phenolrotfreiem Medium) für 15 Minuten bei 37°C fluoreszent markiert. Pro Well wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 200 µl serumfreien Medium in das obere Kompartment pipettiert. Das untere Kompartment wurde mit RPMI 10% FCS gefüllt, was als Lockstoff für die Zellen diente. 24 Stunden nach Aussäen der Zellen wurden die Zahl der durch invasive Migration in das untere Kompartment gelangten Zellen über die Messung der Flureszenz (520/580) bestimmt. Als 100% Referenz dienten dabei $0,5 \times 10^6$ auf normale

24-Well-Platten ausgesäte, DiI-gefärbte Zellen. Wells mit Matrigel, serumfreiem Medium im oberen und Medium mit Serum im unteren Kompartiment dienten als Negativkontrolle. Das Experiment wurden in Triplikaten durchgeführt.

4.4. Proteinmethoden

4.4.1 Präparation von Proteinen aus Zellen und Bestimmung der Konzentration nach Bradford

Die Zellen, aus denen Proteine isoliert werden sollten, wurden in 1 ml 1x PBS mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und in ein Eppendorfgesäß überführt. Anschließend wurden sie für 5 min bei 3000 rpm pelletiert und in 50 bis 80 µl Lysispuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 5 min auf Eis. Das Lysat wurde für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, der die Proteine enthaltende Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt und bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde das BioRad Protein Assay genutzt. Zu 100 µl der 1:5 verdünnten Assaylösung wurden 2 µl der zu messenden Proteinlösung gegeben. Zur Quantifizierung wurden zusätzlich Proben mit bekannten Proteinkonzentrationen pipettiert. Die Extinktion aller Proben wurde bei 595 nm im ELISA-Reader ausgemessen und die Proteinkonzentration daraus anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve errechnet.

4.4.2 Präzipitation von Proteinen aus Zellkulturüberstand

Die Präzipitation von Proteinen aus Zellkulturüberstand erfolgte mit der StrataClean Resin (Stratagene, Amsterdam). Vor der Fällung wurden die Kulturüberstände für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert um tote Zellen zu entfernen. Abschließend wurden 20 µl Resin mit 1 ml Zellkulturüberstand für 20 min bei Raumtemperatur gemischt. Die an die Resin gebundenen Proteine wurden für eine Minute bei 2000 rpm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und die

Proteine durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C von den Resinbeads eluiert. Die Probe wurde anschließend auf ein 15%iges SDS-Gel geladen. Die Auftrennung der Proben im Gel erfolgte bei konstanten 90 V, die anschließende Analyse durch Western-Blot.

4.4.3 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese. Die Proteine wurden dabei zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden dazu zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch etwa 1 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennt waren. Nach Polymerisation des zuerst gegossenen Trenngels wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm mit entsprechender Taschenzahl eingesetzt. Sobald das Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurde das Gel in einen vertikalen Laufstand eingespannt und die Kammer mit 1x Laemmli- Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 2x SDS- Probenpuffer versetzt und zum Denaturieren der Proteine für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach Entfernen des Kammes wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert und bis zum Erreichen der Grenze zum Trenngel bei 90 V aufgetrennt. Anschließend wurde die Stromspannung auf bis zu 150 V erhöht. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker mit den Proben im Gel aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel entweder mit Simply Blue gefärbt oder die Proteine durch Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen.

4.4.4 Immunoblot-Analyse von Proteinen (Western Blot)

Zur Übertragung der in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde das Wetblot-Verfahren verwendet. Dazu wurde eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier gelegt. Das Gel wurde ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt und mit drei weiteren Lagen Papier bedeckt. Zwischen zwei Kunststoffschwämmen wurden das Gel

und die Membran mit dem Whatmanpapier in eine Transferzelle und in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer gespannt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C, 30 V und 300 mA. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in Blockierlösung (1% fettfreie Milch, 5% FCS in 1x TBS, 0,02% Tween 20) blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Je nach Antikörper wurde eine entsprechende Verdünnung in Blockierlösung verwendet. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 min in PBS 0,02% Tween 20 gewaschen und der entsprechende sekundäre Antikörper in Blockierlösung für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal 10 min in PBS 0,02% Tween 20 gewaschen und die Proteine danach über die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran mit einer 1:1 Mischung zweier ECL-Lösungen (Amersham Pharmacia, Freiburg) benetzt. Nach 2 min Inkubation und Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit wurde auf der Membran unter Rotlicht ein Röntgenfilm exponiert

4.4.5 Strippen von Western Blot-Membranen

Um Antikörper von einer Western Blot-Membran zu entfernen („stripfen“), wurde diese in einer Schale mit Stripping-Lösung in einem Wasserbad bei 60°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5x 10 min in PBS 0,02% Tween 20 gewaschen. Nach erneutem Blockieren (Blockierlösung) wurde ein neuer primärer Antikörper inkubiert.

4.5 Xenograft Tumor-Modelle in athymischen Nacktmäusen

Alle Tierexperimente wurden unter der Einhaltung der gesetzlichen Vorschriften durchgeführt. Für Tumor-Modelle in athymischen Nacktmäusen wurden 2×10^6 Zellen (22Rv.1 pCDNA3.1 oder pcDNA3.1 AGR2) in 100 μ l PBS subkutan in beide Flanke von 6 Wochen alten Tieren injiziert. Die Tiere wurden unter sterilen Bedingungen in Isolatoren gehalten. Wöchentlich wurden Länge, Tiefe und Breite der Tumore mit einem

Messschieber bestimmt und das Volumen mit der Ellipsoid-Formel errechnet:

$$\text{Volumen} = [\text{ml}] = \text{Länge} [\text{cm}] \times \text{Tiefe} [\text{cm}] \times \text{Breite} [\text{cm}] \times 0,523$$

Sieben Wochen nach Injektion wurden die Tiere euthanasiert und die Tumore sowie die drainierenden Lymphknoten entnommen und das jeweilige Gewicht bestimmt.

4.6 Statistikk

Für Abbildungen und statistische Berechnungen wurden Microsoft Excel (Microsoft Cooperation) und Prism 5 (GraphPad Software Inc.) verwendet. Für die Berechnung von statistischen Signifikanzen wurde der Student's t-Test verwendet, P-Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft. In den Graphen ist dies dargestellt mit * $p=0,05$; ** $p<0,05$ und *** $p<0,01$.

5. Ergebnisse

5.1 AGR2 wird von verschiedenen benignen und malignen Prostatazelllinien exprimiert und sekretiert

Das humane Anterior Gradient 2 wurde als ein in malignen Veränderrungen der Prostata überexprimiertes Protein identifiziert (Valladares-Ayerbes et al. 2008, Zhang et al. 2005, Zhang et al. 2007). Erste Hinweise auf die Rolle von AGR2 während der Progression von Prostatakrebs können durch die Untersuchung der Expression des Proteins in verschiedenen Prostatakrebszelllinien gewonnen werden. Da es sich bei AGR2 um ein sekretiertes Protein handelt (Zhang et al. 2005) können durch den Nachweis von AGR2 in Zellkulturüberstand auch Hinweise darauf gewonnen werden, ob es möglich ist, AGR2 als Marker für das Prostatakarzinom zu verwenden.

Aus diesem Grund wurden die Prostatakrebszelllinien Du145, 22Rv.1, PC3, DuCaP, zwei verschiedene LNCaP Linien, LNCaP ablated sowie VCaP bezüglich ihrer AGR2 Expression und Sekretion untersucht. Zusätzlich wurden die benignen Linien PNT2 und BPH-1 untersucht. Dazu wurden die Zellen für 72 Stunden in Medium mit 3% FCS (Fetal Calf Serum) kultiviert und anschließend die von den Zellen sekretierten Proteine aus dem Zellkulturmedium gefällt. Die Zellen wurden lysiert und das Lysat zusammen mit den aus dem Medium gefällten Proteinen mittels Western Blot analysiert.

AGR2 konnte in dem Lysat der benignen Zelllinie PNT2 (Abb. 3, Spur 1), sowie in den Prostatakarzinomzelllinien PC3 und VCaP (Abb. 3, Spuren 5 und 10) und schwach in DuCaP Zellen (Abb. 3, Spur 6) nachgewiesen werden. PC3, DuCaP und VCaP Zellen sekretieren außerdem detektierbare Mengen des AGR2 Proteins in den Zellkulturüberstand (Abb. 3, Spuren 5, 6, 10). PNT2-Zellen sekretieren nur schwach detektierbare Mengen des Proteins (Abb. 3, Spur 1). Obwohl für BPH-1 kein AGR2 Protein im Lysat der Zellen nachgewiesen werden konnte wurde AGR2 im Medium der Zellen detektiert (Abb. 3, Spur 2). Eine mögliche Erklärung dafür kann sein, dass, AGR2 zwar von den Zellen exprimiert, allerdings sofort sezerniert wird.

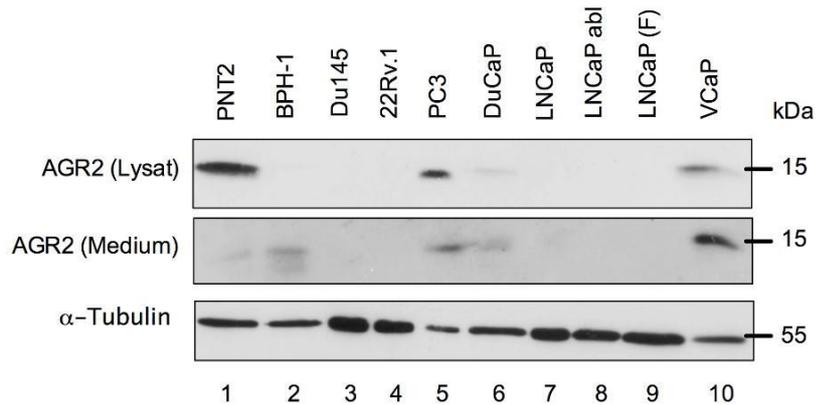


Abb. 3: Western Blot Analyse der Expressions- und Sekretionslevel von AGR2 in verschiedenen Prostatakrebszelllinien (Spuren 3 bis 10) und zwei benignen Prostataepithellinien (Spuren 1 und 2). Zum Nachweis von AGR2 im Zelllysat und im Kulturmedium wurden $0,25 \times 10^6$ Zellen ausgesät und für 72h in Medium mit 3% FCS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und $10 \mu\text{g}$ Protein in einer SDS PAGE aufgetrennt. Für den AGR2 Nachweis im Zellkulturmedium wurden die Proteine aus 1ml Medium mit StrataClean Resin (Stratagene, Amsterdam) gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und in einer SDS PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von AGR2 und α -Tubulin als Ladekontrolle erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

Auf Basis der verschiedenen Zelllinien lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Stadium des Karzinoms bzw. der benignen Veränderung der Prostata und dem Expressionslevel von AGR2 erkennen. Die Sekretion von AGR2 scheint allerdings in Karzinomzellen verstärkt zu sein.

5.2 Charakterisierung von AGR2 als potentieller Marker für das Prostatakarzinom

5.2.1 Identifikation von AGR2 Spleißvarianten

Die Untersuchung der Sekretion von AGR2 in verschiedenen Prostatakrebszelllinien und zwei benignen Zelllinien hat gezeigt, dass Karzinomzelllinien AGR2 verstärkt exprimieren, während z.B. in der benignen Zelllinie PNT2 eine starke AGR2 Expression aber keine Sekretion nachgewiesen werden konnte (Abb.3). Die Nutzung dieser vermehrten Expression als Prostatakrebsmarker wäre allerdings nur bedingt möglich, da eine Überexpression und Sekretion von AGR2 auch für andere Karzinome beschrieben wurde (Edgell et al. 2010, Lee et al. 2006, Ramachandran et al. 2008, Thompson und Weigel 1998, Wang et al. 2008). Als Alternative für die Nutzung des AGR2 Proteins konnte bereits die Nutzung von AGR2 mRNA für die Nachweis von Prostatakrebs im Urinproben beschrieben werden (Bu et al. 2011). Da für das AGR2 Gen bzw. dessen mRNA bereits verschiedene Spleißvarianten identifiziert werden konnten, bietet die Nutzung von mRNA eine Alternative zur Nutzung des AGR2 Proteins als Marker. Im fibrolamellären Karzinom der Leber konnten zwei AGR2 mRNA Transkripte nachgewiesen werden, von denen eines in der Mehrzahl von Tumoren und Metastasen exprimiert wurde (Vivekanandan et al. 2009). Auch in Prostatagewebe konnten zwei Transkripte identifiziert werden, von denen eines als prostataspezifisch beschrieben wurde. Es besteht daher die Möglichkeit, dass es weitere, noch nicht identifizierte Spleißvarianten für AGR2 gibt.

Um mögliche prostata- und prostatkrebsspezifische AGR2 Spleißvarianten zu identifizieren, wurde die gesamt-RNA aus verschiedenen Prostatakrebszelllinien sowie aus Zellen anderer Gewebe und Karzinome isoliert und daraus cDNA generiert. Es wurden die Prostatakrebszelllinien VCaP, LNCaP und 22Rv.1 sowie die benigne Prostatalinie PNT2 und zudem die beiden Brustkrebszelllinien T47D und MCF7, HeLa Zervixkarzinomzellen, die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa, JEG-3 Zellen aus dem Chorionkarzinom, HepG2 Leberkarzinomzellen und Hek293 Nierenepithelzellen verwendet. In allen Zelllinien wurde zunächst die Expression der bereits in Prostatagewebe beschriebenen AGR2 Transkripte untersucht, dem sogenannten kurzen

(Short Transcript ST) von etwa 0,9 Kilobasenpaaren Länge und dem als prostataspezifisch beschriebenen langen Transkript (long Transcript LT) mit etwa 1,6 kb (Abb. 4A) (Liu et al. 2005, Zhang et al. 2005, Zheng et al. 2006).

Die untersuchten Prostatakrebszelllinien, die benigne Prostatazelllinie PNT2 sowie alle Zelllinien aus anderen Geweben exprimieren das kurze AGR2 Transkript (AGR2 ST) jeweils in unterschiedlichen Mengen (Abb 4B). Die stärkste Expression zeigen T47D Zellen, gefolgt von Ishikawa-, HepG2- und MCF-7 Zellen sowie den Prostatalinien LNCaP, PNT2 und 22Rv.1. VCaP-Zellen exprimieren relativ geringe Mengen des kurzen Transkripts. Die große AGR2 ST mRNA Menge in LNCaP und 22Rv.1 steht in Kontrast zu den mit Western Blot gewonnenen Expressionsdaten, in welchen AGR2 Protein nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 3). Dies deutet auf eine zelltypspezifische Regulation der AGR2 mRNA Translation hin. Hek293, HeLa und JEG-3 Zellen exprimieren nur sehr geringe Mengen des kurzen AGR2 Transkripts (Abb. 4B). Die gewonnenen Daten zeigen keine verstärkte Expression in Prostata(krebs)zellen im Vergleich zu den Zellen aus anderen Geweben, allerdings scheint es gewebespezifische Unterschiede in der Expression des kurzen AGR2 Transkripts zu geben.

Die Expression des langen Transkripts (AGR2 LT) war im Durchschnitt geringer als die des kurzen Transkripts (relative mRNA Menge AGR2 ST durchschnittlich 4×10^{-3} , AGR2 LT 4×10^{-5}). Das Transkript konnte in allen Prostatakrebszelllinien nachgewiesen werden (Abb. 4C). Die stärkste Expression zeigten LNCaP Zellen. VCaP Zellen zeigten wie auch bei dem kurzen Transkript (Abb. 4B) die schwächste AGR2 LT Expression der untersuchten Prostatazelllinien. Hek293, HeLa, JEG_3 und HepG2 Zellen exprimieren das lange Transkript nicht, es konnte allerdings in den Brustkrebszellen T47D und MCF7 sowie in der Endometriumkarzinomlinie Ishikawa nachgewiesen werden (Abb. 4C). Entgegen der bisherigen Annahme ist das lange AGR Transkript somit nicht spezifisch für Prostatagewebe.

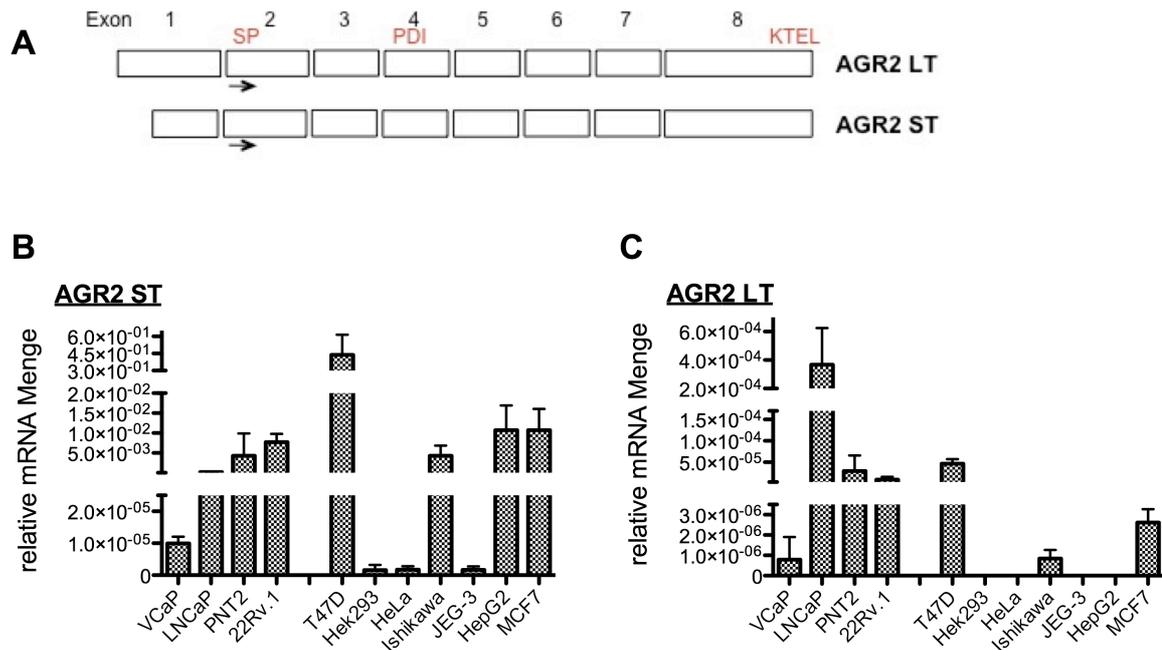


Abb. 4: Expression des kurzen und langen AGR2 Transkript in verschiedenen Zelllinien. **A** Schematische Darstellung des kurzen (AGR2 ST) und des langen (AGR2 LT) AGR2 Transkripts. Die Transkripte unterscheiden sich durch einen verlängerten nicht translatierten Bereich in Exon 1. SP Signalpeptid, PDI Protei-Disulfid-Isomerase **B, C** Relative mRNA Menge (Expression) des kurzen (B) und langen (C) AGR2 Transkripts in verschiedenen Zelllinien. Für die Generierung von cDNA aus verschiedenen Zelllinien wurde die gesamte RNA aus jeweils $0,25 \times 10^6$ Zellen isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für den Nachweis von AGR2 ST und LT in einer Realtime PCR wurden spezifische Primer verwendet. Dargestellt sind die jeweiligen relativen mRNA Mengen (Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten). Als Referenzgen wurde die humane ribosomale Untereinheit (36B4) verwendet.

Da durch dieses Ergebnis die Möglichkeit zur Nutzung des langen Transkripts als prostata-spezifischer Marker für das Karzinom unwahrscheinlich wird, wurde die cDNA verschiedener Prostatakrebszelllinien und zwei benignen Prostatalinien auf weitere AGR2 Spleißvarianten hin untersucht. Verwendet wurden die Linien VCaP, PC3, 22Rv.1, LNCaP, Du145, LNCaP ablated (abl), BPH-1 und PNT2. Für die Amplifikation möglicher AGR2 Spleißvarianten in einer PCR wurden Vorwärts-Primer in den AGR2 Exons 1 und 2 und ein Rückwärts-Primer in Exon 8 verwendet. Die so gefundenen Spleißvarianten wurden in einen Vektor kloniert und sequenziert.

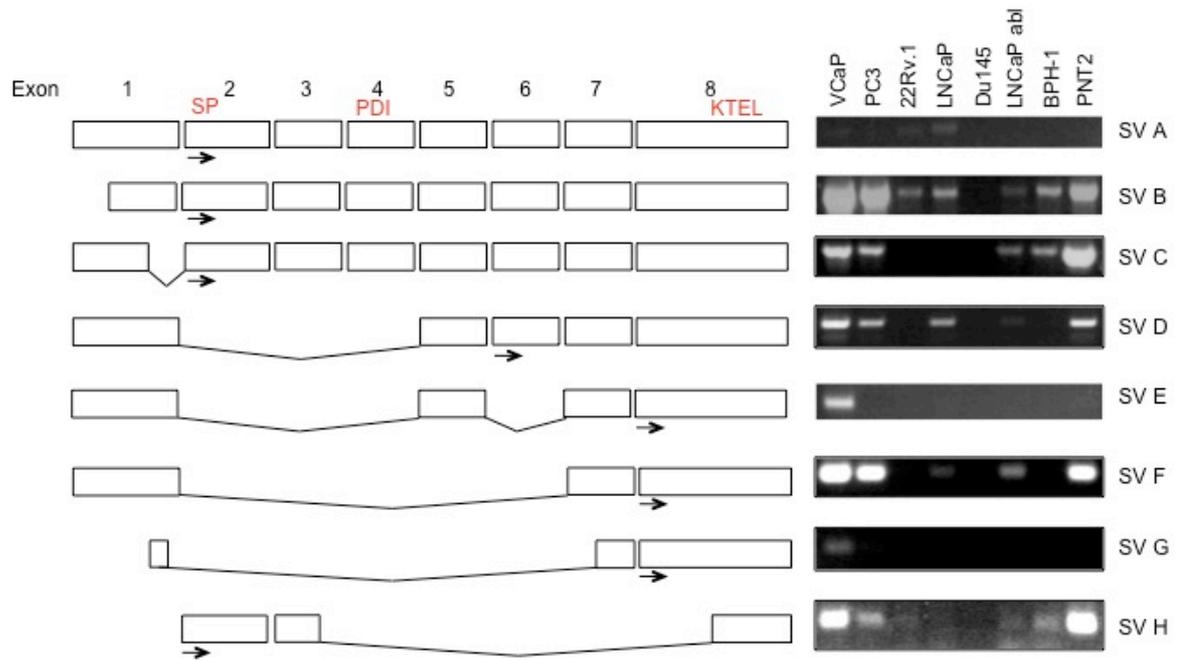


Abb. 5: Schematische Darstellung der aus cDNA verschiedener Prostata(krebs)zelllinien isolierten ARG2 Spleißvarianten (links) sowie deren Expression in verschiedenen Prostata(krebs)zelllinien (rechts; nicht quantitative PCR). Die Kästchen stellen die Exons da, als Referenz für die Länge der jeweiligen Exons dienen das lange (SV A) und kurze (SV B) AGR2 Transkript. SP Signalpeptid, PDI Protein-Dulfid-Isomerase Motiv, KTEL Motiv. Die Pfeile markieren tatsächliche (SV A und B) oder vermutliche Translationsstartpunkte.

Neben dem zuvor bereits beschriebenen kurzen (SV B) und langen Transkript (SV A) von AGR2 konnten sechs weitere Spleißvarianten von AGR2 in der cDNA verschiedener Prostatazelllinien identifiziert werden. Wie in Abbildung 5 dargestellt sind die Spleißvarianten durch das Fehlen von ganzen Exons (z.B. SV E mit den fehlenden Exons 2 bis 4 und 6) oder durch den Wegfall von Exonbereichen (z.B. SV C verkürztes Exon 1, SV G verkürztes Exon 1 und 7, SV H verkürztes Exon 3) charakterisiert. Exon 2, in welchem sich das Startkodons des Wildtypproteins befindet, fehlt in den Spleißvarianten D, E, F und G, wodurch sich der Start einer möglichen Expression jeweils verschiebt (in Abb. 5 dargestellt durch einen Pfeil). Die Spleißvarianten E, F und G codieren wahrscheinlich für die letzten 8 Aminosäuren von AGR2, Spleißvariante D vermutlich für die letzten 48 Aminosäuren des Proteins. In der Spleißvariante H kommt es durch das verkürzte Exon 3 zu einem Frameshift, so dass das KTEL Motiv nicht vorhanden wäre. Spleißvariante C kodiert höchstwahrscheinlich für das Wildtypprotein, da sich hier nur Exon 1, also der nicht translatierte Bereich von der Sequenz des langen Transkripts (SV A) unterscheidet

(Abb. 5). Ob die beschriebenen Spleißvarianten tatsächlich von den möglichen Startkodons an translatiert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

5.2.2 Quantitativer Nachweis der identifizierten AGR2 Spleißvarianten in verschiedenen Karzinomzelllinien

Spleißvarianten der AGR2 mRNA kommen als mögliche Marker für das Prostatakarzinom in Frage. Um neben dem bereits beschriebenen langen und kurzen AGR2 Transkript neue Spleißvarianten zu bestimmen, wurde die mRNA verschiedener Prostata(krebs)zelllinien auf AGR2 Spleißvarianten untersucht. Dabei konnten sechs noch nicht beschriebene AGR2 Spleißvarianten identifiziert werden (SV C bis SV H, Abb. 5). Im Folgenden wurden die Expressionslevel der identifizierten Spleißvarianten in den zuvor genannten Prostata(krebs)zelllinien und Zelllinien aus anderen Geweben mittels Realtime PCR untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass alle Spleißvarianten in unterschiedlichen Mengen in einigen der untersuchten Zelllinien exprimiert werden (Abb. 6). Die Zelllinien Hek293, HeLa und HepG2 exprimieren ähnlich wie es für das kurze und lange Transkript von AGR2 gezeigt werden konnte (Abb. 4), nur sehr geringe oder nicht detektierbare Mengen der Spleißvarianten. T47D Zellen exprimieren die höchsten relativen mRNA Mengen aller identifizierten Spleißvarianten innerhalb der untersuchten Zelllinien (Abb. 6).

Die Spleißvarianten H und G wurden am stärksten exprimiert, gefolgt von den Varianten SV E und SV F (Abb. 6, relative mRNA Mengen SV H 3×10^{-5} bis $1,3 \times 10^{-1}$; SV G 1×10^{-5} bis 3×10^{-3} ; SV E 1×10^{-6} bis 2×10^{-4} ; SV F 5×10^{-7} bis 1×10^{-4}). Die niedrigste Expressionsmenge zeigte Spleißvariante C (Abb. 6, relative mRNA Menge 1×10^{-7} bis 3×10^{-5}). Spleißvariante D konnte in einer Realtime PCR nicht amplifiziert werden. Die Spleißvarianten E, F, G und H konnten in den untersuchten Prostatazelllinien und auch in den Zelllinien aus anderen Geweben nachgewiesen werden. Spleißvariante C konnte ausschließlich in den verwendeten Prostata(krebs)zelllinien, nicht aber in den Zelllinien aus anderen Geweben amplifiziert werden, mit Ausnahm einer minimalen Detektion

in T47D Zellen (Abb. 6). Diese Spleißvariante kommt daher besonders als möglicher Prostatakrebsmarker in Frage.

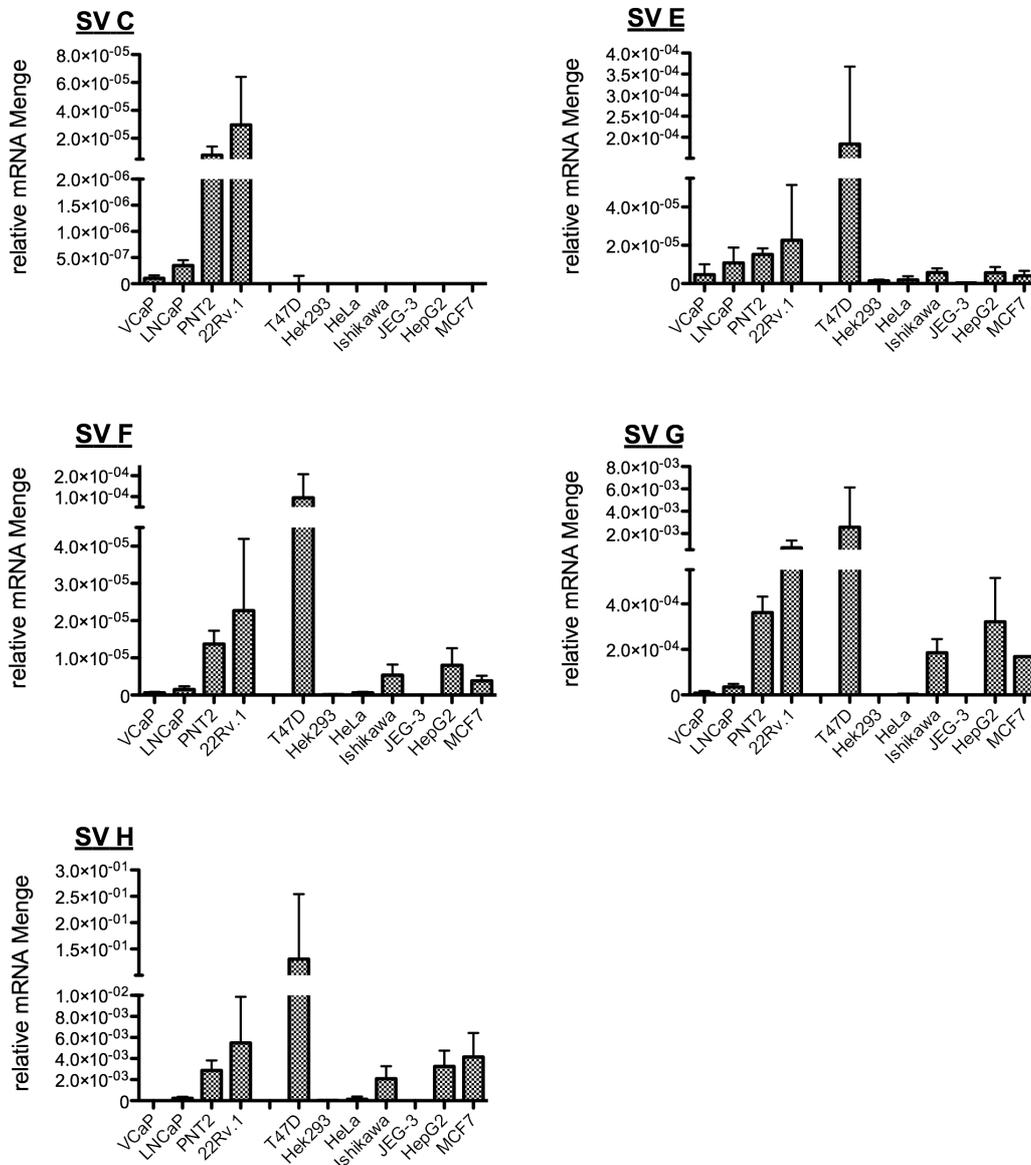


Abb. 6: Quantitative Analyse der Expression der zuvor identifizierten AGR2 Spleißvarianten C, E, F, G und H in verschiedenen Zelllinien. Dargestellt ist der Mittelwert der relativen mRNA Menge (Expression) der jeweiligen Spleißvarianten aus drei unabhängigen Experimenten bzw. mRNA Präparationen mit Standardabweichung. Spleißvariante D konnte in einer Realtime PCR nicht amplifiziert werden. Für die Generierung von cDNA aus verschiedenen Zelllinien wurde die gesamte RNA aus jeweils $0,25 \times 10^6$ Zellen isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für den Nachweis der Spleißvarianten in einer Realtime PCR wurden spezifische Primer verwendet als Referenzgen wurde die humane ribosomale Untereinheit (36B4) verwendet.

5.2.3 Quantitativer Nachweis der identifizierten AGR2 Spleißvarianten in Gewebeproben von Prostatakrebspatienten

Nach der Analyse der Expression der identifizierten Spleißvarianten in verschiedenen Zelllinien (Abb. 6) wurde die Expression und damit die Relevanz der Varianten in Gewebeproben von Prostatakrebspatienten mittels Realtime PCR untersucht. Die Expression der einzelnen Spleißvarianten wurde mit der Expression des kurzen und langen AGR2 Transkripts (AGR2 ST/ AGR2 LT) und der Expression des Homologs AGR3 verglichen. AGR2 ST wird ubiquitär exprimiert, AGR2 LT in deutlich geringeren Mengen (Abb. 4) (Cato und Nestl (online), Liu et al. 2005, Zhang et al. 2005, Zhang et al. 2007, Zheng et al. 2006). Die bisher beschriebene Prostataspezifität des langen AGR2 Transkripts konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abb. 4) (Liu et al. 2005, Zhang et al. 2005, Zheng et al. 2006). AGR3 ist ein zu AGR2 stark homologes Protein, welches ebenfalls in Prostatakrebs überexprimiert wird (Cato und Nestl (online), Zhang et al. 2007).

Für den Nachweis von AGR2 ST, AGR2 LT, AGR3 und der sechs identifizierten Spleißvarianten (Abb. 5) wurden insgesamt 64 Proben verwendet, wovon 32 aus nicht bösartig veränderten Bereichen der Prostata entnommen wurden. 16 Proben wurden aufgrund des histologischen Befunds des Patienten einem niedrigen, 16 weitere einem hohen Gleason Score (GS) zugeordnet. Die Gleason Klassifizierung basiert auf dem histologischen Muster der Anordnung von Karzinomzellen, genauer auf dem Grad der (De)Differenzierung des Drüsengewebes (Humphrey 2004).

Die Analyse der relativen mRNA Menge des kurzen AGR2 Transkripts (AGR2 ST/ SV B, Abb. 4 A) zeigt einen signifikanten Anstieg der Expression dieses Transkripts in Gewebeproben aus Prostatakrebs mit niedrigem Gleason Score (Abb. 7). Der Unterschied zwischen Proben aus unveränderte Prostatabereichen und hohen Gleason Score Proben war nicht signifikant. Das heißt das kurze AGR2 Transkript wird in frühen Krebsstadien vermehrt exprimiert, in späteren Stadien sinkt die Expression wieder. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Bu et al. (2011). AGR3 zeigt in frühen Tumorstadien keine Veränderung der Expression im Vergleich zu benignem Gewebe, in späteren Tumorstadien steigt die Expression an (Abb. 7, $p=0,066$). Die Expressionslevel

von AGR2 ST und AGR3 zeigen also einen gegenläufigen Trend im Verlauf der Tumorprogression.

Die Expression des langen AGR2 Transkripts (AGR2 LT/ SV A) verringert sich in den in niedrigen Gleason Score Gewebeproben, allerdings ist diese Veränderung nicht signifiant (Abb. 7, $p=0,097$). Im hohen Gleason Score steigt die Expression wieder leicht an.

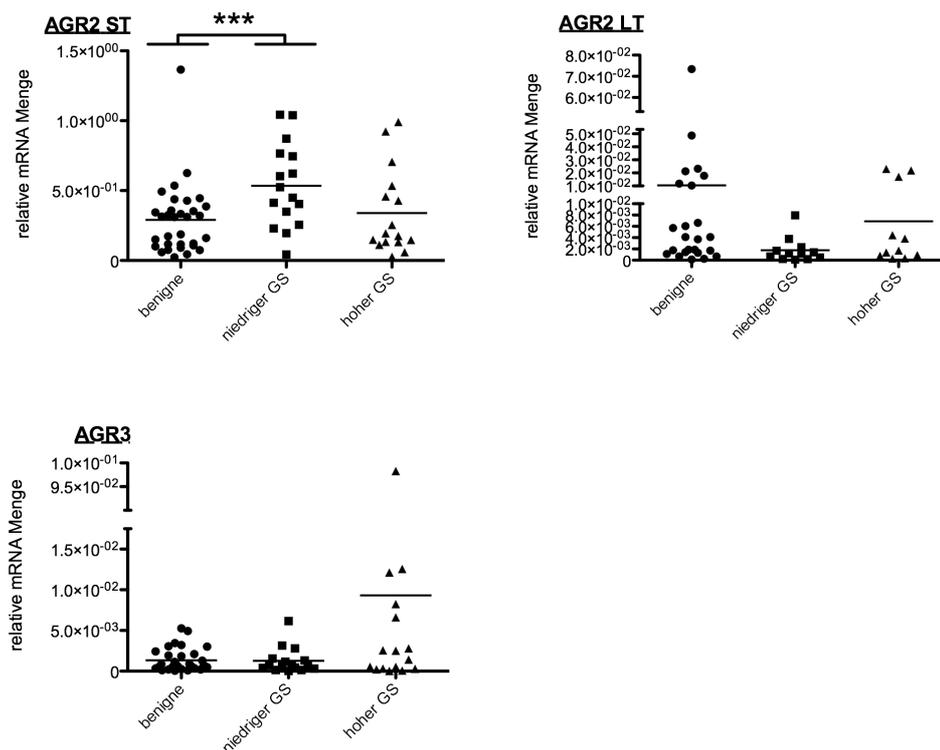


Abb. 7: Analyse der Expression (relative mRNA Menge) des kurzen und langen AGR2 Transkripts (AGR2 ST/ LT) und von AGR3 in Gewebeproben von Prostatakrebspatienten. Untersucht wurden 32 Proben aus nicht bösartig veränderten Bereichen der Prostata (benigne) und jeweils 16 Proben aus maligne veränderten Bereichen, die hohen oder niedrigen Gleason Scores (GS) zugeordnet wurden. Verwendet wurden mRNA Proben, die mittels reverser Transkriptase zu cDNA umgeschrieben wurden. Dargestellt sind die relativen mRNA Mengen. Die Striche markieren den jeweiligen Mittelwert der relativen mRNA Menge. (Student's t-Test *** $p < 0,01$) Als Referenzgen wurde die humane ribosomale Untereinheit (36B4) verwendet.

Die Expressionslevel der identifizierten Spleißvarianten (Abb. 8) zeigen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen Tumorstadien. Die Spleißvarianten H und F zeigen einen Trend hin zu steigender Expression in hohen

Gleason Score Gewebeprobe (p=0,093 jeweils für SV H und F). SV E wird, ähnlich wie das lange AGR2 Transkript, in niedrigen Gleason Score Proben geringer exprimiert als in unverändertem Gewebe, in spätern Stadien steigt die Expression wieder an. Die Expression von Spleißvariante G zeigt keine bedeutenden Veränderungen zwischen Proben aus benignen Prostatabereichen und Prostatakrebsgewebe aus frühen sowie späten Stadien (Abb. 8). Spleißvariante C, welche zuvor nur in Prostatakrebszellen, allerdings nicht in Zellen aus anderen Geweben nachgewiesen werden konnte, scheint einen leichten Trend hin zu erhöhter Expression in späten Krebsstadien zu zeigen, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant (Abb. 8).

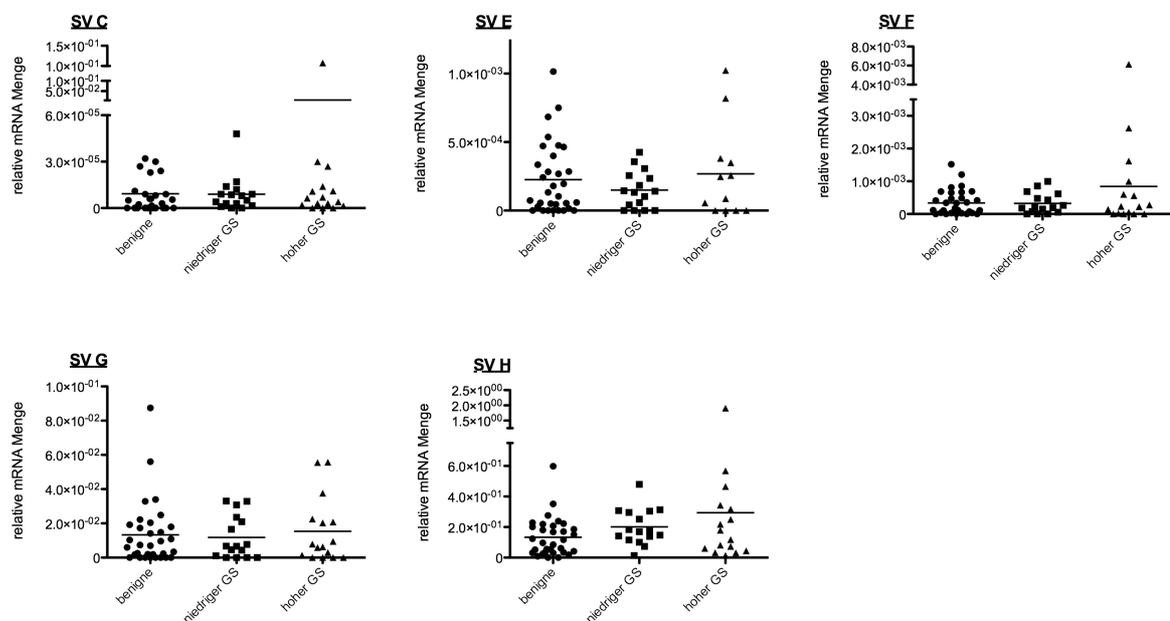


Abb. 8: Analyse der Expression (relative mRNA Menge) der AGR2 Spleißvarianten C, E, F, G und H in Gewebeprobe von Prostatakrebspatienten. Untersucht wurden 32 Proben aus nicht bösartig veränderten Bereichen der Prostata (benigne) und jeweils 16 Proben aus maligne veränderten Bereichen, die hohen oder niedrigen Gleason Scores (GS) zugeordnet wurden. Verwendet wurden mRNA Proben, die mittels reverser Transkriptase zu cDNA umgeschrieben wurden. Die Striche markieren den jeweiligen Mittelwert der dargestellten relativen mRNA Menge. Als Referenzen wurde die humane ribosomale Untereinheit (36B4) verwendet.

Um eine eindeutige Aussage über die Expression der identifizierten Spleißvarianten in verschiedenen Prostatakrebsstadien machen zu können, muss eine größere Zahl von entsprechenden Gewebeprobe untersucht werden. Auch eine Untersuchung der Spleißvarianten in Urinsediment von Prostatakrebepatienten wäre in diesem Zusammenhang sinnvoll, da die mRNA des kurzen Transkripts in solchen Proben bereits nachgewiesen werden und als Marker für das Prostatakarcinom identifiziert werden konnte (Bu et al. 2011).

5.3 Funktionelle Charakterisierung von AGR2 durch Überexpression

5.3.1 AGR2 ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert

Neben der Charakterisierung von AGR2 als Marker für das Prostatakarcinom ist auch die funktionelle Charakterisierung des Proteins in Prostatakrebs von Interesse. Die intrazelluläre Lokalisation von AGR2 kann Hinweise darauf geben welche möglichen Funktionen das Protein übernehmen kann. Aufgrund des C-terminalen KTEL Motivs in der AGR2 Aminosäuresequenz, welches von Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum (ER) erkannt wird und somit zum Zurückhalten des Proteins im ER führen kann (Lewis und Pelham 1990), ist die Wahrscheinlich groß, dass AGR2 in diesem Organell eine Funktion übernimmt.

Zur Bestimmung der Lokalisation von AGR2 in Prostatakrebszellen wurden 22Rv.1 Zellen transient mit Expressionsvektoren transfiziert, welche für Wildtyp AGR2 oder zwei AGR2 Mutanten kodieren, die jeweils eine Mutation im PDI Motiv oder im KTEL Motiv des Proteins tragen. Diese Mutationen können weitere Hinweise auf die mögliche Funktion des Wildtypproteins geben. Das PDI Motiv ordnet AGR2 der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen zu (Persson et al. 2005), für eine Mutation dieses CXXS Motivs wurde das Cystein zu Alanin mutiert (C81A, „PDI mut“). Durch das Entfernen des Cysteins kann die vermutete Funktion von AGR2 als PDI Chaperon (Higa et al. 2011) aufgehoben werden. Das KTEL Motiv wurde durch Austausch des Lysins mit einem

Stopcodon vollständig entfernt (L172Stop, „trunc KTEL“), wodurch es vermutlich zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation von AGR2 kommt.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Expression der jeweils von den Vektoren kodierten Proteine mittels spezifischen anti-AGR2 Antikörpern durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Das Endoplasmatische Retikulum wurde durch den Nachweis von Protein-Disulfid-Isomerase (Pdi), einem ER-residenten Protein, mittels spezifischer Antikörper markiert um eine mögliche Lokalisation von AGR2 in diesem Organell nachzuweisen.

Abbildung 9 zeigt, dass die drei verschiedenen AGR2 Konstrukte exprimiert und in Zellen durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden können. Das AGR2 Wildtypprotein co-lokalisiert mit dem ER-Marker Pdi (Abb. 9A), d.h. das Protein ist im ER lokalisiert. Die Mutation des zentralen PDI-Motivs des Proteins (C81A), führt zu keiner Änderung der intrazellulären Lokalisation des Proteins im Vergleich zu der des Wildtypproteins (Abb. 9 B), AGR2 co-lokalisiert weiterhin mit Pdi. Im Gegensatz dazu führte eine Mutation bzw. die Entfernung des KTEL Motivs (L172Stop) dazu, dass das AGR2 Protein nicht mehr mit dem ER Marker Pdi co-lokalisiert (Abb. 9C), also nicht mehr im ER lokalisiert ist. Da AGR2 ein N-terminales Signalpeptid besitzt, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es zu verstärkter Prozessierung und damit Lokalisierung des KTEL mutierten Proteins im Golgi Apparat kommt. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

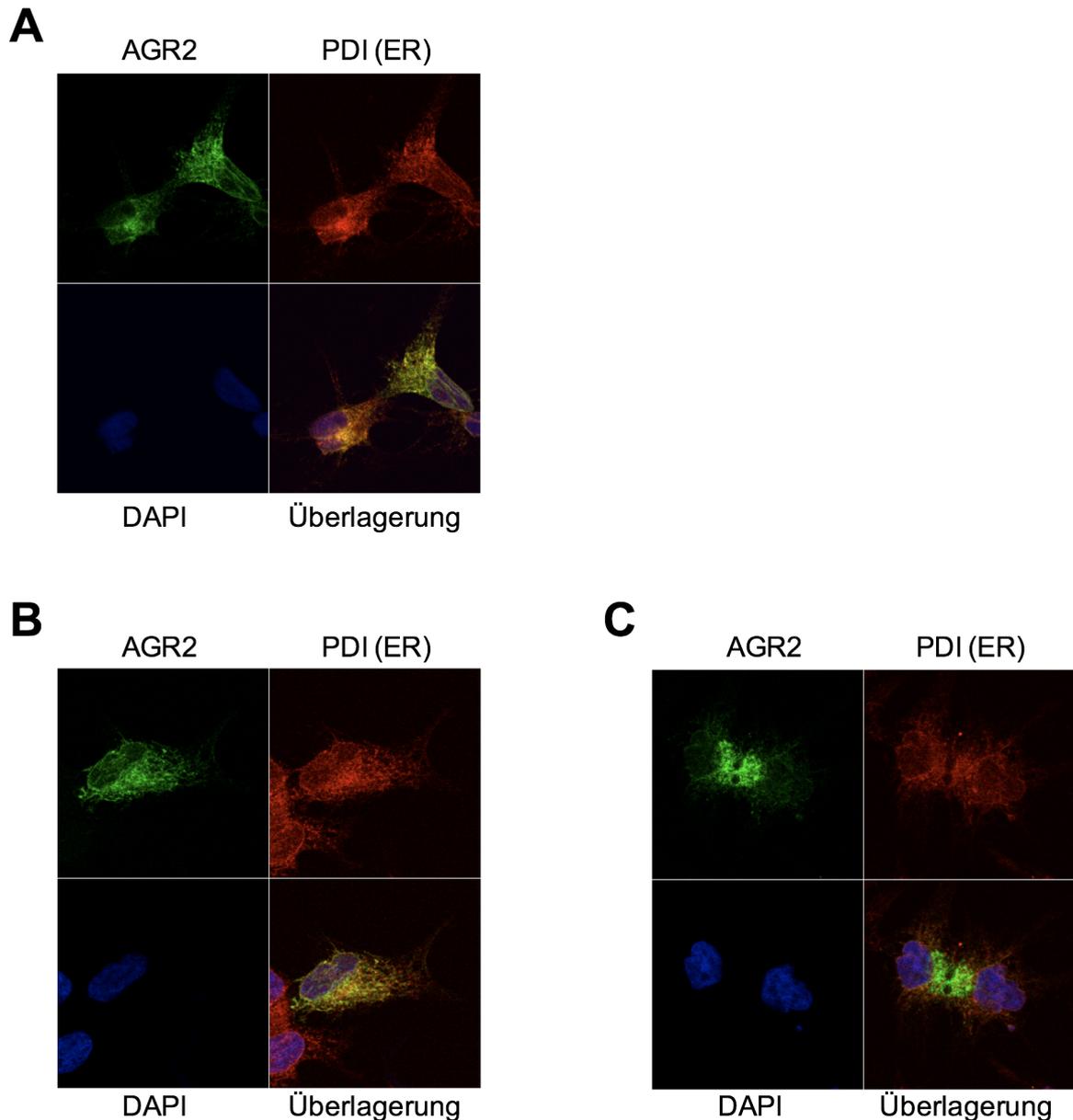


Abb. 9: Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von AGR2. Immunfluoreszenz zum Nachweis von **A** Wildtyp AGR2 und AGR2 mit Mutationen im **B** PDI Motiv oder **C** KTEL Motiv. Für den Nachweis der intrazellulären Lokalisation wurden 22Rv.1 Zellen transient mit einem Expressionsvektor für das jeweilige AGR2 Protein (Wildtyp, PDI Mutanten oder KTEL Mutante) transfiziert, nach 48h fixiert und das Protein mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Das endoplasmatische Retikulum wurde durch Nachweis des Pdi Proteins mit einem spezifischen Antikörper markiert. Die Primärantikörper wurden mit fluoreszent markierten Sekundärantikörpern nachgewiesen. DAPI diente zur Markierung der Zellkerne.

5.3.2 AGR2 vermindert das Zellwachstum in einem Koloniebildungsassay

Die Untersuchung der AGR2 Expression in verschiedenen Prostatakrebsstadien hat gezeigt, dass das Protein in frühen Stadien im Vergleich zu normalem Prostatagewebe überexprimiert wird (Abb. 7). Basierend darauf wurden Koloniebildungsassays durchgeführt (Franken et al. 2006), um Hinweise auf einen möglichen Einfluss von AGR2 auf die Wachstumsrate von Prostatakrebszellen zu erhalten. Dazu wurden die Prostatakrebszelllinien 22Rv.1, Du145 und PC3, welche jeweils unterschiedliche endogene Mengen AGR2 exprimieren (Abb. 3), mit einem für AGR2, AGR2 PDI mut oder AGR2 trunc KTEL kodierenden Plasmid beziehungsweise dem entsprechenden Leervektor transfiziert und in geringer Dichte ausgesät. Durch die Zugabe von Geneticin (G418) in das Kulturmedium wurde auf transfizierte Zellen selektiert. Die von diesen Zellen gebildeten Kolonien wurden anschließend gefärbt und quantifiziert. Zur Auswertung wurde der für die mit dem Leervektor transfizierten Zellen gewonnene Wert als 100% gesetzt. Die Überexpression von AGR2 in den entsprechend transfizierten Zellen wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 10 B, Abb. 11 B und D).

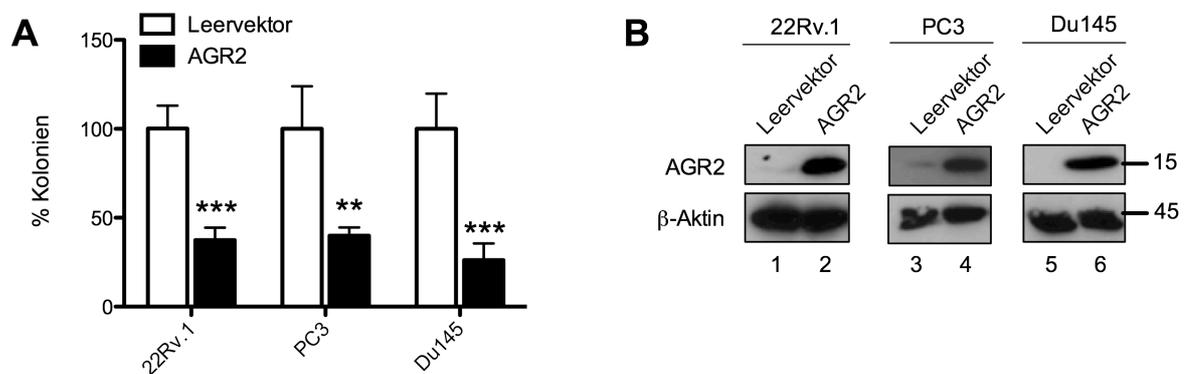


Abb. 10: Koloniebildungsassay in 22Rv.1, PC3 und Du145 Zellen nach Transfektion mit einem AGR2 Expressionsvektor oder dem entsprechenden Leervektor. **A** Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung von drei unabhängigen Assays (Mittelwert mit Standardabweichung), der Leervektor wurde jeweils als 100% gesetzt und die relative Kolonienzahl der AGR2 transfizierten Zellen entsprechend berechnet. (Student's t-Test ** $p < 0,05$ *** $p < 0,01$) **B** Western Blot Nachweis der AGR2 Überexpression in den Koloniebildungsassays mit einem AGR2 spezifischen Antikörper. β -Aktin wurde mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und dient als Ladekontrolle. AGR2 wurde in allen drei verwendeten Zelllinien überexprimiert.

Die Western Blot Daten zeigen, dass die Überexpression von AGR2 in allen mit dem AGR2 Konstrukt transfizierten Zellen nachgewiesen werden kann (Abb. 10 B, vgl. Spuren 1, 3, 5 mit 2, 4, 6). In allen drei untersuchten Prostatakrebslinien führt die Überexpression von AGR2 zu einer signifikant verringerten Kolonienzahl im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen (Abb. 10 A). Dies deutet darauf hin, dass gesteigerte Level von AGR2 zu einem verminderten Wachstum von Prostatakrebszellen führen. Dieser Effekt von AGR2 auf das Zellwachstum ist unabhängig vom Zelltyp und unabhängig von den endogenen AGR2 Expressionsleveln, da er sowohl bei Du145 Zellen, die kein endogenes AGR2 exprimieren, aber auch bei 22Rv.1 und PC3 Zellen auftritt, die jeweils sehr geringe bis moderate Menge AGR2 exprimieren.

Um zu ermitteln inwieweit die intrazelluläre Lokalisation sowie die mögliche Funktion als Protein-Disulfid-Isomerase eine Rolle bei dem beobachteten negativen Einfluss von AGR2 auf das Zellwachstum in Koloniebildungsassays spielen, wurden zwei AGR2 Expressionsvektoren mit jeweils einer Mutation im PDI oder KTEL Motiv wie oben beschrieben in 22Rv.1 und PC3 Zellen in Koloniebildungsassays verwendet. Die Western Blot-Analysen zeigen, dass die Überexpression der Konstrukte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden kann (Abb. 11 B und D, je Spuren 3 und 4). Die nur geringe Proteinmenge, welche für AGR2 trunc KTEL in PC3 Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 11 D, Spur 4), könnte auf einer verstärkten Sekretion des Proteins aufgrund des fehlenden ER-Lokalisationssignals beruhen.

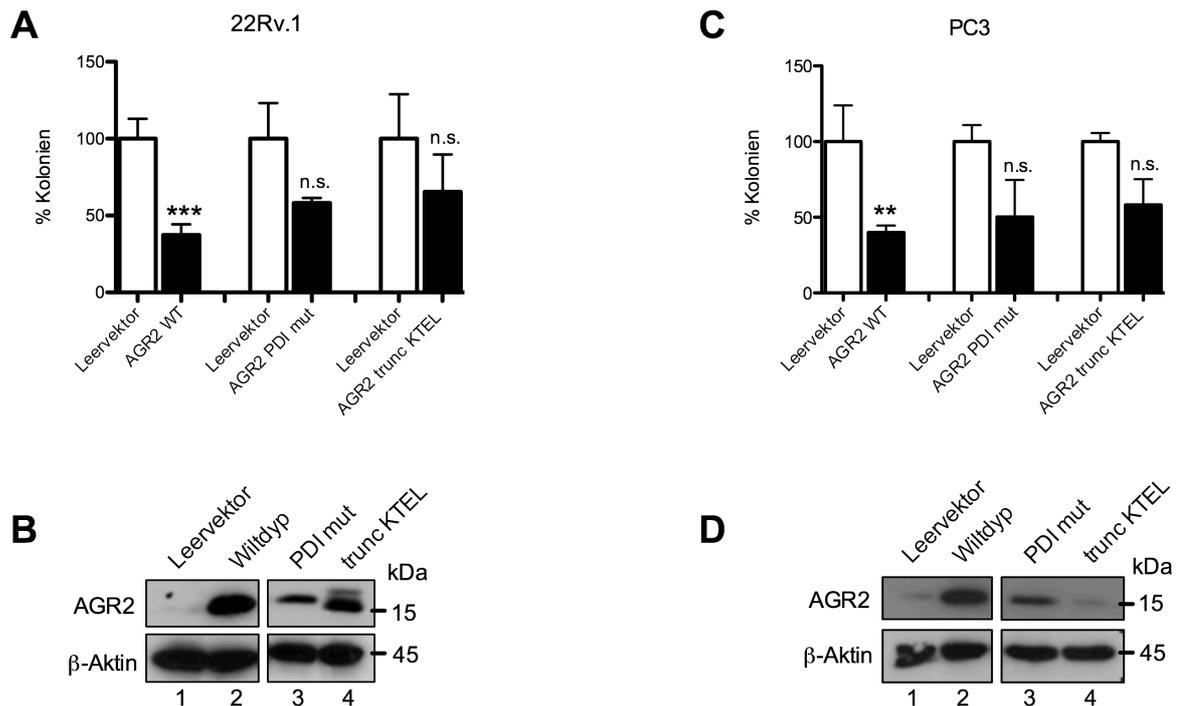


Abb. 11: Koloniebildungsassay mit Expressionsvektoren von Wildtyp AGR2 (AGR2 WT), AGR2 mit einem mutierten PDI Motiv (C81A, AGR2 PDI mut) und AGR2 ohne KTEL Motiv (L172Stop, AGR2 trunc KTEL). **A, C** Koloniebildungsassay in 22Rv.1 und PC3 Zellen. Dargestellt ist die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert mit Standardabweichung). Die Kolonienzahl der Leervektor transfizierten Zellen wurde als 100% gesetzt und die relative Kolonienzahl der AGR2 Zellen entsprechend berechnet. (n=3, Student's t-Test ** p<0,05, ***p<0,001, n.s. nicht signifikant). **B, D** Western Blot Nachweis der Überexpression der verwendeten Konstrukte mit spezifischen Antikörpern für AGR2 und β -Aktin. β -Aktin dient als Ladekontrolle.

Wie bereits gezeigt, führt die Überexpression von Wildtyp AGR2 zu einer signifikant kleineren Kolonienzahl in 22Rv.1 und PC3 Zellen (Abb. 10 A, Abb. 11 A, C). Die Überexpression des AGR2 Proteins mit einer Mutation innerhalb des CSSX Motivs führt in beiden Zelllinien zu einer verringerten Kolonienzahl, die Veränderung ist allerdings nicht signifikant (Abb. 11A und D, 22Rv.1 p=0,065; PC3 p=0,058). Gleiches gilt für die Überexpression des Konstruktes ohne KTEL Motiv, allerdings ist hier die Verringerung der Kolonienzahl noch einmal geringer als durch das PDI Motiv (Abb. 11 A und C, 22Rv.1 p=0,104; PC3 p=0,162).

Zusammengefasst haben die beiden beschriebenen Konstrukte einen geringen aber nicht signifikanten Effekt auf das Zellwachstum, während das Wildtypprotein dieses

signifikant negativ beeinflusst. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass das Vorhandensein beider Motive wichtig für die Funktion ist, welche AGR2 in Prostatakrebszellen ausübt. Der stärkere Effekt der Entfernung des KTEL Motivs im Vergleich zur Mutation des PDI Motivs steht vermutlich mit der intrazellulären Lokalisation des Proteins im Zusammenhang. Dies unterstützt die Vermutung, dass AGR2 eine Funktion im Endoplasmatischen Retikulum übernimmt.

5.3.3 AGR2 beeinflusst die Proliferation von Prostatakrebszellen

Um die Rolle von AGR2 in Prostatakrebs sowie die vorangegangenen Ergebnisse aus dem Koloniebildungsassay genauer untersuchen zu können, wurden 22Rv.1 Prostatakrebszellen stabil mit einem für AGR2 kodierenden Plasmid bzw. mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert und Einzelklone generiert. Die Expression von AGR2 wurde mit Western Blot nachgewiesen (Abb. 12 A). Die stabil mit dem Leervektor transfizierten Klone exprimieren keine detektierbare endogenen Mengen AGR2 (Leervektor Klone V1 und V9, Abb. 12 A Spuren 1 und 2). Die stabil mit einem AGR2 Expressionsvektor transfizierten Klone überexprimieren verschiedene Mengen AGR2 Protein (AGR2 Klone H19, H21, H35, H38, H41, Abb 12 A Spuren 3 bis 7).

Die stabil AGR2 überexprimierenden Klone wurden bezüglich eines möglichen Einflusses von AGR2 auf die Proliferationsrate der Zellen hin untersucht. Dazu wurde das sog. CellTiter Blue Assay verwendet, bei welchem ein nicht-fluoreszenter Farbstoff auf die Zellen gegeben wurde, der von lebenden Zellen zu einem fluoreszenten Farbstoff metabolisiert wird. Die so entstehende Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von vier Tagen bestimmt und jeweils mit der Fluoreszenz am Tag des Aussäens (Tag 0) verglichen. Dazu wurden die gewonnenen Werte von Tag 0 als 1 gesetzt und daraus die Proliferation der Zellen an den jeweils folgenden Tagen berechnet.

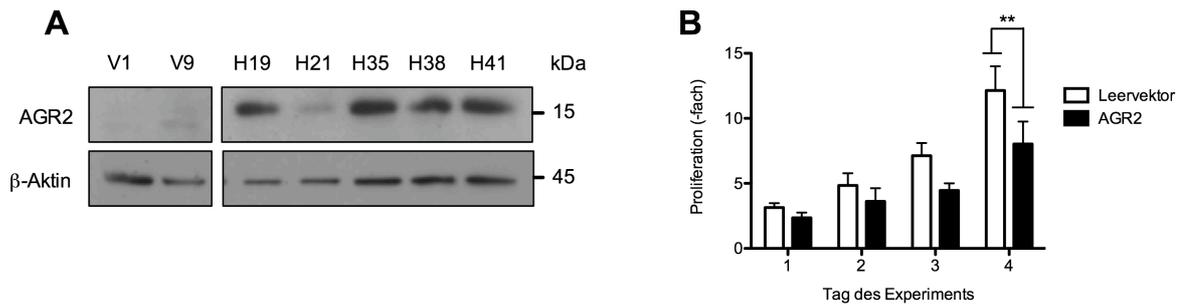


Abb. 12: Analyse des Einflusses einer AGR2 Überexpression auf die Proliferation von 22Rv.1 Prostatakrebszellen. **A** Western Blot Analyse der AGR2 Überexpression in 22Rv.1 Zellen mit spezifischen Antikörpern. Es wurden zwei Kontrollklone (V1 und V9) sowie sechs AGR2 Klone generiert, welche AGR2 überexprimieren. Der Nachweis von β -Aktin mit spezifischen Antikörpern dient als Ladekontrolle. **B** Bestimmung der Proliferation der Klone mit einem CellTiter Blue Assay. Dargestellt ist die Proliferation über vier Tage im Vergleich zum Tag des Aussäens (Tag 0). (Mittelwert mit Standardabweichung, n=3, Student's t-Test ** p<0,05).

Die Analyse der Proliferation der AGR2 überexprimierenden Einzelklone zeigt, dass die Überexpression von AGR2 in der 22Rv.1 Prostatakrebszelllinie im Mittel zu einer signifikant verringerten Proliferation im Vergleich zu den Einzelklonen, die stabil mit dem Leervektor transfiziert wurden, führt (Abb. 12 B n=3). Dies unterstützt die Beobachtungen aus den Koloniebildungsassays, bei welchen AGR2 zu vermindertem Zellwachstum geführt hat (Abb. 10 A).

5.3.4 AGR2 Überexpression verursacht einen G2/M Zellzyklusarrest

Eine mögliche Erklärung für den beobachteten negativen Einfluss erhöhter AGR2 Level auf die Proliferation von Zellen sowie für das verminderte Zellwachstum von Zellen, die AGR2 überexprimieren (Abb. 10 A, Abb. 12 B), können Veränderungen im Zellzyklus dieser Zellen sein. Um solche Veränderungen zu identifizieren, wurde das Zellzyklusprofil von 22Rv.1 AGR2 überexprimierenden Klonen bzw. entsprechenden Leervektorklonen in Massenkultur (pooled Clones) untersucht. Die AGR2 Expression wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 13 C).

Für die Analyse des Zellzyklusprofils wurden die Zellen bei etwa 80% Konfluenz geerntet und fixiert. Die DNA wurde fluoreszent mit Draq5 gefärbt und über den DNA-

Gehalt der Zellen (50.000 Zellen je Klon) anschließend die jeweiligen Zellzyklusstadien durch FACS bestimmt. Zellen in G1 sowie seneszente Zellen in G0 besitzen einen einfachen Chromosomensatz, also $2n$, Zellen in der S-Phase 2 bis $4n$, Zellen in der G2-Phase und der Mitose besitzen den doppelten Chromosomensatz, also $4n$. Zellen in der sub-G1-Phase sind apoptotisch.

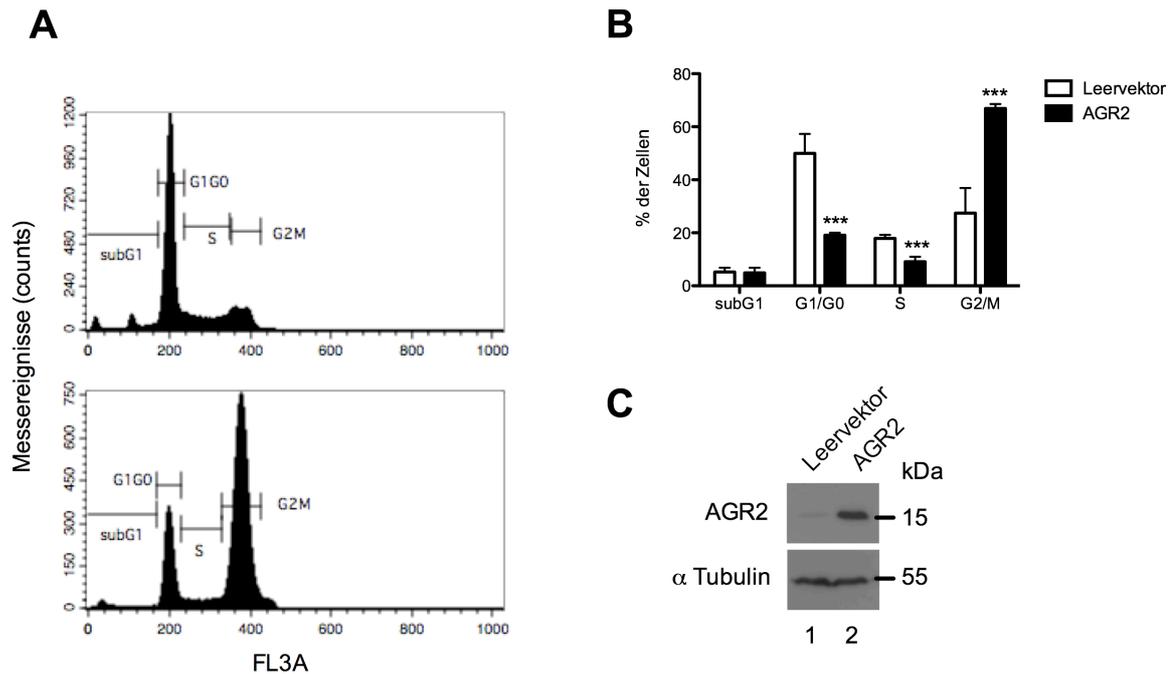


Abb. 13: Analyse des Zellzyklusprofils von 22Rv.1 AGR2 überexprimierenden Klonen (pooled Clones). **A** Repräsentatives Zellzyklusprofil der Kontrollklone (oben) und der AGR2 Klone (unten) **B** Relative Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. (Student's t-Test *** $p < 0,01$) **C** Western Blot Nachweis der AGR2 Überexpression in den 22Rv.1 pooled Clones (Massenkultur) mit spezifischen Antikörpern. α -Tubulin dient als Ladekontrolle.

Die durch FACS gewonnenen Daten über das Zellzyklusprofil der 22Rv.1 AGR2-Klone (Abb. 13 A und B) zeigen, dass eine Überexpression von AGR2 zu einem G2/M Arrest führt. Während sich im Fall der Vektor-Klone der größte Teil der Zellen in der G1/G0 Phase befindet (44%) und ein entsprechend geringerer Teil (34%) in der G2/M Phase des Zellzyklus, befindet sich bei den AGR2 überexprimierenden Klonen nur noch 19% der Zellen in der G1/G0 Phase und der Großteil der Zellen in der G2/M Phase (65%). Die

Zahl der Zellen in der S-Phase sowie die der apoptotischen Zellen verändert sich nur gering, beziehungsweise nicht.

Die beobachteten negativen Effekte von AGR2 auf die Proliferation basieren also auf einem G2/M Arrest, der durch die Überexpression des Proteins ausgelöst wird.

5.3.5 AGR2 Level beeinflussen die Cyclin B1 und cdc2 Expression

Um die Ursache für den beobachteten Arrest AGR2 überexprimierender Zellen in der G2/M Phase des Zellzyklus näher bestimmen zu können, wurden das Expressionslevel von Proteinen untersucht, die an dem Übergang von der G2 zur M-Phase im Zellzyklus beteiligt sind. Zwei wichtige an diesem Prozess beteiligten Proteine sind die cyclinabhängige Kinase 2 (cdc2) und Cyclin B1. Der Komplex aus diesen beiden Proteinen liegt in inaktiver Form im Zytoplasma vor, die Inaktivität wird dabei durch eine Phosphorylierung von cdc2 an den Aminosäuren Tyrosin 15 und Threonin 14 verursacht. Vor Beginn der Mitose werden diese beiden Aminosäuren durch cdc25B bzw. cdc25C dephosphoryliert und cdc2 von CAK (CDK-aktivierende Kinase) durch eine Phosphorylierung an Threonin 161 aktiviert (Mailand et al. 2002, Stark and Taylor 2006). Basierend darauf wurde in den AGR2 überexprimierenden 22Rv.1 Zellen die Expression von cdc2 und Cyclin B1 sowie die Phosphorylierung von cdc2 and Tyrosin 15 (inaktivierende Phosphorylierung) untersucht

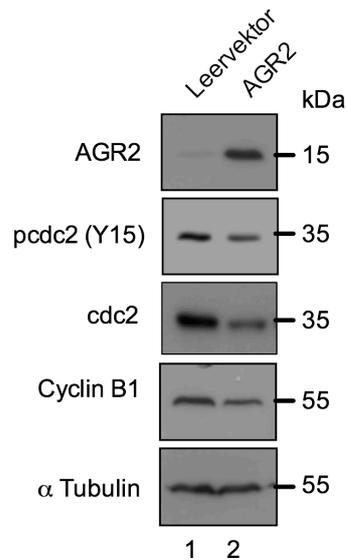


Abb 14: Nachweis der Expression und Phosphorylierung von an der G2/M Grenze beteiligten Proteinen in AGR2 überexprimierenden 22Rv.1 Zellen und entsprechenden Kontrollzellen (Leervektor) mittels Western Blot. Es wurden spezifische Antikörper zum Nachweis von AGR2, CyclinB1, cdc2 und phosphoryliertes cdc2 (Tyrosin 15) sowie α -Tubulin als Ladekontrolle verwendet.

Die Western Blot Analyse zeigt, dass es bei einer Überexpression von AGR2 in 22Rv.1 Zellen zu einer verringerten Expression von cdc2 kommt. Die Phosphorylierung von cdc2 and Tyrosin 15 wird ebenfalls leicht verringert, was wahrscheinlich an den verringerten cdc2 Proteinleveln liegt (Abb. 14, vgl. jeweils Spuren 1 und 2). Gleichzeitig werden in AGR2 überexprimierenden Zellen die Cyclin B1 Expressionslevel verringert, was mit großer Wahrscheinlichkeit zu dem beobachteten G2/M Zellzyklusarrest beiträgt (Abb. 14, vgl. jeweils Spuren 1 und 2).

Der beobachtete G2/M Arrest durch AGR2 Überexpression wird somit durch die Verringerung der Expression von cdc2 und Cyclin B1 verursacht.

5.3.6 AGR2 Überexpression führt zu gesteigerter Migration und Invasivität von Prostatakrebszellen

Die Charakterisierung von AGR2 in verschiedenen Karzinomen lassen eine Rolle des Proteins bei der Metastasierung von Tumoren vermuten (Liu et al. 2005, Park et al. 2011, Wang et al. 2008). Um eine solche Rolle in Prostatakrebs zu untersuchen, wurde der Einfluss von AGR2 auf die Migration sowie auf die Invasivität von 22Rv.1 Zellen untersucht.

Dazu wurden die zuvor beschriebenen 22Rv.1 AGR2 überexprimierenden Einzelklone (Abb. 12) in Wundheilungsassays und Boyden-Kammer Assays analysiert. Wundheilungsassays (oder auch Scratchassays) geben Auskunft über das Migrationsverhalten von Zellen. Für dieses Assay wurden die Zellen bis zu 100% Konfluenz kultiviert und dem Zellrasen anschließend eine Wunde zugefügt. Die Schließung dieser Wunde, also die Migration der Zellen in den nun zellfreien Bereich, wurde für verschiedene Zeitpunkte bestimmt. Durch Boyden-Kammer Assays lassen sich Informationen über die Invasivität von Zellen gewinnen. Die Zellen werden dabei im oberen Kompartiment der zweigeteilten Boyden-Kammer ausgesät, welches durch Matrigel, einem gallertartigen Proteinmix, der die extrazelluläre Umgebung imitiert, und eine poröse Membran vom unteren Kompartiment getrennt ist. Die Zellen wurden in diesem Experiment in Medium ohne Serum in das obere Kompartiment gesät. Das untere Kompartiment wurde mit Medium mit 10% Serum gefüllt, welches als Lockstoff für die Zellen im oberen Teil der Kammer dient. Zellen mit invasiven Eigenschaften können das obere Kompartiment durch das Matrigel und die poröse Membran verlassen. Durch die fluoreszente Markierung der Zellen mit dem Farbstoff DiI vor dem Aussäen wurde die Zahl der Zellen im unteren Kompartiment bestimmt.

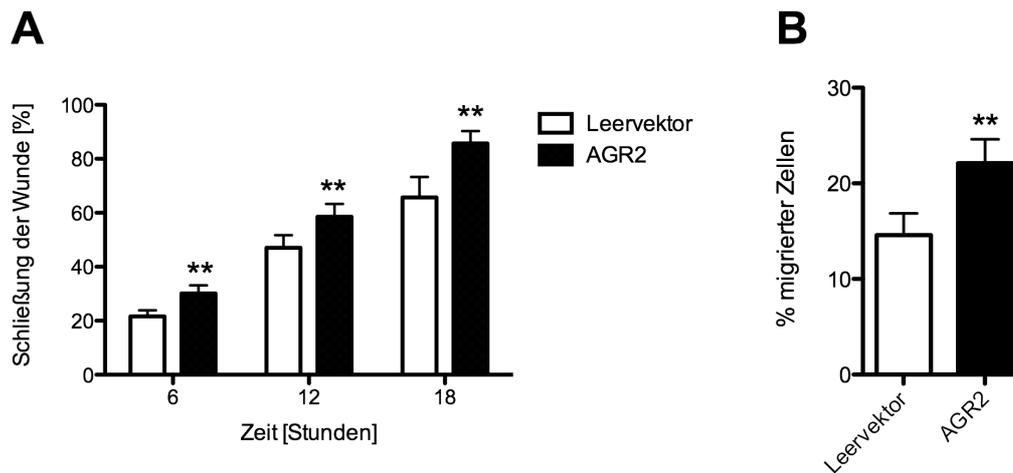


Abb. 15: Einfluss von AGR2 Überexpression auf Migration und Invasion von 22Rv.1 Zellen. A Nachweis des Einflusses von AGR2 auf die Migration von 22Rv.1 Zellen in einem Wundheilungsassay. Dazu wurde einem Zellrasen bei 100% Konfluenz eine Wunde zugefügt und die Schließung der Wunde über einen Zeitraum von 18 Stunden quantitativ bestimmt. Dargestellt ist die Schließung der Wunde in Prozent (Mittelwert mit Standardabweichung, n=3, Student's t-Test ** p<0,05) **B** Nachweis des Einflusses von AGR2 auf die migratorische Invasivität von 22Rv.1 Zellen durch ein Boyden-Kammer Assay. Bestimmt wurde die relative Zahl der Zellen die das obere Kompartiment der Kammer (serumfreies Medium) durch Matrigel und eine poröse Membran hindurch in das untere Kompartiment (Medium mit 10% Serum als Lockstoff) verlassen haben. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der Zellen im unteren Kompartiment nach 24 Stunden aus drei unabhängigen Experimenten. (Student's t-Test ** p<0,05).

Die Analyse der Migration zeigt, dass die Überexpression von AGR2 zu einer signifikant weiter geschlossenen Wunde und damit zu verstärkter Migration der Zellen führt (Abb. 15 A). Gleichzeitig steigt auch die Invasivität der AGR2 exprimierenden Zellen gegenüber den mit dem Leervektor transfizierten Zellen signifikant an: Während sich im Mittel nur 15% der Leervektorzellen im unteren Kompartiment der Kammer befanden, waren es bei den AGR2 überexprimierenden Zellen im Mittel 22% (Abb. 15 B).

Die verstärkte Migration und Invasion von Prostatakrebszellen nach AGR2 Überexpression steht im Einklang mit den bereits gemachten Beobachtungen in anderen Karzinomen (Liu et al. 2005, Park et al. 2011, Wang et al. 2008) und deutet darauf hin, dass AGR2 auch in Prostatakrebs eine Funktion bei der Bildung von Metastasen übernimmt.

5.3.7 AGR2 Überexpression führt zu vermindertem Tumorwachstum *in vivo*

Um die gewonnenen Ergebnisse zu dem Effekt einer AGR2 Überexpression in 22Rv.1 Zellen, besonders die Effekte auf Proliferation, Invasion und Migration (Abb. 12 B, Abb. 15) *in vivo* weiter untersuchen zu können wurden sechs Wochen alten, athymischen Nacktmäuse in einem Xenograft Experiment subkutan jeweils 2×10^6 Zellen (stabil mit dem Leervektor oder AGR2 transfiziert) in PBS in beide Flanken injiziert. Für die zwei verwendeten Vektorklone wurden jeweils 5 Tiere injiziert (entsprechend 10 Tumore), für die AGR2 Klone wurden insgesamt 28 Tumore untersucht. Das Tumorwachstum wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 7 Wochen durch die Berechnung des Tumolvolumens bestimmt. Das Tumolvolumen wurde nach Messung von Länge, Tiefe und Breite des Tumors mit einem Messschieber durch die Ellipsoid-Formel errechnet (Volumen= [ml] = Länge [cm] x Tiefe [cm] x Breite [cm] x 0,523). Nach Ablauf der sieben Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und das Gewicht der Tumore sowie der drainierenden Lymphknoten bestimmt. Das Gewicht der drainierenden Lymphknoten wurden analysiert um Hinweise auf eine mögliche Metastasierung der Primärtumore zu erhalten.

Der Vergleich der Tumore, die von den mit dem Leervektor transfizierten Zellen gebildet wurden mit denen, die durch Injektion der AGR2 überexprimierenden Zellen entstanden sind, zeigt ein kaum vorhandenes Tumorwachstum bei AGR2 Überexpression über einen Zeitraum von sieben Wochen (Abb. 16 A und B). Dies stimmt mit den zuvor gewonnenen Daten zur verminderten Proliferation der AGR2 Klone (Abb. 12 B) überein. Die Tumore der Vektorklone erreichen innerhalb der sieben Wochen des Experiments ein Volumen von etwa 200 bis 700 mm³, die AGR2 Klone hingegen wachsen im gleichen Zeitraum nur bis zu einem Volumen von bis zu 40 mm³. Entsprechend geringer ist das Gewicht der Tumore der AGR2 Klone im Vergleich zu den Tumoren der Leervektor Klone (Abb. 16 C).

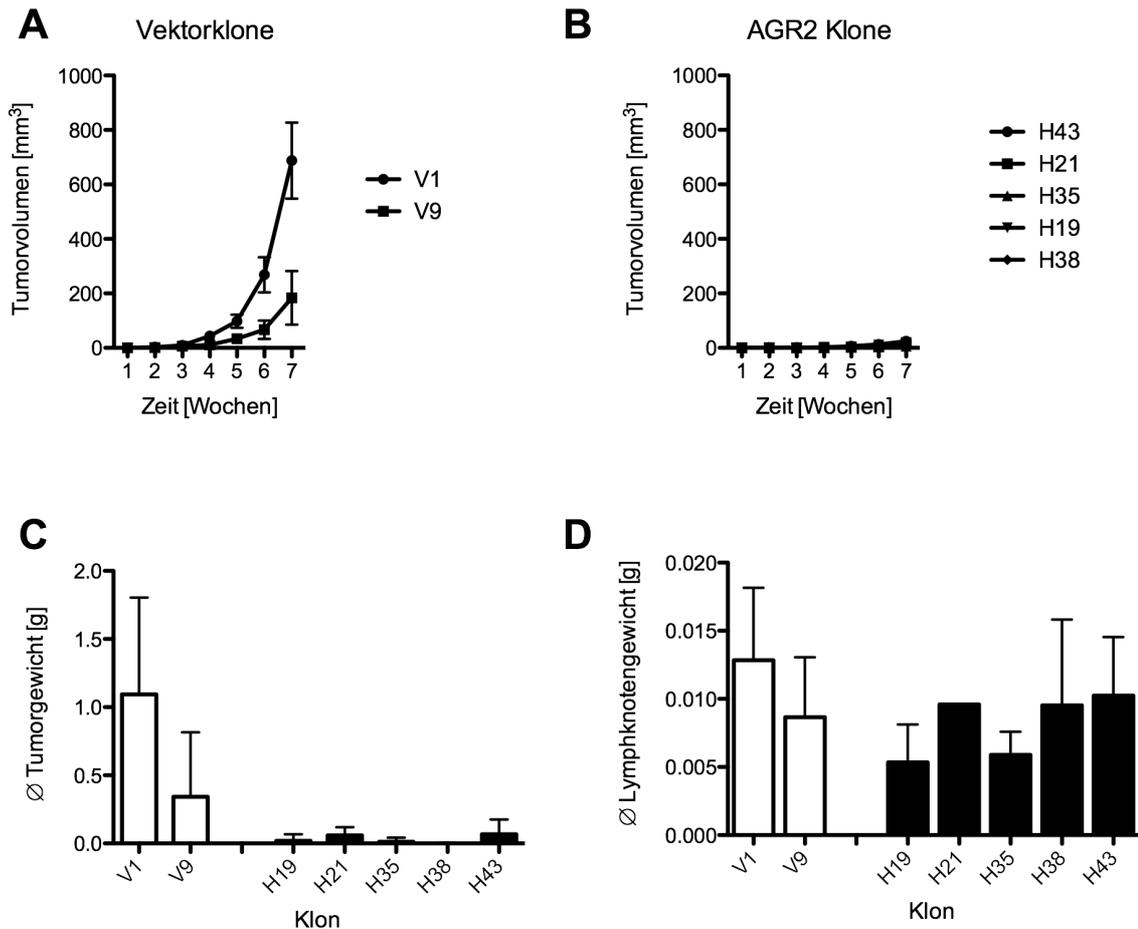


Abb. 16: *In vivo* Xenograft Experiment mit AGR2 überexprimierenden Klonen und entsprechenden Leervektor Kontrollklonen in athymischen Nacktmäusen. 6 Wochen alten Tieren wurden 2×10^6 Zellen subkutan in beide Flanken injiziert. Für die Vektorklone V1 und V9 wurden jeweils 5 Tiere injiziert (10 Tumore). Für die AGR2 Klone H19, H35 und H38 wurden jeweils 5 Tiere (10 Tumore), für H21 2 Tiere (4 Tumore) und für H43 7 Tiere (14 Tumore) injiziert. **A, B** Durchschnittliches Tumolvolumen in mm³ mit Standardfehler der Vektorklone (A) und der AGR2 Klone (B) über einen Zeitraum von 7 Wochen nach Injektion der Zellen in athymische Nacktmäuse **C, D** Tumorgewicht (C) und Gewicht der drainierenden Lymphknoten (D) nach Euthanasierung der Mäuse (7 Wochen nach Injektion der Zellen; Mittelwert mit Standardabweichung).

Das durchschnittliche Gewicht der drainierenden Lymphknoten zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen Leervektor-transfizierten und AGR2 überexprimierenden Klonen (Abb. 16 D, $p=0,171$), auf Basis dessen können also keine Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Metastasenbildung der AGR2 bzw. Leervektor Tumore gewonnen werden. Der Grund hierfür kann in dem Abbruch des Experiments bei sehr kleinen Primärtumoren der AGR2 Klone liegen. Für eine genauere

Analyse des Einflusses von AGR2 auf die Metastasenbildung wäre daher ein Abbruch des Experiments bei Erreichen einer bestimmten Tumorgröße anstatt wie hier zu einem bestimmten Zeitpunkt sinnvoller.

5.4 Funktionelle Charakterisierung von AGR2 durch Knock Down

5.4.1 AGR beeinflusst die Proliferation von Prostatakrebszellen

Eine Überexpression von AGR2 in der Prostatakrebszelllinie 22Rv.1 hat gezeigt, dass gesteigerte AGR2 Proteinlevel einen negativen Effekt auf die Proliferation dieser Zellen haben (Abb. 12). Die Ursache hierfür liegt in einem durch die Überexpression ausgelösten G2/M Zellzyklusarrest (Abb. 13).

Zur weiteren Charakterisierung des beobachteten Effekts von AGR2 auf die Proliferation von Prostatakrebszellen wurden Massenkultur-Klone (pooled Clones) in VCaP Zellen generiert, in welchen die AGR2 Expression durch shRNA Knock Down reduziert wurde. Der Nachweis des Knock Downs erfolgte durch Western Blot (Vgl. Abb. 17 A Spuren 1-2 und 3-6). Unspezifische shRNAs dienten zur Generierung von Kontrollklonen (Abb. 17 B Spuren 1 und 2). VCaP Zellen wurden aufgrund ihrer endogenen AGR2 Expression (Abb. 3) für diese Experimente ausgewählt. Für die Bestimmung der Proliferationsrate der AGR2 Knock Down Klone bzw. der entsprechenden Kontrollklone wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in neu gebildete DNA nachgewiesen.

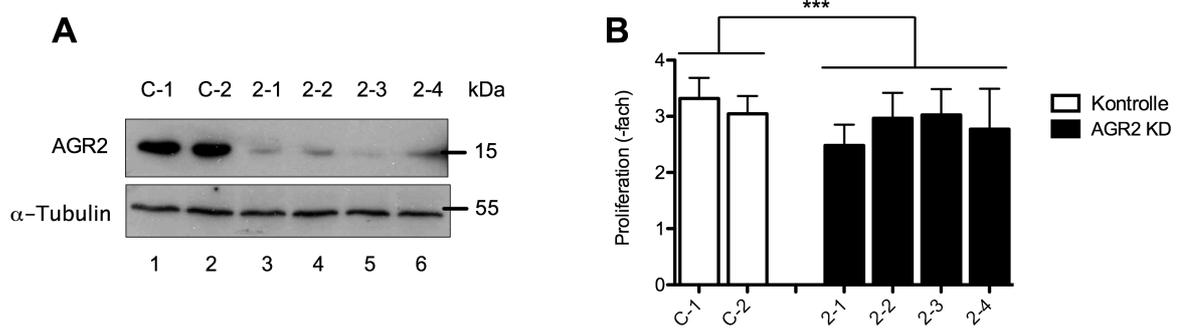


Abb. 17: Analyse des Einflusses eines AGR2 Knock Downs auf die Proliferation von VCaP Prostatakrebszellen. **A** Western Blot Analyse des AGR2 Knock Downs mit spezifischen Antikörpern. Es wurden zwei Kontrollklone (C-1 und C-2) sowie vier Knock Down Klone (2-1, 2-2, 2-3, 2-4; je in Massenkultur/ pooled Clones) generiert. Der Nachweis von β -Aktin mit spezifischen Antikörpern dient als Ladekontrolle. **B** Bestimmung der Proliferation der Klone durch Einbau von ^3H -Thymidin. Dargestellt ist die mittlere Proliferation der Klone aus drei unabhängigen Experimenten. (Mittelwert mit Standardabweichung, Student's t-Test *** $p < 0,01$)

Die Analyse der Proliferation zeigt, dass eine Verringerung der AGR2 Expression durch Knock Down im Mittel zu signifikant verringerter Proliferation im Vergleich zu den Kontrollklonen führt (Abb. 17 B). Da auch eine AGR2 Überexpression zu einer verminderten Proliferation führt (Abb. 12 B), ist dies überraschend, weist aber darauf hin, dass Veränderung des AGR2 Expressionslevels sowohl in positive als auch in negative Richtung das Wachstum von Prostatakrebszellen deutlich beeinflussen können. Die AGR2 Expression wird in Prostatakrebszellen daher vermutlich streng reguliert.

5.4.2 AGR2 Knock Down verursacht einen G1/G0 Zellzyklusarrest

Wie bei den AGR2 überexprimierenden Klonen, in welchen die geringere Proliferation durch einen G2/M Zellzyklusarrest verursacht wird (Abb. 13), kann auch die Ursache für die verminderte Proliferation nach einem AGR2 Knock Down (Abb. 17 B) in einem veränderten Zellzyklusprofil der Zellen liegen.

Aus diesem Grund wurde das Zellzyklusprofil der VCaP Zellen (AGR2 Knock Down oder Kontrollklone) mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) untersucht. Dazu wurden die Zellen bei etwa 80% Konfluenz geerntet und fixiert. Die DNA wurde

fluoreszent mit Draq5 gefärbt und über den DNA-Gehalt der Zellen (50.000 Zellen je Klon) anschließend die jeweiligen Zellzyklusstadien bestimmt. Zellen in G1 sowie seneszente Zellen in G0 besitzen einen einfachen Chromosomensatz, also $2n$, Zellen in der S-Phase 2 bis $4n$, Zellen in der G2-Phase und der Mitose besitzen den doppelten Chromosomensatz, also $4n$. Zellen in der sub-G1-Phase sind apoptotisch.

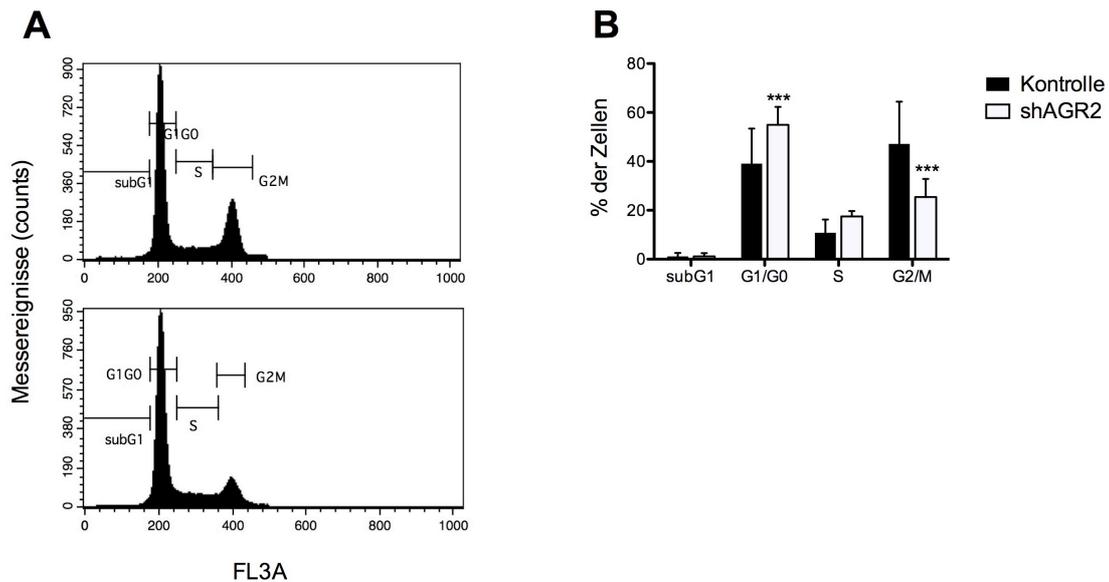


Abb. 18: Bestimmung des Einflusses eines AGR2 Knock Downs auf das Zellzyklusprofil von VCaP Zellen **A** Repräsentatives Zellzyklusprofil der Kontrollklone (oben) und der AGR2 Knock Down Klone (unten) **B** Zusammenfassende Darstellung der relativen Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert aus zwei Kontroll- und vier Knock Down Klonen, Student's t-Test *** $p < 0,01$).

Die FACS Analyse des Zellzyklusprofils der VCaP Klone zeigt, dass es durch den AGR2 Knock Down im Mittel zu einer signifikanten Verringerungen der Zellzahl in der G2/M Phase des Zellzyklus kommt (Abb. 18, 47% der Kontrollklone bzw. 25% der Knock Down Klone). Dies unterstützt die zuvor gemachte Beobachtung, dass eine AGR2 Überexpression zu einer größeren Zahl der Zellen in G2/M führt (Abb. 13) Während sich die Zahl der Zellen in SubG1 und in der S Phase nicht signifikant ändert, führt der AGR2 Knock Down zu einer signifikant erhöhten Zahl der Zellen in G1/G0 (40% bzw. 55%) (Abb. 19).

Die beobachteten negativen Effekte von AGR2 auf die Proliferation basieren somit auf einem G2/M Arrest, der durch die Überexpression des Proteins ausgelöst wird (Abb. 13), und auf einem G1/G0 Arrest unter AGR2 Knock Down Bedingungen (Abb. 19). Die molekularen Ursachen für den durch einen AGR2 Knock Down verursachten G1/G0 Zellzyklusarrest wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

5.5 AGR2 und AGR3 Expressionslevel korrelieren invers

Im Zuge der Charakterisierung der Rolle von AGR2 in Prostatakrebs konnte gezeigt werden, dass das Protein in frühen Stadien des Karzinoms verstärkt exprimiert wird und dass die Expression in späteren Stadien wieder abnimmt (Abb. 7). Das zu AGR2 stark homologe Protein AGR3 zeigte ein gegensätzliches Expressionsprofil, die AGR3 Expression stieg erst zu späten Krankheitsstadien hin an (Abb. 7).

Bei der genaueren Untersuchung der Rolle vom AGR2 in der Progression des Prostatakarzinoms konnte festgestellt werden, dass eine Überexpression des Proteins einen negativen Einfluss auf die Proliferation von Zellen hat (Abb. 12). Die Analyse des Effekts von AGR3 auf die Proliferation hat gezeigt, dass eine Überexpression des Proteins einen positiven Effekt auf die Proliferation hat (Erald Shehu, PhD Student AG Prof. A. Cato, unveröffentlichte Daten).

Aufgrund dieser beiden Beobachtungen und der großen Homologie von AGR2 und AGR3 (Abb. 1) wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den Expressionsleveln der beiden Proteine untersucht. Für einen solchen Zusammenhang spricht auch die direkt nebeneinander liegende Position der AGR2 und AGR3 Gene auf Chromosom 7 (Petek et al. 2000), sowie die Tatsache, dass sie wahrscheinlich durch eine Genduplikation entstanden sind (Shih et al. 2007). Um den vermuteten Zusammenhang zwischen AGR2 und AGR3 Expression zu analysieren, wurde die Expression des jeweils homologen Proteins in AGR2 und AGR3 Knock Down Klonen in VCaP bestimmt. Dazu wurden die bereits zuvor beschriebenen AGR2 Knock Down Klone verwendet (Abb. 17 A). Zusätzlich wurden VCaP Klone mit einem Lentiviralen AGR3 Knock Down und entsprechende Kontrollklone generiert. Der Knock Down wurde mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 19 D).

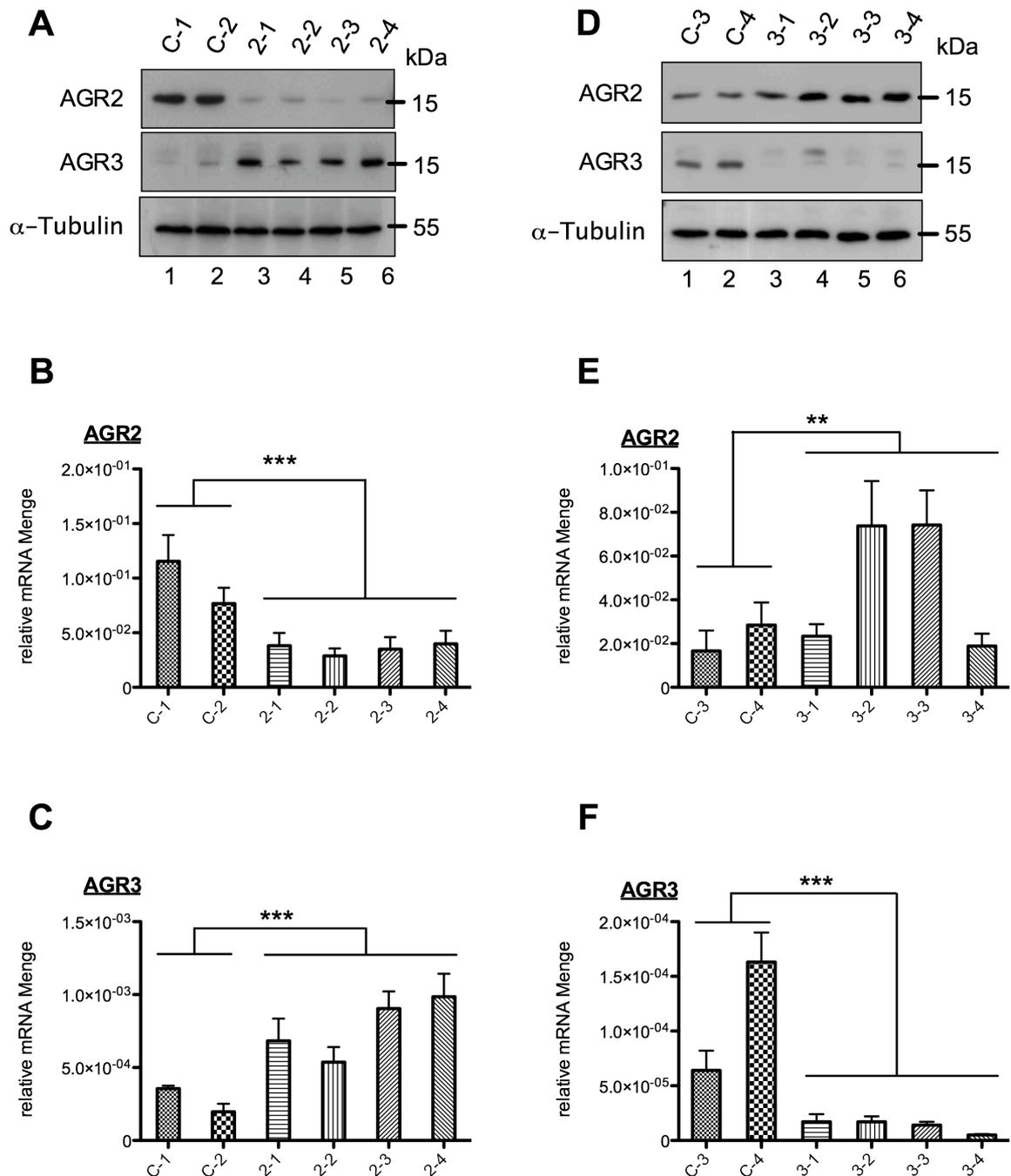


Abb. 19: Analyse eines möglichen Zusammenhangs der AGR2 und AGR3 Expression in VCaP Zellen.

Bestimmung der Expression von AGR2 und AGR3 Expression in **A, B, C** VCaP AGR2 Knock Down Klonen (Kontrollklone C-1, C-2; Knock Down Klone 2-1 bis 2-4) und **D, E, F** VCaP AGR3 Knock Down Klonen (Kontrollklone C-3, C-4; Knock Down Klone 3-1 bis 3-4) mittels **A, D** Western Blot durch spezifische Antikörper (α -Tubulin dient als Ladekontrolle) auf Proteinebene und **B, C, E, F** durch Real Time PCR auf mRNA Ebene. Dargestellt ist die relative mRNA Menge (Mittelwert mit Standardabweichung, n=3, Student's t-Test *** p < 0,01 ** p < 0,05). Als Referenzgen wurde die humane ribosomale Untereinheit (36B4) verwendet.

Bei der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen AGR2 und AGR3 Expressionsleveln konnte festgestellt werden, dass das AGR3 Proteinleveln in Zellen, in welchen AGR2 durch Knock Down vermindert ist, heraufreguliert wird (Abb. 19 A, vgl. Spuren 1 und 2 mit 3 bis 6). Die durch Knock Down verminderte Expression von AGR3 führt auf Proteinebene zu gesteigerter Expression von AGR2 (Abb. 19 D, vgl. Spuren 1 und 2 mit 3 bis 6).

Die beobachteten Veränderungen auf Proteinebene können durch Veränderungen auf Transkriptions- sowie auf Translationsebene verursacht werden, also z.B. auch durch geringere mRNA Mengen oder geringere mRNA Stabilität. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den Proteinleveln auch die relative mRNA-Menge von AGR2 und AGR3 mittels quantitativer Realtime PCR bestimmt. Für die AGR2 Knock Down Klone zeigt dies, dass im Vergleich der beiden Kontrollklone (C-1 und C-2) mit den vier Knock Down Klonen (2-1, 2-2, 2-3, 2-4) die AGR2 mRNA Menge durch den lentiviralen Kock Down im Mittel signifikant verringert ist (Abb. 19 B). Gleichzeitig kommt es im Mittel zu einer stark signifikanten Erhöhung der relativen AGR3 mRNA Menge nach AGR2 Knockdown (Abb. 19 C). Dies spricht dafür, dass die Effekt der veränderten AGR2 Level auf die AGR3 Expression auf Transkriptionsebene stattfinden.

Die entsprechende Untersuchung der AGR3 Knock Down Klone zeigt, dass die relative AGR3 mRNA Menge durch den Knockdown signifikant verringert ist (Abb. 19 F, Kontrollklone C-3 und C-4, Knock Down Klone 3-1, 3-2, 3-3, 3-4). Gleichzeitig kommt es in diesen Klonen zu einer signifikant gesteigerten AGR2 Expression (Abb. 19 E). Wie im oben beschriebenen umgekehrten Fall findet al..so auch die Regulation der AGR2 Expression nach AGR3 Knock Down auf Transkriptionsebene statt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass AGR2 und AGR3 Expression invers miteinander korrelieren. Dies geht konform mit der in Gewebeproben gezeigten gegensätzlichen Expression von AGR2 und AGR3 während der Progression von Prostatakrebs (Abb. 7).

5.5.1 AGR2 Level beeinflussen die FoxA1 und FoxA2 Expression

Basierend auf der beobachteten Korrelation zwischen der AGR2 und der AGR3 Expression wurden mögliche Faktoren untersucht, die eine Rolle bei diesem Vorgang spielen könnten. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf Faktoren gelegt, die bereits mit der Regulation von AGR2 und/ oder AGR3 in Verbindung gebracht wurden.

Es ist bekannt, dass AGR2 und AGR3 in ihrer Expression durch Androgene reguliert werden (Bu et al. 2011, Zhang et al. 2005), weshalb die Proteinlevel des Androgenrezeptors in VCaP AGR2 Knock Down Klonen untersucht wurden. Neben der Regulation durch Steroidhormonrezeptoren konnten auch die beiden Forkhead Box Transkriptionsfaktoren FoxA1 und FoxA2 als Regulatoren der AGR2 Expression identifiziert werden (Zheng et al. 2006).

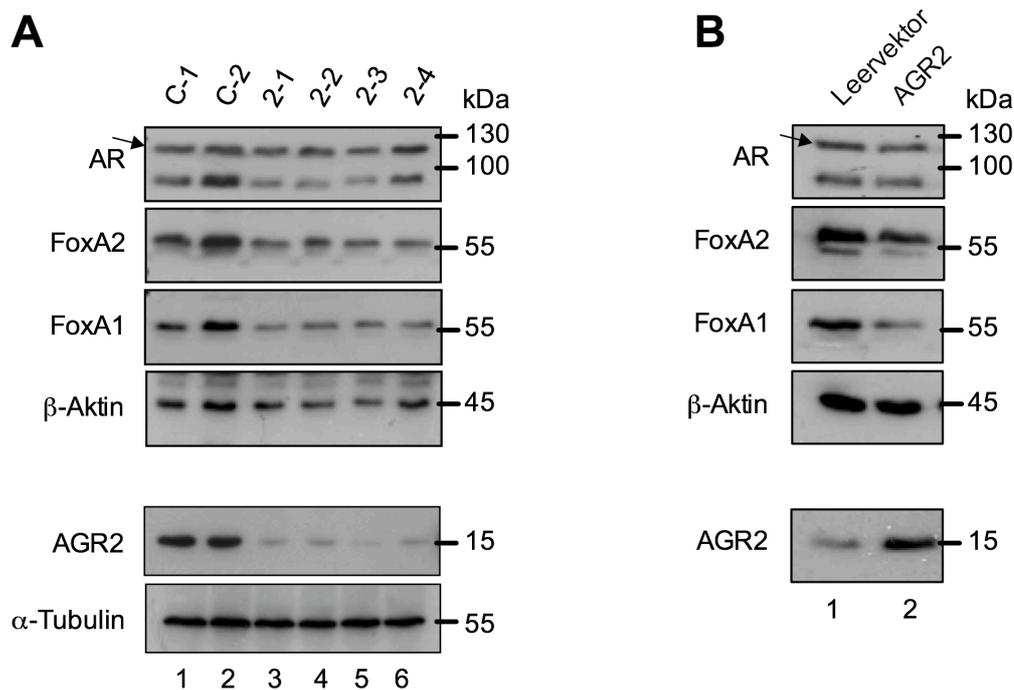


Abb. 20: Western Blot Analyse der Proteinlevel von FoxA1, FoxA2 und Androgenrezeptor (AR) als bekannte AGR2 und AGR3 Regulatoren in A VCaP AGR2 Knock Down Klonen (C-1 und C-2 Kontrollklone, 2-1 bis 2-4 AGR2 Knock Down Klone) und B 22Rv.1 AGR2 Überexpressionsklonen. Der Pfeil markiert die Proteinbande des kompletten (full-length) Androgenrezeptors, bei der jeweils zweiten nachgewiesenen Bande handelt es sich um beschrieben AR Spleißvarianten. Für den Nachweis der Proteine wurden entsprechend spezifische Antikörper verwendet. α-Tubulin bzw. β-Aktin dienen als Ladekontrolle.

Die Untersuchung der Expressionslevel der genannten Faktoren mit Western Blot zeigt, dass ein Knock Down von AGR2 keinen Effekt auf den kompletten (full-length) Androgenrezeptor hat (Abb. 20 A, vgl. Spuren 1 und 2 (Kontrollklone C-1 und C-2) mit 3 bis 6 (Knock Down Klone 2-1 bis 2-4), obere Bande), dass es aber zu einer verminderten Expression einer AR Spleißvariante kommt (Abb. 20 A, vgl. Spuren 1 und 2 mit 3 bis 6, untere Bande). Bei dieser Spleißvariante handelt es sich vermutlich um eine in VCaP Zellen beschriebene AR Variante, die sich durch das Fehlen der Ligandenbindedomäne (LBD) auszeichnet (Hu et al. 2009). Die Analyse der FoxA1/2 Level zeigt, dass verminderte AGR2 Level zu einer Verringerung der Expression sowohl von FoxA1 als auch von FoxA2 führen (Abb. 20 A, vgl. Spuren 1 und 2 mit 3 bis 6).

Zur weiteren Analyse dieser Beobachtungen wurde auch der Effekt einer AGR2 Überexpression auf die drei genannten Faktoren untersucht. Diese Untersuchung zeigt, dass eine AGR2 Überexpression in 22Rv.1 Zellen keinen Effekt auf den full-length Androgenrezeptor (Abb. 20 B, vgl. Spur 1 und 2, obere Bande) sowie auf eine in 22Rv.1 beschriebene AR Spleißvariante mit fehlender LBD hat (Abb. 20 B, vgl. Spur 1 und 2, untere Bande) (Tepper et al. 2002, van Bokhoven et al. 2003). Gesteigerte AGR2 Level haben allerdings wie auch der Knock Down des Proteins (Abb. 20 A) einen negativen Einfluss auf die Proteinlevel von FoxA1 und FoxA2 (Abb. 20 B, vgl. Spur 1 und 2).

Ob AGR2 die FoxA1 und FoxA2 Level auf der Translations- oder auf der Transkriptionsebene beeinflusst, wurde im Zusammenhang dieser Arbeit nicht untersucht.

5.6 ER Stress führt zu gesteigerter AGR2 Expression

Hinweise auf eine weitere mögliche Funktion von AGR2 finden sich in der Aminosäuresequenz des Proteins. AGR2 besitzt ein zentrales CXXS Motiv, durch welches es der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) zugeordnet wird (Persson et al. 2005). PDIs übernehmen Funktionen als Chaperone bei der korrekten Faltung von Proteinen. Am C-terminalen Ende des AGR2 Proteins findet sich ein KTEL Motiv, eine Variante eines KDEL Motivs, welches von Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum erkannt wird und so zur Lokalisation eines Proteins im ER führen kann (Lewis und Pelham 1990). Die Lokalisation von AGR2 im ER konnte durch Immun-

fluoreszenzanalysen gezeigt werden (Abb. 9). In Bezug auf die Funktion, die das Protein im ER übernimmt, konnte für das Maus homolog sowie auch das humane AGR2 Protein bereits eine gesteigerte Expression durch ER-Stress gezeigt werden (Higa et al. 2011, Zhao et al. 2010). Ein AGR2 Knock Down konnte mit einer erhöhten Sensibilität von Zellen auf ER-Stress in Verbindung gebracht werden (Higa et al. 2011).

Um die Rolle von AGR2 bei ER Stress in Prostatakrebszellen untersuchen zu können, wurden VCaP Zellen, welche endogenes AGR2 exprimieren, für 16 Stunden mit den beiden bekannten ER Stress-Auslösern Thapsigargin (TG, 300 nM) und Tunicamycin (TM, 10 µg/ml) behandelt. Die Behandlung mit EtOH bzw. DMSO diente dabei als jeweilige Lösemittelkontrolle. Tunicamycin ist ein Antibiotikum, welches aus *Streptomyces lysosuperficus* isoliert wird und die Synthese von N-Glykanen hemmt. Thapsigargin wird aus *Thapsia garganica* isoliert und hemmt sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPasen, wodurch es zu einer Anreicherung von Kalzium im Zytoplasma behandelter Zellen kommt (Kuo und Lampen 1976, Treiman et al. 1998). Beide Substanzen werden allgemein zur Induktion von ER Stress eingesetzt. GRP78 wird als Marker für diese ER Stressinduktion eingesetzt, da es unter Stressbedingungen zu gesteigerten GRP78 Leveln kommt (Lee 2005, Ron und Walter 2007). Als weitere Kontrolle wurden die Proteinlevel des zu AGR2 homologen AGR3 untersucht, welches aufgrund seiner Aminosäuresequenz ebenfalls der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen zugeordnet wird (Persson et al. 2005) und daher wahrscheinlich ebenfalls durch zellulären Stress vermehrt exprimiert wird.

Die Behandlung von VCaP Zellen mit Thapsigargin oder Tunicamycin führt zu Induktion von ER Stress, was sich durch mit Western Blot nachgewiesene gesteigerte GRP78 Proteinlevel zeigt (Abb. 21 A, vgl Spuren 1 und 2 mit 3 und 4). Auch die AGR3 Expression wird durch die Behandlung der Zellen mit Thapsigargin leicht erhöht (Abb. 21 A, Spur 3). Die beobachtete Verringerung der AGR3 und GRP78 Proteinlevel nach Behandlung der Zellen mit Tunicamycin (Abb. 21 A, Spur 4) beruht vermutlich auf der Inhibierung der Proteinneusynthese im Zuge der Reaktion der Zellen auf ER Stress (Lai et al. 2007) oder auf einer zelltypspezifisch geringen Reaktion von VCaP Zellen auf Tunicamycin.

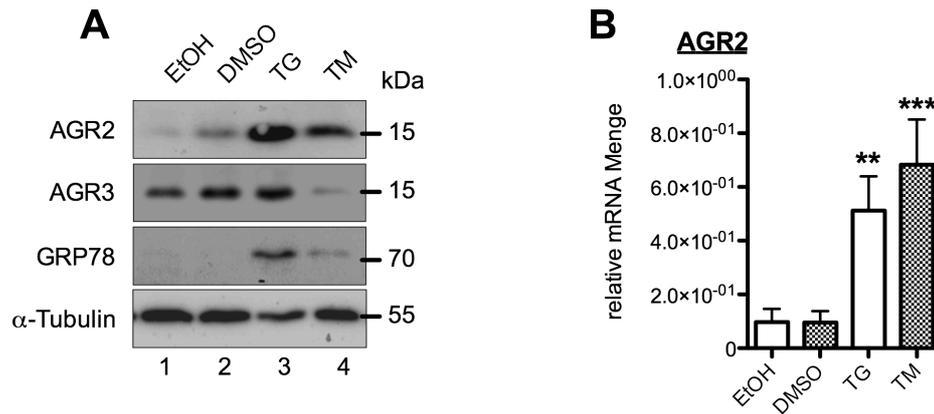


Abb. 21: Regulation von AGR2 unter ER Stressbedingungen. Für das Experiment wurden $0,25 \times 10^6$ VCaP Zellen für 16 Stunden mit 300 nM Thapsigargin (TG), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunicamycin (TM) oder den entsprechenden Lösemittelkontrollen (EtOH, DMSO) behandelt und anschließend die Proteine oder mRNA isoliert. **A** Nachweis der Regulation auf Proteinebene durch Western Blot. AGR2, AGR3, GRP78 und α -Tubulin wurden mittel spezifischer Antikörper nachgewiesen. GRP78 und AGR3 dienen zum Nachweis des durch TG und TM ausgelösten ER Stresses. α -Tubulin dient als Ladekontrolle. **B** Relative mRNA Menge (Expression) von AGR2. Die mRNA wurde 16 Stunden nach Behandlung mit TM, TG oder den Lösemittelkontrollen isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Der Nachweis von AGR2 erfolgte mit spezifischen Primern in einer Realtime PCR. Als Referenzgen wurde die humane ribosomale Untereinheit (36B4) verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. (Student's t-Test ** $p < 0,05$ (AGR2 TG über AGR2 EtOH) *** $p < 0,01$ (AGR2 TM über AGR2 DMSO)).

AGR2 wird durch die Behandlung der Zellen mit Thapsigargin und Tunicamycin verstärkt exprimiert (Abb. 21 A, vgl. Spuren 1 und 2 mit 3 und 4). Dies zeigt sich auch durch die Analyse der Expression auf mRNA Ebene mittels Realtime PCR durch signifikant gesteigerte AGR2 mRNA Mengen nach Behandlung der Zellen mit TM oder TG. Auf Proteinebene aber nicht auf RNA Ebene konnte darüber hinaus eine gesteigerte AGR2 Expression nach Behandlung der Zellen mit der Lösemittelkontrolle DMSO beobachtet werden. D.h. dass DMSO auf einem in dieser Arbeit nicht näher untersuchten weg die Translation von AGR2 zu fördern scheint.

Zusammengefasst bedeutet dies, dass AGR2 in VCaP Prostatakrebszellen unter ER Stressbedingungen vermehrt exprimiert wird.

5.6.1 Ein AGR2 Knock Down hat keinen Effekt auf die ER Stressreaktion

Um die Rolle von AGR2 unter ER Stressbedingungen weiter untersuchen zu können, wurde die Reaktion von VCaP Zellen mit einem AGR2 Knock Down auf die Behandlung mit Tunicamycin und Thapsigargin untersucht. Als Marker für ER Stress wurden GRP78 sowie AGR3 Expressionslevel verwendet, welche beide durch ER Stress verstärkt exprimiert werden (Abb. 21 A). Neben der Untersuchung möglicher Veränderungen der GRP78 Level in AGR2 Knock Down Zellen unter Stressbedingungen, wurde auch der Einfluss eines AGR2 Knock Downs auf basale GRP78 Level in ungestressten Zellen untersucht. Erhöhte GRP78 Level sowie gesteigerte Sensitivität auf ER Stress durch AGR2 Knock Down konnten für das AGR2 Maushomolog und im Zervixkarzinomzellen bereits gezeigt werden (Higa et al. 2011, Zhao et al. 2010).

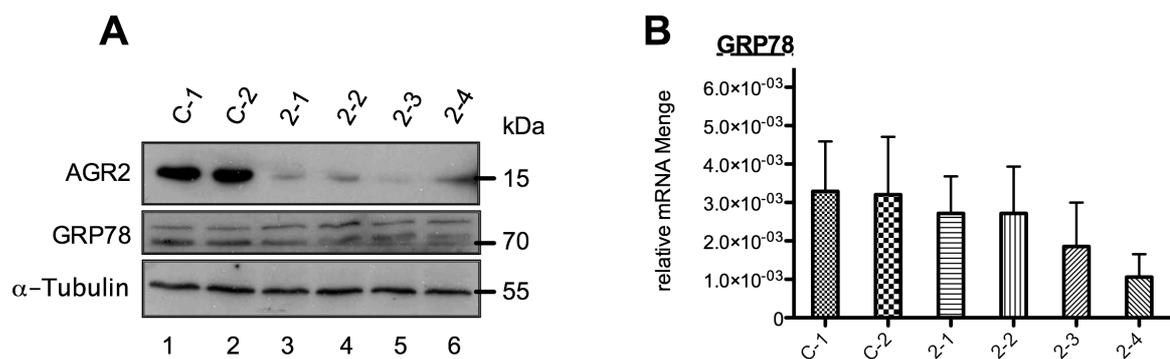


Abb. 22: Untersuchung des Effekts eines AGR2 Knock Downs auf basalen ER Stress über die Bestimmung von GRP78. Verwendet wurden VCaP AGR2 Knock Down Klone (Kontrollklone C-1, C-2; AGR2 Knock Down Klone 2-2 bis 2-4) **A** Western Blot Analyse der Expression von AGR2, GRP78 und α -Tubulin (als Ladekontrolle) über spezifische Antikörper im Lysat von VCaP AGR2 Knock Down Klonen **B** Nachweis der GRP78 Expression in VCaP AGR2 Knock Down Klonen mittels Realtime PCR. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung der relativen mRNA Menge aus drei unabhängigen Experimenten. Als Referenzgen wurde die humane ribosomale Untereinheit (36B4) verwendet.

Die Western Blot Analyse zeigt, dass sich die GRP78 Proteinlevel nach AGR2 Knock Down nicht ändern (Abb. 22 A; vgl. Spuren 1 und 2 (C-1, C-2 Kontrollklone) mit Spuren 3 bis 6 (2-1 bis 2-4 AGR2 Knock Down Klone)). Gleiches zeigt die Untersuchung der GRP78 mRNA Level mit Realtime PCR, in der sich im Mittel keine signifikanten Unterschiede zwischen der GRP78 Expression der Kontrollklone und der AGR2 Knock

Down Klone nachweisen lassen (Abb. 22 B). Dies deutet darauf hin, dass ein AGR2 Knock Down keinen Einfluss auf basale GRP78 Level und somit keinen Effekt auf basalen ER Stress hat.

Neben dem Einfluss eines AGR2 Knock Downs auf basalen Stress (Abb. 22) wurde der Einfluss dieses Knock Downs auf GRP78 und AGR3 mRNA und Proteinlevel unter ER Stressbedingungen durch Tunicamycin- oder Thapsigarginbehandlung untersucht. Dazu wurden die zwei Kontroll- (C-1 und C-2) und vier AGR2 Knock Down (2-1, 2-2, 2-3, 2-4) VCaP Klone für 16 Stunden mit Tunicamycin oder Thapsigargin bzw. der jeweiligen Lösemittelkontrolle (DMSO bzw. EtOH) behandelt und anschließend die Zellen lysiert oder die mRNA isoliert. Die Lysate wurde zur Western Blot Analyse, die mRNA zur cDNA Synthese und anschließender Realtime PCR verwendet.

Die Western Blot Analyse zeigt den erfolgten AGR2 Knock Down (Abb. 23 B, vgl. Spuren 1-8 mit 9-24). Auch auf mRNA Ebene zeigt sich eine signifikant verringerte AGR2 Expression in den Knock Down (KD) Klonen (Abb. 23 A). Eine Behandlung der Zellen mit TM und TG führt in den Kontrollklonen in Übereinstimmung mit den in normalen VCaP Zellen gewonnenen Daten (Abb 21) zu einer signifikant verstärkten AGR2 Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA Ebene (Abb. 23 A und B, Kontrolle bzw. C-1 und C-2). In den AGR2 Knock Down Klonen führt die Behandlung auf mRNA Ebene ebenfalls zu einer sigifikant gesteigerten AGR2 Expression, allerdings bleiben die AGR2 mRNA Mengen dabei signifikant kleiner als in den Kontrollklonen (Abb. 23 A). Auf Proteinebene zeigt sich keine Veränderung der AGR2 Expression nach Induktion von ER Stress (Abb. 23 B, vgl. Spuren 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22 mit 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24), was sich durch den lentiviralen shRNA Knock Down erklären lässt.

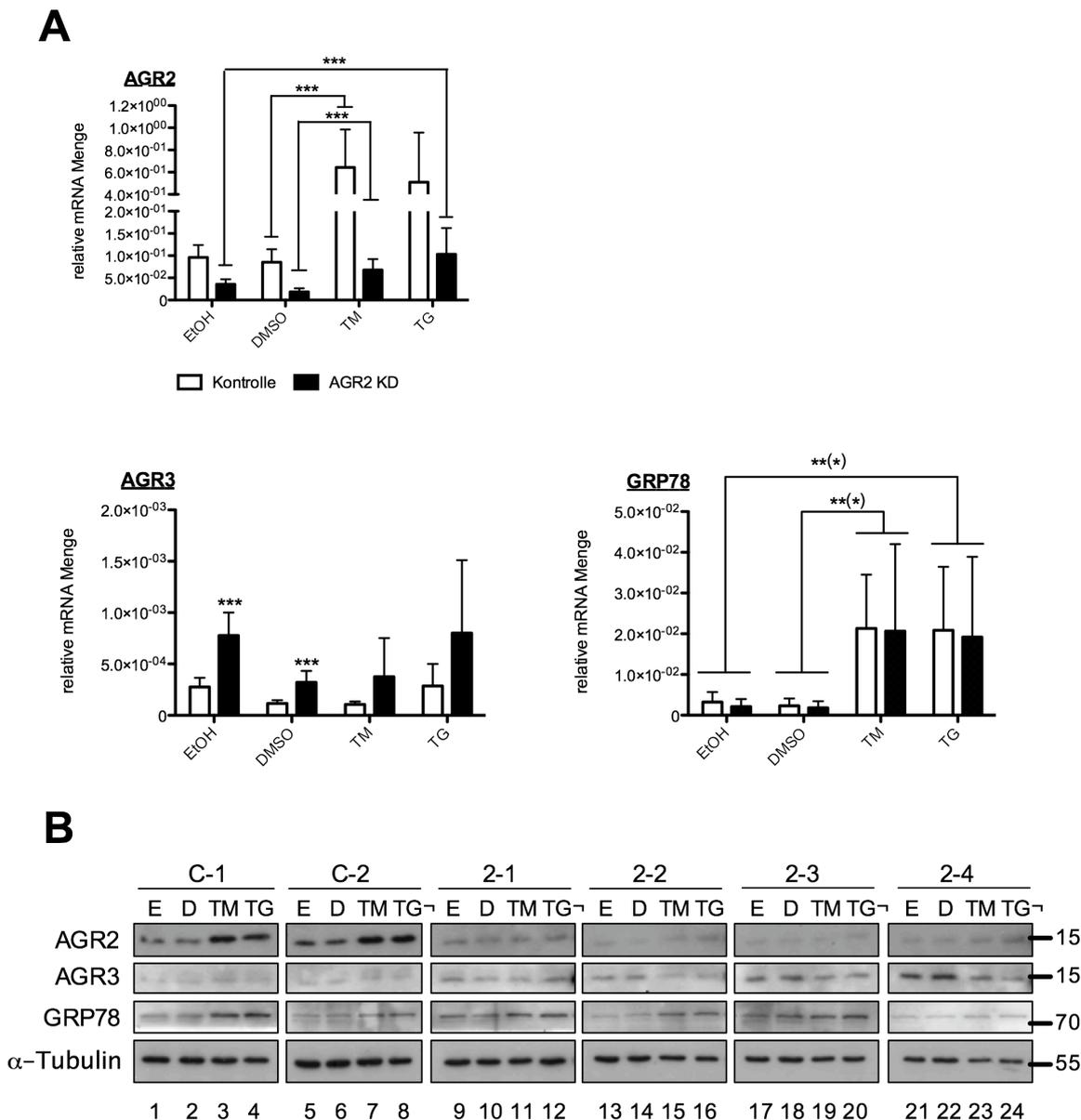


Abb. 23: AGR2, AGR3 und GRP78 Proteinlevel und mRNA Mengen in VCaP Kontroll- (C-1, C-2) und AGR2 Knock Down Klonen (2-1, 2-2, 2-3, 2-4) nach Induktion von ER Stress durch Behandlung mit Tunicamycin oder Thapsigargin. 0,25 × 10⁶ wurden für 16 Stunden mit 10 µg/ml Tunicamycin (TM), 300 nM Thapsigargin (TG) oder den entsprechenden Lösemittelkontrollen (EtOH, DMSO) behandelt. Anschließend wurde die mRNA der Zellen in einer Real Time PCR mit spezifischen Primern und die Lysate der Zellen mittels Western Blot und spezifischen Antikörpern auf die Expression von AGR2, AGR3 und GRP78 untersucht. **A** Relative mRNA Mengen von AGR2, AGR3 und GRP78 in Kontroll-Klonen (Kontrolle) und AGR Knock Down Klonen (AGR2 KD) nach ER Stressinduktion mit TM und TG. Als Referenzgen wurde die humane ribosomale Untereinheit (36B4) verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. (Student's t-Test ** p<0,05; *** p<0,01). **B** Western Blot Analyse der Expression von AGR2, AGR3 und GRP78 in Kontroll-Klonen (C-1, C-2) und AGR2 Knock Down Klonen (2-1 bis 2-4) nach Behandlung mit TM oder TG. α-Tubulin dient als Ladekontrolle.

In Übereinstimmung mit der beobachteten inversen Korrelation der AGR2 und AGR3 Expression (Abb. 19) steigt die AGR3 Expression in den AGR2 Knock Down Klonen im Vergleich zu den Kontrollklonen auf Protein- und auch auf mRNA-Ebene an (Abb. 23 A, B vgl. Spuren 1-8 mit 9-24). In mit der Lösemittelkontrolle behandelten Zellen ist dieser unterschied auf mRNA Ebene signifikant, bei mit Tunicamycin oder Thapsigargin behandelten Zellen nicht. Die Behandlung mit TM oder TG führt weder in den Kontrollklonen noch den AGR2 Knock Down Klonen zu signifikant veränderter AGR3 Expression. Dies gilt für Protein- und mRNA Ebene (Abb. 23 A, B vgl. Spuren 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22 mit 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24). Die AGR3 Expression scheint also in VCaP Zellen durch ER Stress nicht reguliert zu werden, sowohl bei normalen als auch bei verringerten AGR2 Leveln. Das heißt es scheint zu keiner Kompensation der verminderten AGR2 Expression unter ER Stress durch AGR3 zu kommen.

Die GRP78 Protein- und mRNA-Mengen verändern sich durch einen AGR2 Knock Down in unbehandelten Zellen nicht, was die zuvor gemachten Beobachtungen (Abb. 22) bestätigt (Abb. 23 A, B vgl. Spuren 1, 2, 5, 6 mit 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21, 22). Die Induktion mit TM und TG führt in den Kontroll- und in den AGR2 Knock Down Klonen zu einer signifikanten Induktion der GRP78 Expression (Abb. 23 A, B). Die Veränderung der mRNA Mengen durch TM und TG ist in Kontroll- und Knock Down Klonen signifikant. Dabei gibt es keine Unterschiede in der GRP78 Induktion in An- oder Abwesenheit von AGR2 (Abb. 24 A).

Ein AGR2 Knock Down scheint die Reaktion der Zellen auf die ER Stressinduktoren Tunicamycin und Thapsigargin also nicht zu beeinflussen, d.h. verminderte AGR2 Level führen in Prostatakrebszellen zu keiner erhöhten Sensitivität auf ER Stress. Ob ein AGR2 Knock Down die Viabilität von Prostatakrebszellen unter ER Stressbedingungen beeinflusst, wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Dies ist aber nicht auszuschließen, da ein negativer Effekt verringerter AGR2 Level auf die Viabilität von Zellen in Zervixarzinomzellen bereits gezeigt werden konnte (Higa et al. 2011).

6. Diskussion

Das humane Anterior Gradient 2 (AGR2) Protein ist ein ER-residentes Mitglied der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen und wird in Prostatakrebs überexprimiert. Die Eigenschaft, dass es sich bei AGR2 um ein von den Zellen sekretiertes Protein handelt (Park et al 2011, Zhang et al 2005) macht es auch als Marker für das Prostatakarzinom interessant. Allerdings ist die Nutzung des Proteins als solches nur begrenzt möglich, da AGR2 auch in anderen Karzinomen überexprimiert und sekretiert wird (Park et al 2011, Ramachandran et al 2008, Wang et al 2008). Als Alternative zum Nachweis des AGR2 Protein kommt AGR2 mRNA in Frage, die in Urinsediment von Prostatakrebspatienten bereits nachgewiesen werden konnte (Bu et al 2011). Zur möglichen Erhöhung der Prostata(krebs)spezifität wurde das Vorkommen von AGR2 mRNA Spleißvarianten in Zelllinien und Prostatakrebsgewebeproben untersucht.

Neben der Optimierung der Nutzung von AGR2 mRNA als Prostatakrebsmarker war die Bestimmung der Rolle von AGR2 bei der Progression von Prostatakrebs ein Ziel dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang wurde der Effekt einer AGR2 Überexpression auf Prostatakrebszellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass erhöhte AGR2 Level zu einer verringerten Proliferation durch einen G2/M Arrest bei gleichzeitig gesteigerter Invasivität und verbesserten migratorischen Fähigkeiten der Zellen führen. Die Verringerung der Proliferation zeigte sich in Xenograft Tumormodellen in Mäusen in einem erheblich verringerten Tumorwachstum. Auch ein AGR2 Knock Down führte zu verringerter Proliferation der Zellen, was durch einen G0/G1 Zellzyklusarrest verursacht wurde. Eine weitere Charakterisierung des AGR2 Knock Downs zeigte außerdem eine inverse Korrelation der AGR2 Expression mit der Expression des homologen Proteins AGR3.

6.1 AGR2 Spleißvarianten als mögliche Marker für das Prostatakarzinom

Die Früherkennung des Prostatakarzinoms erfolgt unter anderem durch den Nachweis von Markern im Blut von Patienten. Im Zusammenhang mit der Möglichkeit Marker auch im Urin von Patienten nachzuweisen, wird die Nutzung von AGR2 als Marker untersucht (Bu et al 2011, Wayner et al 2011). AGR2 mRNA konnte bereits im Urinsediment von Patienten nachgewiesen werden, die Mengen waren dabei in Männern mit einem Prostatakarzinom signifikant höher als in Patienten ohne bösartige Veränderungen der Prostata (Bu et al 2011). Der Nachweis von Prostatakrebsmarkern im Urin bietet den Vorteil, dass die Proben nicht-invasiv gewonnen werden können. Die Detektion von Proteinen oder mRNAs in Urin wird daher schon für verschiedene Proteine bzw. mRNAs, wie zum Beispiel der nicht für ein Protein kodierenden PCA3 (Prostate Cancer Antigen 3) mRNA, untersucht (Bai et al 2007, Bourdoumis et al 2010, Hessels et al 2003).

Da AGR2 neben Prostatakrebs auch in anderen Karzinomen überexprimiert und die Nutzung als Marker für diese Karzinome ebenfalls untersucht wird (Chen et al 2010, da Costa et al 2011, Edgell et al 2010, Marin-Aguilera et al 2012, Valladares-Ayerbes et al 2008), ist das AGR2 Protein als Marker für das Prostatakarzinom nur eingeschränkt nutzbar. Der bereits beschriebene Nachweis von AGR2 mRNA im Urinsediment von Prostatakrebspatienten stellt eine Alternative zur Nutzung des Proteins dar (Bu et al 2011). Da sowohl im Leberkarzinom als auch in Prostatakrebs das Vorhandensein von AGR2 Spleißvarianten beschrieben und eine dieser Varianten, das sogenannte kurze AGR2 Transkript, bereits für die Unterscheidung verschiedener Krebsarten beschrieben wurde (Bu et al 2011, Vivekanandan et al 2009, Zhang et al 2005, Zheng et al 2006), wurde die mRNA verschiedener (Karzinom-)Zelllinien auf das Vorkommen von AGR2 Spleißvarianten hin untersucht. Mögliche prostata- oder sogar prostatakrebspezifische AGR2 Spleißvarianten können zur Optimierung der Verwendung von AGR2 als Prostatakrebsmarker beitragen.

In dieser Arbeit konnten sechs AGR2 Spleißvarianten identifiziert werden (SV C bis SV H). Zwei weitere Spleißvarianten (SV A und SV B) umfassten die bereits beschriebenen Spleißvarianten von AGR2 in Prostatakrebs, das sog. lange und kurze Transkript (Zhang et al 2005, Zheng et al 2006). Die meisten der identifizierten

Spleißvarianten wurden neben Prostatakrebszellen auch in Zellen aus anderen Geweben exprimiert und zeigen somit keine Prostataspezifität. Die Untersuchung der Expression der Spleißvarianten in mRNA Proben aus Prostatakrebsgewebe zeigte allerdings einen Trend der Varianten F und H hin zu verstärkter Expression in Prostatakrebsgewebe im Vergleich zu benignem Gewebe. Dies deutet darauf hin, dass sie eventuell zwar nicht prostataspezifisch sind, ihre Überexpression aber krebsspezifisch sein kann. Für solche Spleißvarianten käme eine Nutzung in Kombination mit PSA, also vor dem Hintergrund eines prostata-spezifischen Proteins, in Frage. Für die Nutzung der Wildtyp AGR2 mRNA konnte eine solche Kombination bereits als sensitiver als die Nutzung von PSA alleine beschrieben werden (Bu et al 2011).

Eine der identifizierten Spleißvarianten (SV C) konnte bei den untersuchten Zelllinien nur in Prostatakrebszelllinien nachgewiesen werden, mit Ausnahme einer kaum detektierbaren mRNA Menge in T47D Brustkrebszellen. Die Expression dieser Spleißvariante in mRNA Proben aus Prostatagewebe von Prostatakrebspatienten zeigt einen leichten, allerdings nicht signifikanten Trend hin zu gesteigerter Expression in späten Krebsstadien. Um eine genaue Aussage über die Expression dieser Spleißvariante treffen zu können, muss eine größere Probenzahl untersucht werden. Dennoch scheint Spleißvariante C der vielversprechendste Kandidat unter den identifizierten Spleißvarianten in Bezug auf die Prostataspezifität zu sein.

6.2 AGR2 in Prostatakrebs – eine Rolle bei der Metastasierung?

6.2.1 AGR2 verringert die Zahl der Kolonien in einem Koloniebildungsassay

Um einen ersten Hinweis auf die Rolle von AGR2 in Prostatakrebszellen zu bekommen wurden Koloniebildungsassays durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine AGR2 Überexpression zu einer verminderten Kolonienzahl in verschiedenen Prostatakrebszelllinien führt. Dies kann vermindertes Zellwachstum zur Ursache haben, allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass die verminderte Kolonienzahl durch ein Ablösen der Zellen von der Kulturschale zustande kommt. Ein positiver Effekt von AGR2 auf das anheftungsunabhängige Wachstum von Zellen konnte bereits in verschiedenen Studien für andere Karzinome gezeigt werden (Vanderlaag et al 2010, Wang et al 2008).

Die zusätzlichen Beobachtungen, dass AGR2 die Proliferation von Zellen zwar negativ beeinflusst, die Invasivität und Migration aber steigert, weisen darauf hin, dass das Protein vermutlich eine Rolle bei der Metastasierung von Tumoren spielt. Deswegen besteht die Chance, dass es tatsächlich zu einer Ablösung der Zellen von der Kulturschale nach AGR2 Überexpression kommt und das dies zusammen mit der durch AGR2 Überexpression verringerten Proliferation zur beobachteten geringeren Kolonienzahl in den Koloniebildungsassays beiträgt.

Koloniebildungsassays mit AGR2 mit einer Mutation im PDI Motiv, welches das Protein der Chaperon-Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen zuordnet, oder im KTEL Motiv, welches zur ER Lokalisation führt, zeigten ebenfalls eine leichte, allerdings nicht signifikante Verringerung der Kolonienzahl. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die vermutete Funktion von AGR2 als PDI (Higa et al 2011) als auch die Lokalisation im ER, welche durch Mutation des KTEL Motivs aufgehoben wird, eine wichtige Rolle bei der Funktion des Proteins in Prostatakrebszellen spielen. Die intrazelluläre Lokalisation von AGR2 scheint dabei von größerer Bedeutung zu sein, da der negative Effekt auf die Kolonienzahl bei der KTEL Mutante weniger ausgeprägt war, als bei der PDI Mutante des Proteins. Ob diese beiden Mutationen jeweils das Zellwachstum oder die Adhäsion von Zellen beeinflussen, wurde nicht untersucht.

6.2.2 AGR2 verringert die Proliferation und induziert Migration und Invasion

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle, welche AGR2 bei der Entstehung und Weiterentwicklung von Prostatakrebs spielen könnte, wurde der Einfluss des Proteins auf die Proliferation, Migration und auf die Invasivität von Prostatakrebszellen untersucht. Dafür wurden Zellen verwendet, die stabil mit einem für AGR2 kodierenden Expressionsvektor oder dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurden.

Die Untersuchung der Proliferationsrate dieser Zellen zeigte, dass die Überexpression von AGR2 zu einer signifikant verringerten Proliferation führt. Gleichzeitig hatte AGR2 einen positiven Effekt auf die migratorischen und invasiven Fähigkeiten von Zellen. Für einen Knock Down von AGR2 konnte im Gegensatz dazu ein negativer Effekt auf die Migration und Invasion der Zellen beobachtet werden (Bu et al 2011). Diese Ergebnisse lassen zusammen mit der Beobachtung, dass eine Überexpression von AGR2 in Tumore

einer Ratten Mammazelllinie zur vermehrten Bildung von Metastasen führt (Liu et al 2005), den Schluss zu, dass AGR2 eine Rolle bei der Bildung von Metastasen, genauer in der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) spielen könnte. Die EMT ist ein Vorgang, der in der Embryogenese, wie z.B. bei der Gastrulation oder der Migration der Neuralleistenzellen beobachtet werden kann, der aber auch eine Rolle bei der Metastasierung von Tumoren epithelialer Gewebe spielt (Geiger und Peeper 2009). Während diesem Vorgang entwickeln ursprünglich epitheliale Zellen einen mesenchymalen Phänotyp. Dies geht einher mit dem Verlust der Zellpolarität und der verringerten Expression epithelialer Proteine wie E-Cadherin, Occludin und Cateninen. Im Gegenzug wird die Expression mesenchymaler Proteine wie N-Cadherin und Vimentin induziert. Durch diese Veränderungen erhalten die Zellen die Fähigkeiten zur Migration und Invasion (Geiger und Peeper 2009, Thiery und Sleeman 2006). EMT Vorgänge sind in der Entwicklung aber auch während der Metastasenbildung häufig mit reduzierter Proliferation verknüpft. Dies scheint für die Reorganisation des Zytoskeletts während der EMT notwendig zu sein (Barrallo-Gimeno und Nieto 2005, Evdokimova et al. 2009).

Ein Protein, welches eine Rolle bei der Reaktivierung von EMT Programmen während der Metastasierung von Tumoren spielt ist das auch in Prostatakrebs überexprimierte Y-Box Bindeprotein 1 (YB-1) (Evdokimova et al 2009, Gimenez-Bonafe et al 2004). Eine Überexpression dieses Protein in Brustkrebszellen führt, ähnlich wie es für AGR2 in Prostatakrebszellen in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zu verminderter Proliferation und zu gesteigerter Migration der Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass YB-1 Epithelial-mesenchymalen Transition auslöst, unter anderem durch die translationale Aktivierung von Snail1 mRNA und die gesteigerte Expression von weiteren an der EMT beteiligten Genen wie Twist1 und ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2) (Evdokimova et al 2009). Für Snail1 konnte ebenfalls ein negativer Einfluss auf die Proliferation von Zellen in der EMT beschrieben werden (Barrallo-Gimeno und Nieto 2005). Der negative Einfluss von YB-1 auf die Proliferation wird durch die verminderte Expression von mit dem Zellzyklus assoziierten Proteinen wie unter anderem Cyclin B1 (Evdokimova et al 2009) ausgelöst. Auch die Überexpression von AGR2 hat einen negativen Effekt auf die Expression von Cyclin B1, was zusammen mit dem negativen Einfluss auf cdc2 Proteinlevel wahrscheinlich die Ursache für die beobachtete verringerte Proliferation durch AGR2 ist.

Die Erklärung für die zunächst widersprüchliche Beobachtung, dass ein in einem Karzinom überexprimiertes Protein entgegen den Erwartungen das Wachstum von Tumoren hemmt, scheint also darin zu liegen, dass AGR2 einen invasiven und motilen Phänotyp gegenüber dem Zellwachstum bzw. der Proliferation fördert. Ob und wie AGR2 dabei EMT induziert bzw. positiv beeinflusst kann über die veränderte Expression von entsprechenden an der EMT beteiligten Proteinen wie E-Cadherin und N-Cadherin bzw. Vimentin nach AGR2 Überexpression bzw. Knock Down nachgewiesen werden.

Neben einem negativen Effekt der AGR2 Überexpression auf die Proliferation von Zellen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch ein Knock Down des Proteins zu einer verminderten Proliferation führt. Dies deutet darauf hin, dass AGR2 in engen Proteinkonzentrationsgrenzen agiert. In diesem Zusammenhang spielen vermutlich auch andere Veränderungen der Genexpression in Prostatakrebszellen im Vergleich zu Zellen aus normalem Prostatagewebe, besonders mögliche Interaktionspartner und die AGR2 Expression regulierende Proteine eine Rolle. Die Diskrepanz zu Untersuchungen von AGR2 in Eierstockkrebs, in welchen AGR2 Überexpression einen positiven Effekt auf die Poliferation von Zellen hatte (Park et al 2011), lassen sich durch gewebespezifische Unterschiede erklären.

6.2.3 Die Inhibierung der Proliferation durch AGR2 geschieht über einen G2/M und/ oder einen G1/G0 Zellzyklusarrest

Zur näheren Analyse des negativen Einflusses der AGR2 Überexpression und des AGR2 Knock Downs auf die Proliferation von Prostatakrebszellen wurde das Zellzyklusprofil der Überexpressions- und Knock Down Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine AGR2 Überexpression zu einem G2/M Arrest führt, welcher durch verringerte Cyclin B1 und cdc2 Level hervorgerufen wird. Die verringerten cdc2 Level erklären auch die gleichzeitig beobachtete Verringerung der inhibierenden Phosphorylierung von cdc2 an Tyrosin 15, was normalerweise einen positiven Effekt auf die Progression des Zellzyklus hat. Der Knock Down der AGR2 Expression führte zu einem G0/G1 Arrest, die molekularen Ursachen hierfür, genauer die Expression bzw. Phosphorylierung der an dieser Phase des Zellzyklus beteiligten Proteine, wurden in

dieser Arbeit nicht untersucht. Die gleichzeitig verringerte Zahl der Zellen in der G2/M Phase nach AGR2 Knock Down unterstützt die gezeigten Effekte der AGR2 Überexpression.

Veränderte AGR2 Expressionslevel scheinen also den Zellzyklus von Prostatakrebszellen zu beeinflussen. Die Untersuchung der Expression weiterer am Zellzyklus Cycline und Cyclin-abhängiger Kinasen kann Auskunft darüber geben, wie der Einfluss von AGR2 auf den Zyklus zustande kommt.

6.2.4 AGR2 Überexpression führt zu verminderter Tumorgröße in *in vivo* Xenograft Tumormodellen

Um den beobachteten negativen Effekt von AGR2 auf die Proliferation und die positiven Effekte auf Migration und Invasion auch *in vivo* auf Tumorebene untersuchen zu können, wurden AGR2 überexprimierende 22Rv.1 Klone bzw. entsprechende Kontrollklone in einem Xenograft Experiment subkutan in die Flanke von athymischen Nacktmäusen injiziert. Die Überwachung des Wachstums der so gebildeten Tumore über einen Zeitraum von sieben Wochen hat gezeigt, dass die Tumore der AGR2 überexprimierenden Klone im Vergleich zu den Kontrollklonen kaum an Volumen zunahmten. Ein Effekt auf die drainierenden Lymphknoten, deren Vergrößerung auf die Metastasierung des Primärtumors hinweisen kann, wurde nicht beobachtet.

Diese Beobachtungen scheinen zunächst auf einen negativen Effekt von AGR2 auf Tumorwachstum hinzuweisen. Aufgrund der Ergebnisse, dass AGR2 einen positiven Effekt auf die Invasion und Migration von Zellen hat, kann aber auch verstärkte Metastasierung eine Ursache für die geringere Größe der Primärtumore sein. In einer Ratten Mammazelllinie konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von AGR2 bei den durch Injektion der Zellen in Ratten gebildeten Tumoren zu einer größeren Zahl von Metastasen als bei den Tumoren entsprechender Kontrollzellen, die einen nicht metastasierenden Phänotyp zeigen, führt (Liu et al 2005). In diesem Fall zeigten die Primärtumore allerdings keine Unterschiede in ihrer Größe (Liu et al 2005). Dieser Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeit beruht vermutlich auf gewebespezifischen Unterschieden oder aber an der unterschiedlichen Intensität der AGR2 Überexpression. Dafür sprechen die gemachten Vermutungen, dass AGR2 in engen

Proteinkonzentrationsgrenzen agiert bzw. je nach Expressionslevel unterschiedliche Effekte auf Prostatakrebszellen zu haben scheint.

Die Tatsache, dass sich in dieser Arbeit an den drainierenden Lymphknoten keine Veränderung zeigten, die auf eine Metastasierung der Tumore hinweisen könnten, beruht vermutlich auf dem kurzen Zeitraum des Experiments von sieben Wochen. Da einige Tumore der Kontrollklone das tierschutzrechtliche Maximum der Tumorgröße (1000mm³) innerhalb des Untersuchungszeitraums von sieben Wochen erreicht haben, wurde das Experiment an dieser Stelle abgebrochen. Die AGR2 Primärtumore hatten zu diesem Zeitpunkt ein deutlich geringeres Volumen. Durch den negativen Einfluss von AGR2 auf die Proliferation von Zellen sind eventuelle Mikrometastasen für die hier gewählte indirekte Nachweismethode vermutlich zu klein. Bei einer zeitlich längeren Durchführung des Experiments, d.h. also bei größeren AGR2 Primärtumoren, ist die Wahrscheinlichkeit aufgrund der durch AGR2 gesteigerten Invasion und Migration groß, dass vermehrte Metastasenbildung beobachtet werden kann.

6.2.5 AGR2 wird in späten Prostatakrebsstadien weniger stark exprimiert als in frühen Stadien

Bei der Untersuchung der Expression von AGR2 in Proben aus normalem humanen Prostatagewebe und Proben aus niedrigen und hohen Gleason Stadien des Karzinoms konnte festgestellt werden, dass die Expression in frühen Krebsstadien im Vergleich zu benignem Gewebe ansteigt und in späteren Stadien wieder leicht sinkt. Metastasen an drainierenden Lymphknoten zeigen mit dem Primärtumor vergleichbare AGR2 Expression, Metastasen in Knochen zeigen eine geringere Expression als der Primärtumor (Bu et al 2011). Studien zur Prognose von Prostatakrebspatienten konnten zeigen, dass niedrige AGR2 Level in späten Krebsstadien mit einer größeren Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens der Krankheit assoziiert sind (Maresh et al 2010).

Diese Beobachtungen können, zusammen mit der Feststellung, dass AGR2 die Proliferation von Prostatakrebszellen herabsetzt, auf einen möglichen Zusammenhang zwischen AGR2 und Tumor- bzw. Zell-Dormanz hinweisen. Dormanz von Krebs wird im Allgemeinen als das Wiederauftreten eines Karzinoms einige Zeit nachdem der Patient

klinisch als geheilt galt, definiert (Uhr und Pantel 2011). Diese Dormanz kann dabei in primären sowie sekundären Tumoren auftreten (Almog 2010). Es wird vermutet, dass das Wiederauftreten des Karzinoms auf zirkulierenden Tumorzellen beruht, von welchen ein Teil in anderen Geweben, wie zum Beispiel dem Knochenmark lokalisiert (Uhr und Pantel 2011). Die Dissemination einzelner Tumorzellen kann bereits in frühen Stadien des Tumorwachstums auftreten (Almog 2010). Ein Teil dieser Zellen zeigt verminderte Proliferation durch einen Zellzyklusarrest und ist vermehrt resistent gegen Chemotherapeutika. Im weiteren Verlauf beginnt ein Teil dieser dormanten Zellen wieder zu proliferieren und führt so zur Bildung von Mikrometastasen (Uhr und Pantel 2011). Für eine Rolle von AGR2 bei diesem Prozess spricht der in dieser Arbeit gezeigte negative Effekt von AGR2 auf die Proliferation durch einen G2/M Zellzyklusarrest. Andere Studien haben bereits gezeigt, dass AGR2 zur Resistenz von Zellen gegen Chemotherapeutika beiträgt (Hrstka et al 2010, Ramachandran et al 2008). Darüber hinaus konnte AGR2 auch in zirkulierenden Tumorzellen nachgewiesen werden (Valladares-Ayerbes et al 2008).

Eine mögliche molekulare Verbindung zwischen AGR2 und Dormanz können ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) und p38 bzw. das Verhältnis dieser beiden Proteine sein. p38 konnte als einer der Hauptfaktoren in der Entwicklung von Tumorzell dormanz identifiziert werden (Ranganathan et al 2006). Besonders das Expressionsverhältnis zwischen p38 und ERK1/2 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen: Niedrige ERK1/2 und hohe p38 Level wurden mit dormanten Zellen assoziiert, während umgekehrt hohe ERK1/2 und niedrige p38 Level mit der Proliferation von Tumorzellen korrelieren (Sosa et al 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass AGR2 Expression unter zellulären Stressbedingungen wie ER Stress über einen p38 Signalweg aktiviert wird (Huajie Bu, Innsbruck, PhD Thesis (online)). Ebenso konnte gezeigt werden, dass ERK1/2 Inhibitoren die Induktion der AGR2 Expression durch physiologischen Stress wie Hypoxie und geringe Serumkonzentrationen blockieren können (Zweitig et al 2007), was bedeutet, dass auch ERK1/2 positive Regulatoren der AGR2 Expression sind. In wieweit die Regulation von AGR2 durch p38 und ERK1/2 und das Verhältnis dieser beiden Proteine zueinander in Prostatakrebs eine Rolle spielen, muss noch gezeigt werden.

Gegen eine Rolle von AGR2 in der Dormanz von Tumoren spricht, dass Angiogenese bzw. der sogenannte „angiogenic switch“, d.h. die Entwicklung eines nicht-angiogenen

zu einem angiogenen Tumor, häufig mit der Aufhebung der Dormanz in Verbindung gebracht wird (Almog 2010). Tumormodelle von AGR2 überexprimierenden Ratten Mammazellen haben gezeigt, dass die gebildeten Primärtumore zwar kleiner als Tumore von Kontrollzellen waren, gleichzeitig aber eine besser ausgeprägte Vaskularisierung zeigten (Liu et al 2005).

6.2.6 ER Stress führt zu gesteigerter AGR2 Expression

Neben einem N-terminalen Signalpeptid, welches zur Sekretion des AGR2 Proteins beiträgt, finden sich in der Aminosäuresequenz von AGR2 zwei weitere Motive, die Hinweise auf die mögliche Funktion geben. Dies ist zum einen ein C-terminales KTEL Motiv, welches von Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum erkannt werden kann und dadurch zur Lokalisation des Proteins im ER führt (Lewis and Pelham 1990). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AGR2 im Endoplasmatischen Retikulum von Prostatakrebszellen lokalisiert ist und dass diese Lokalisation durch Entfernen des KTEL Motivs aufgehoben werden kann. Bei dem zweiten Motiv handelt es sich um ein zentrales CXXS Motiv, welches AGR2 der Familie der Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI), einer Familie von ER-Chaperonen, zuordnet (Persson et al 2005).

Aufgrund der ER-Lokalisation und der Zugehörigkeit zu einer Proteinfamilie, die an der Faltung von Proteinen beteiligt ist, besteht die Möglichkeit, dass AGR2 eine Rolle in der Unfolded Protein Response (UPR) spielt, einer Reaktion der Zelle auf ER Stress, ausgelöst durch die Ansammlung ungefalteter Proteine im Lumen des ER (Lai et al 2007). Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass AGR2 unter ER Stressbedingungen, ausgelöst durch die Behandlung von Prostatakrebszellen mit Tunicamycin oder Thapsigargin, verstärkt exprimiert wird. In Zervix- und Leberkarzinomzellen konnte bereits gezeigt werden, dass AGR2 wahrscheinlich eine Rolle als Chaperon in der UPR übernimmt, da es über neu gebildete Proteinketten an Ribosome des rauen ER gekoppelt ist (Higa et al 2011). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass ein AGR2 Knock Down zu gesteigertem basalen ER Stress und zu erhöhter Stresssensibilität der Zellen führt. In Prostatakrebszellen konnte kein Effekt eines AGR2 Knock Downs auf basalen ER Stress, welcher durch Analyse der GRP78 Expressionslevel als Stressmarker nachgewiesen wurde, beobachtet werden.

Ebenso scheint ein AGR2 Knock Down keinen Einfluss auf die Reaktion der Zellen unter ER Stress, ausgelöst durch Tunicamycin oder Thapsigargin, zumindest in Bezug auf die GRP78 Expression, zu haben. Um eine genauere Aussage über die Rolle von AGR2 in der UPR treffen zu können, müssen allerdings weitere Faktoren untersucht werden. Dazu gehört zum Beispiel auch die Untersuchung des Einflusses eines AGR2 Knock Downs auf die Viabilität von Zellen unter ER Stress.

Die beobachtete Regulation der AGR2 Expression durch ER Stress kann über eine mögliche Funktion von AGR2 als Chaperon hinaus auch in Zusammenhang mit der bereits vermuteten Rolle des Protein bei der Epithelial-mesenchymalen Transition stehen. Die EMT konnte bereits mit der Reaktion von Zellen auf ER Stress in Verbindung gebracht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Zellen der Schilddrüse nach Behandlung mit Tunicamycin oder Thapsigargin neben der Aktivierung der UPR Signalwege auch einen EMT Phänotyp zeigen. Dies äußerte sich unter anderem in verringerter E-Cadherin und gesteigerter Vimentin Expression (Ulianich et al 2008). Auch in alveolären Epithelzellen der Lunge konnte durch Behandlung mit Tunicamycin ein EMT Phänotyp induziert werden, der sich ebenfalls durch verminderte E-Cadherin Expression und gesteigerte Vimentin sowie N-Cadherin Proteinlevel zeigte (Tanjore et al 2011). Ob eine solche Verbindung zwischen ER Stress und Epithelial-mesenchymalen Transition auch in Prostatakrebszellen besteht, wurde bisher noch nicht gezeigt. Aufgrund der hier aufgestellten Hypothese, dass AGR2 eine Rolle in der EMT spielt, und der gezeigten positiven Regulation von AGR2 durch zellulären Stress, könnte das Protein ein solches Bindeglied zwischen Stress und EMT in Prostatakrebs sein.

Neben der durch Tunicamycin und Thapsigargin chemisch induzierten UPR konnte eine gesteigerte AGR2 Expression auch durch natürlich auftretende Stressfaktoren wie Hypoxie und unzureichende Versorgung mit Nährstoffen gezeigt werden (Zweitzig et al 2007). Hypoxie wurde ebenfalls bereits mit der EMT in Verbindung gebracht (Jiang et al 2011, Luo et al 2006). Es lässt sich also vermuten, dass AGR2 eventuell als Survival Faktor in Prostatakrebszellen agiert, indem es unter Stressbedingungen das Auswandern von Zellen aus der Primärtumormasse und damit aus den Stressbedingungen heraus fördert oder zumindest daran beteiligt ist.

Auf Basis der bisherigen Punkte ergibt sich daher folgende Hypothese für die Rolle von AGR2 in der Entstehung und Progression von Prostatakrebs:

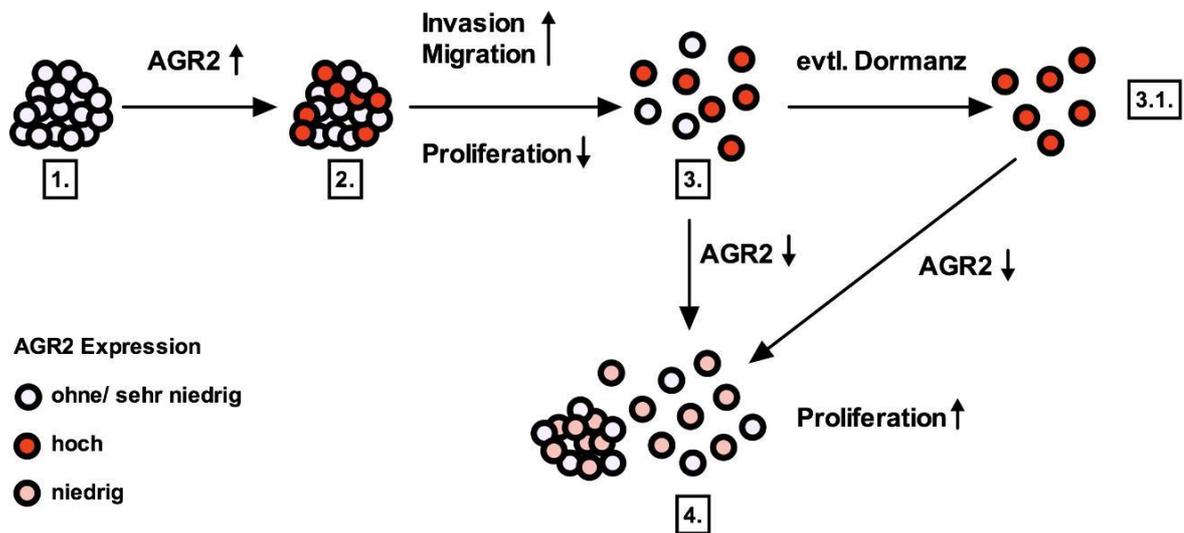


Abb.24: Hypothese zur Rolle von AGR2 bei der Entstehung und Progression von Prostatakrebs. Die Expression steigt im Primärtumor an und sinkt in späteren Tumorstadien wieder ab, was im Zusammenhang mit dem Auswachsen von Mikrometastasen stehen könnte. Detaillierte Beschreibung der vermuteten Vorgänge im Text (Abschnitt 6.2.6).

AGR2 wird in frühen Tumorstadien (Abb. 24 Punkt 2.) im Vergleich zu unverändertem Prostatagewebe (Abb. 24 Punkt 1.) verstärkt exprimiert. Die Steigerung der AGR2 Expression kann dabei z.B. durch im Tumorgewebe vorkommende Stressbedingungen wie Hypoxie, welche zu gesteigerter AGR2 Expression führt (Higa et al 2011, Zweitzig et al 2007), oder durch Veränderungen der Expressionsregulation durch bekannte AGR2 Regulatoren wie dem Androgenrezeptor, p38, ERK1/2 oder der FoxA1/2 Proteine verursacht werden (Bu et al 2011, Zhang et al 2010, Zweitzig et al 2007). Dies führt zu verminderter Proliferation der Zellen und zu gesteigerter Invasivität und Migration. Dadurch kann es zum Auswanderung einzelner Zellen aus dem Tumor kommen (z.B. als zirkulierende Tumorzellen; Abb. Punkt 3.), welche sich anschließend in anderen Geweben ansiedeln können. Wahrscheinlich können sie dort entweder als dormante Zellen verweilen (Abb. 24 Punkt 3.1.) oder direkt Mikrometastasen bilden (Abb. 24 Punkt 4.). Die Bildung der Mikrometastasen steht

vermutlich mit einer Verringerung der AGR2 Expressionslevel im Zusammenhang, durch welche der inhibierende Effekt auf die Proliferation aufgehoben wird.

6.3 AGR2 und AGR3 Expression korrelieren invers

Neben AGR2 wird in Prostatakrebs auch das homologe Protein AGR3 verstärkt exprimiert (Cato und Nestl (online)). Der Nachweis von AGR2 und AGR3 in mRNA Proben aus Prostatagewebe von Prostatakrebspatienten hat gezeigt, dass AGR2 in Proben aus Prostatagewebe, welches einem niedrigen Gleason Score zugeordnet wurde, signifikant im Gegensatz zu normalem Prostatagewebe überexprimiert wird (Bu et al 2011). In späteren Krebsstadien nimmt die Expression wieder ab. Im Gegensatz dazu wird AGR3 zu späteren Krebsstadien hin verstärkt exprimiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine AGR2 Überexpression die Proliferation von Prostatakrebszellen herabsetzt, während unveröffentlichte Arbeiten (Erald Shehu, PhD Student, AG Prof. A. Cato) zeigen konnten, dass eine AGR3 Überexpression die Proliferation positiv beeinflusst.

Aufgrund dieser beiden Beobachtungen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von AGR2 und AGR3 besteht. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein AGR2 Knock Down zu gesteigerter AGR3 Expression führt. Im entsprechend gegensätzlichen Experiment führte ein AGR3 Knock Down zu gesteigerter AGR2 Expression. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Expression beider Proteine eng miteinander verknüpft ist. Gleichzeitig deutet die Analyse der Proliferation bei verschiedenen AGR2 oder AGR3 Proteinleveln darauf hin, dass auch die genauen Expressionslevel bzw. das Verhältnis der Proteine zueinander eine Rolle spielen. So führt ein AGR3 Knock Down zu gesteigerter Proliferation von Prostatakrebszellen (Erald Shehu), obwohl es dabei zu einer gleichzeitigen Erhöhung der AGR2 Expression kommt, für welche ein negativer Einfluss auf die Proliferation gezeigt werden konnte. Umgekehrt führt ein Knock Down von AGR2, welcher zu gesteigerter AGR3 Expression führt, zu einer verringerten Proliferationsrate, statt wie zunächst zu erwarten einer erhöhten Rate.

6.3.1 AGR2 beeinflusst FoxA1 und FoxA2 Proteinlevel

Um zu charakterisieren, welche Faktoren an der beobachteten inversen Korrelation der AGR2 und AGR3 Expression beteiligt sind bzw. sein können, wurden die Level von FoxA1, FoxA2 und dem Androgenrezeptor untersucht. Alle drei wurden bereits mit der Regulation der AGR2 Expression in Verbindung gebracht (Bu et al 2011, Zhang et al 2005, Zhang et al 2010).

Ein AGR2 Knock Down in VCaP Zellen hatte keinen Einfluss auf den kompletten (full-length) Androgenrezeptor (AR). Neben dem full-length Rezeptor konnte im Lysat dieser Zellen eine weitere, kleinere Proteinbande detektiert werden, deren Expression sich in drei der vier Knock Down Klone zu verringern scheint. Eventuell handelt es sich bei dieser Proteinbande um eine AR Spleißvariante, deren Expression bereits in VCaP Zellen beschrieben wurde (Hu et al 2009). Diese 80 kDa große AR Spleißvariante zeichnet sich durch das Fehlen der Ligandenbindedomäne durch alternatives Spleißen von Intronbereichen nach Exon 3 aus (Hu et al 2009). Eine Überexpression von AGR2 in 22Rv.1 Zellen zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf den full-length Androgenrezeptor. Auch die Expression einer in diesen Zellen beschriebenen 80 kDa große AR Spleißvariante, welche durch eine Tandemduplikation von Exon 3 keine Ligandenbindedomäne enthält, wird durch gesteigerte AGR2 Level nicht beeinflusst (Tepper et al 2002, van Bokhoven et al 2003). Veränderte AGR2 Proteinlevel scheinen also keinen Einfluss auf den full-length Androgenrezeptor zu haben, jedoch aber auf eine unter anderem für VCaP Zellen beschriebene Spleißvariante zu haben. Wie AGR2 die veränderte Expression der Spleißvariante beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Untersuchung des Effekts von AGR2 auf FoxA1/2 Proteinlevel hat gezeigt, dass ein Knock Down in VCaP Zellen zu einer verminderten FoxA1 und FoxA2 Expression führt. Auch eine AGR2 Überexpression hatte einen negativen Effekt auf die Expression von FoxA1 und 2. In Prostata- bzw. Prostatakrebsgewebe wird eine gesteigerte Expression von FoxA1 mit frühen PIN Stadien und dem Adenokarzinom der Prostata in Verbindung gebracht. FoxA2 wird verstärkt in primären und metastasierenden Neuroendokrinen Prostatumoren exprimiert (Mirosevich et al 2006). FoxA2 wird besonders auch mit der Entstehung des androgen-unabhängigen bzw. kastrations-resistenten Stadiums des Prostatakarzinoms in Verbindung gebracht, da FoxA2 die

Expression von androgenregulierten Genen sowohl unabhängig von einem Liganden als auch unabhängig vom Androgenrezeptor selber aktivieren kann (Mirosevich et al 2006). In Pankreaskrebs konnte gezeigt werden, dass FoxA2 den E-Cadherin Promotor aktivieren kann und dass eine verminderte Expression von FoxA1 und FoxA2 für die EMT notwendig ist (Song et al 2010). Ob die FoxA1/2 Proteine eine ähnliche Rolle in Prostatakrebs spielen, ist nicht bekannt. Gegen eine solche Rolle von FoxA1/2 in der EMT im Prostatakarzinom spricht, dass eine gesteigerte Expression von FoxA2 mit metastasierenden Tumorstadien assoziiert ist (Mirosevich et al 2006). In Lungenkrebs und im Schilddrüsenkarzinom konnte gezeigt werden, dass FoxA2 Überexpression zu reduzierter Proliferation führt (Akagi et al 2008, Halmos et al 2004), welche in Lungenkrebs durch einen G2/M Zellzyklusarrest verursacht wird. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, dass auch eine Überexpression des FoxA2 regulierten AGR2 zu verminderter Proliferation durch einen G2/M Arrest führt.

Es lässt sich vermuten, dass eine wechselseitige Regulation der Expression von AGR2 und FoxA1/2 stattfindet. Es ist bekannt, dass FoxA1/2 die Expression von AGR2 positiv beeinflussen, eventuell kann AGR2 anschließend selber die Expression von FoxA1/2 in einem negativen Feedback beeinflussen. Ob AGR2 die Expression von FoxA1/2 auf transkriptionaler oder translationaler Ebene beeinflusst, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Auf transkriptionaler Ebene könnte die FoxA1/2 Expression durch einen Einfluss von AGR2 auf die Hypermethylierung des FoxA1/2 Promotors, eventuell über mögliche AGR2 Interaktionspartner oder über mögliche durch AGR2 regulierte Proteine, reguliert werden. Eine Hypermethylierung des Promotors konnte bereits als ein Faktor der FoxA1/2 Expressionsregulation beschrieben werden (Akagi et al 2008, Halmos et al 2004). Die Tatsache, dass auch ein Knock Down von AGR2 einen negativen Einfluss auf die FoxA1/2 Expressionslevel hat, deutet erneut darauf hin, dass AGR2 nur in engen Proteinexpressionsleveln agiert bzw. dass es in normalen Geweben streng reguliert exprimiert wird.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass AGR2 eine Rolle in der Progression von Prostatakrebs, genauer bei der Metastasierung von Tumoren spielt. Die große Zahl von Faktoren, welche die Expression von AGR2 regulieren, und die gemachten Beobachtungen, dass sowohl eine AGR2 Knock Down als auch eine Überexpression einen negativen Effekt auf die Proliferation von Prostatakrebszellen

haben, deuten darauf hin, dass das Protein dabei in engen Proteingrenzen agiert, bzw. je nach Proteinkonzentration unterschiedliche Effekte haben kann. Weitere Untersuchungen der AGR2 Funktion sollten dies entsprechend bei der Manipulation der AGR2 Expression durch Knock Down oder Überexpression berücksichtigen.

Neben dieser Rolle von AGR2 in der Weiterentwicklung des Prostatakarzinoms konnten in dieser Arbeit verschiedene AGR2 mRNA Spleißvarianten identifiziert werden. Einige dieser Varianten kommen eventuell als Marker für Prostatakrebs in Frage. Die Möglichkeit, sie in Urinsediment von Prostatakrebspatienten nachzuweisen, wird zur Zeit in einer Kollaboration mit Huajie Bu (Universitätsklinik für Urologie, Innsbruck) untersucht.

7. Literatur

- Aberger F**, Weidinger G, Grunz H, Richter K (1998). Anterior specification of embryonic ectoderm: the role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2. *Mech Dev* **72**: 115-130.
- Adam PJ**, Boyd R, Tyson KL, Fletcher GC, Stamps A, Hudson L *et al* (2003). Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. *J Biol Chem* **278**: 6482-6489.
- Akagi T**, Luong QT, Gui D, Said J, Selektar J, Yung A *et al* (2008). Induction of sodium iodide symporter gene and molecular characterisation of HNF3 beta/FoxA2, TTF-1 and C/EBP beta in thyroid carcinoma cells. *Br J Cancer* **99**: 781-788.
- Almog N** (2010). Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett* **294**: 139-146.
- Bai VU**, Kaseb A, Tejwani S, Divine GW, Barrack ER, Menon M *et al* (2007). Identification of prostate cancer mRNA markers by averaged differential expression and their detection in biopsies, blood, and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2343-2348.
- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA** (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* **132**: 3151-3161.
- Bostwick DG**, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J *et al* (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer* **101**: 2371-2490.
- Bourdoumis A**, Papatsoris AG, Chrisofos M, Efstathiou E, Skolarikos A, Deliveliotis C (2010). The novel prostate cancer antigen 3 (PCA3) biomarker. *Int Braz J Urol* **36**: 665-668; discussion 669.
- Bu H**, Bormann S, Schafer G, Horninger W, Massoner P, Neeb A *et al* (2011). The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection. *Prostate* **71**: 575-587.
- Bu H**, Anterior gradient homolog 2 and 3 (AGR2 and 3) : expression, urine marker analysis, function and regulation in prostate cancer. Innsbruck, Med. Univ., Diss., 2010 http://sowibib.uibk.ac.at/cgi-bin/xhs_voll.pl?UID=&ID=95538
- Cato AC, Nestl A**. Discovery of genes involved in prostate cancer. *Epub: bioprode/en/region/stern/magazin/00919/indexhtml*
- Chen R**, Pan S, Duan X, Nelson BH, Sahota RA, de Rham S *et al* (2010). Elevated level of anterior gradient-2 in pancreatic juice from patients with pre-malignant pancreatic neoplasia. *Mol Cancer* **9**: 149.

- da Costa A**, Lenze D, Hummel M, Kohn B, Gruber AD, Klopfleisch R (2011). Identification of Six Potential Markers for the Detection of Circulating Canine Mammary Tumour Cells in the Peripheral Blood Identified by Microarray Analysis. *J Comp Pathol*.
- De Marzo AM**, Nakai Y, Nelson WG (2007). Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol* **25**: 398-400.
- Debes JD, Tindall DJ** (2002). The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Lett* **187**: 1-7.
- Edgell TA**, Barraclough DL, Rajic A, Dhulia J, Lewis KJ, Armes JE *et al* (2010). Increased plasma concentrations of anterior gradient 2 protein are positively associated with ovarian cancer. *Clin Sci (Lond)* **118**: 717-725.
- Evdokimova V**, Tognon C, Ng T, Ruzanov P, Melnyk N, Fink D *et al* (2009). Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell* **15**: 402-415.
- Feldman BJ, Feldman D** (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* **1**: 34-45.
- Fletcher GC**, Patel S, Tyson K, Adam PJ, Schenker M, Loader JA *et al* (2003). hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan. *Br J Cancer* **88**: 579-585.
- Franken NA**, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**: 2315-2319.
- Fritzsche FR**, Dahl E, Dankof A, Burkhardt M, Pahl S, Petersen I *et al* (2007). Expression of AGR2 in non small cell lung cancer. *Histol Histopathol* **22**: 703-708.
- Garza-Garcia A**, Harris R, Esposito D, Gates PB, Driscoll PC (2009). Solution structure and phylogenetics of Prod1, a member of the three-finger protein superfamily implicated in salamander limb regeneration. *PLoS One* **4**: e7123.
- Geiger TR, Peeper DS** (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1796**: 293-308.
- GEKID** (2010). Krebs in Deutschland 2005-2006, Häufigkeiten und Trends. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*.
- Gimenez-Bonafe P**, Fedoruk MN, Whitmore TG, Akbari M, Ralph JL, Ettinger S *et al* (2004). YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *Prostate* **59**: 337-349.

- Halmos B**, Basseres DS, Monti S, D'Alo F, Dayaram T, Ferenczi K *et al* (2004). A transcriptional profiling study of CCAAT/enhancer binding protein targets identifies hepatocyte nuclear factor 3 beta as a novel tumor suppressor in lung cancer. *Cancer Res* **64**: 4137-4147.
- Hessels D**, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B *et al* (2003). DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* **44**: 8-15; discussion 15-16.
- Higa A**, Mulot A, Delom F, Bouchecareilh M, Nguyen DT, Boismenu D *et al* (2011). Role of the pro-oncogenic Protein Disulfide Isomerase (PDI)-family member Anterior Gradient 2 (AGR2) in the control of Endoplasmic Reticulum homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*.
- Hori S**, Butler E, McLoughlin J (2011). Prostate cancer and diet: food for thought? *BJU Int* **107**: 1348-1359.
- Hrstka R**, Nenutil R, Fourtouna A, Maslon MM, Naughton C, Langdon S *et al* (2010). The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene* **29**: 4838-4847.
- Hu R**, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E *et al* (2009). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* **69**: 16-22.
- Humphrey PA** (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* **17**: 292-306.
- Innes HE**, Liu D, Barraclough R, Davies MP, O'Neill PA, Platt-Higgins A *et al* (2006). Significance of the metastasis-inducing protein AGR2 for outcome in hormonally treated breast cancer patients. *Br J Cancer* **94**: 1057-1065.
- Jiang J**, Tang YL, Liang XH (2011). EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther* **11**: 714-723.
- Keetch DW**, Humphrey P, Stahl D, Smith DS, Catalona WJ (1995). Morphometric analysis and clinical followup of isolated prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsy of the prostate. *J Urol* **154**: 347-351.
- King ER**, Tung CS, Tsang YT, Zu Z, Lok GT, Deavers MT *et al* (2011). The anterior gradient homolog 3 (AGR3) gene is associated with differentiation and survival in ovarian cancer. *Am J Surg Pathol* **35**: 904-912.
- Kumar A**, Godwin JW, Gates PB, Garza-Garcia AA, Brockes JP (2007). Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* **318**: 772-777.

- Kuo SC, Lampen O** (1976). Tunicamycin inhibition of (3H) glucosamine incorporation into yeast glycoproteins: binding of tunicamycin and interaction with phospholipids. *Arch Biochem Biophys* **172**: 574-581.
- Lai E, Teodoro T, Volchuk A** (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* **22**: 193-201.
- Lee AS** (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* **35**: 373-381.
- Lee do H, Lee Y, Ryu J, Park SG, Cho S, Lee JJ et al** (2011). Identification of proteins differentially expressed in gastric cancer cells with high metastatic potential for invasion to lymph nodes. *Mol Cells* **31**: 563-571.
- Lee S, Bang S, Song K, Lee I** (2006). Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncol Rep* **16**: 747-754.
- Lewis MJ, Pelham HR** (1990). A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* **348**: 162-163.
- Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R** (2005). Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas. *Cancer Res* **65**: 3796-3805.
- Luo Y, He DL, Ning L, Shen SL, Li L, Li X** (2006). Hypoxia-inducible factor-1alpha induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer cells. *Chin Med J (Engl)* **119**: 713-718.
- Ma Y, Hendershot LM** (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* **4**: 966-977.
- Mailand N, Podtelejnikov AV, Groth A, Mann M, Bartek J, Lukas J** (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* **21**: 5911-5920.
- Malhotra JD, Kaufman RJ** (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 716-731.
- Maresh EL, Mah V, Alavi M, Horvath S, Bagryanova L, Liebeskind ES et al** (2010). Differential expression of anterior gradient gene AGR2 in prostate cancer. *BMC Cancer* **10**: 680.
- Marin-Aguilera M, Mengual L, Ribal MJ, Ars E, Rios J, Gazquez C et al** (2012). Utility of urothelial mRNA markers in blood for staging and monitoring bladder cancer. *Urology* **79**: 240 e249-240 e215.
- Mirosevich J, Gao N, Gupta A, Shappell SB, Jove R, Matusik RJ** (2006). Expression and role of Foxa proteins in prostate cancer. *Prostate* **66**: 1013-1028.

- Nadler RB**, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL (1995). Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol* **154**: 407-413.
- Ouyang X**, Jessen WJ, Al-Ahmadie H, Serio AM, Lin Y, Shih WJ *et al* (2008). Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. *Cancer Res* **68**: 2132-2144.
- Ozcan U**, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E *et al* (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**: 457-461.
- Park K**, Chung YJ, So H, Kim K, Park J, Oh M *et al* (2011). AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration. *Exp Mol Med* **43**: 91-100.
- Park SW**, Zhen G, Verhaeghe C, Nakagami Y, Nguyenvu LT, Barczak AJ *et al* (2009). The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 6950-6955.
- Persson S**, Rosenquist M, Knoblach B, Khosravi-Far R, Sommarin M, Michalak M (2005). Diversity of the protein disulfide isomerase family: identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family. *Mol Phylogenet Evol* **36**: 734-740.
- Petek E**, Windpassinger C, Egger H, Kroisel PM, Wagner K (2000). Localization of the human anterior gradient-2 gene (AGR2) to chromosome band 7p21.3 by radiation hybrid mapping and fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* **89**: 141-142.
- Pohler E**, Craig AL, Cotton J, Lawrie L, Dillon JF, Ross P *et al* (2004). The Barrett's antigen anterior gradient-2 silences the p53 transcriptional response to DNA damage. *Mol Cell Proteomics* **3**: 534-547.
- Pootrakul L**, Datar RH, Shi SR, Cai J, Hawes D, Groshen SG *et al* (2006). Expression of stress response protein Grp78 is associated with the development of castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 5987-5993.
- Ramachandran V**, Arumugam T, Wang H, Logsdon CD (2008). Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. *Cancer Res* **68**: 7811-7818.
- Ranganathan AC**, Adam AP, Zhang L, Aguirre-Ghiso JA (2006). Tumor cell dormancy induced by p38SAPK and ER-stress signaling: an adaptive advantage for metastatic cells? *Cancer Biol Ther* **5**: 729-735.
- Rice GE**, Edgell TA, Autelitano DJ (2010). Evaluation of midkine and anterior gradient 2 in a multimarker panel for the detection of ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **29**: 62.

- Ron D, Walter P** (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 519-529.
- Ross R, Bernstein L, Judd H, Hanisch R, Pike M, Henderson B** (1986). Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *J Natl Cancer Inst* **76**: 45-48.
- Scriven P, Brown NJ, Pockley AG, Wyld L** (2007). The unfolded protein response and cancer: a brighter future unfolding? *J Mol Med (Berl)* **85**: 331-341.
- Shih LJ, Lu YF, Chen YH, Lin CC, Chen JA, Hwang SP** (2007). Characterization of the agr2 gene, a homologue of X. laevis anterior gradient 2, from the zebrafish, Danio rerio. *Gene Expr Patterns* **7**: 452-460.
- So AY, de la Fuente E, Walter P, Shuman M, Bernales S** (2009). The unfolded protein response during prostate cancer development. *Cancer Metastasis Rev* **28**: 219-223.
- Song Y, Washington MK, Crawford HC** (2010). Loss of FOXA1/2 is essential for the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Cancer Res* **70**: 2115-2125.
- Sosa MS, Avivar-Valderas A, Bragado P, Wen HC, Aguirre-Ghiso JA** (2011). ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. *Clin Cancer Res* **17**: 5850-5857.
- Stark GR, Taylor WR** (2006). Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol* **32**: 227-248.
- Tanjore H, Cheng DS, Degryse AL, Zoz DF, Abdolrasulnia R, Lawson WE et al** (2011). Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **286**: 30972-30980.
- Tepper CG, Boucher DL, Ryan PE, Ma AH, Xia L, Lee LF et al** (2002). Characterization of a novel androgen receptor mutation in a relapsed CWR22 prostate cancer xenograft and cell line. *Cancer Res* **62**: 6606-6614.
- Thiery JP, Sleeman JP** (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 131-142.
- Thompson DA, Weigel RJ** (1998). hAG-2, the human homologue of the Xenopus laevis cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **251**: 111-116.
- Tosoian J, Loeb S** (2010). PSA and beyond: the past, present, and future of investigative biomarkers for prostate cancer. *ScientificWorldJournal* **10**: 1919-1931.
- Treiman M, Caspersen C, Christensen SB** (1998). A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol Sci* **19**: 131-135.

- Uhr JW, Pantel K** (2011). Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 12396-12400.
- Ulianich L, Garbi C, Treglia AS, Punzi D, Miele C, Raciti GA et al** (2008). ER stress is associated with dedifferentiation and an epithelial-to-mesenchymal transition-like phenotype in PC Cl3 thyroid cells. *J Cell Sci* **121**: 477-486.
- Valladares-Ayerbes M, Diaz-Prado S, Reboredo M, Medina V, Iglesias-Diaz P, Lorenzo-Patino MJ et al** (2008). Bioinformatics approach to mRNA markers discovery for detection of circulating tumor cells in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer Detect Prev* **32**: 236-250.
- van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL et al** (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**: 205-225.
- Vanderlaag KE, Hudak S, Bald L, Fayadat-Dilman L, Sathe M, Grein J et al** (2010). Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor- α and survivin. *Breast Cancer Research* **12**: R32.
- Vivekanandan P, Micchelli ST, Torbenson M** (2009). Anterior gradient-2 is overexpressed by fibrolamellar carcinomas. *Hum Pathol* **40**: 293-299.
- Wang Z, Hao Y, Lowe AW** (2008). The adenocarcinoma-associated antigen, AGR2, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation. *Cancer Res* **68**: 492-497.
- Wayner EA, Quek SI, Ahmad R, Ho ME, Loprieno MA, Zhou Y et al** (2011). Development of an ELISA to detect the secreted prostate cancer biomarker AGR2 in voided urine. *Prostate*.
- Zhang JS, Gong A, Cheville JC, Smith DI, Young CY** (2005). AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **43**: 249-259.
- Zhang Y, Forootan SS, Liu D, Barraclough R, Foster CS, Rudland PS et al** (2007). Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **10**: 293-300.
- Zhang Y, Ali TZ, Zhou H, D'Souza DR, Lu Y, Jaffe J et al** (2010). ErbB3 binding protein 1 represses metastasis-promoting gene anterior gradient protein 2 in prostate cancer. *Cancer Res* **70**: 240-248.
- Zhao F, Edwards R, Dizon D, Afrasiabi K, Mastroianni JR, Geyfman M et al** (2010). Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*^{-/-} mice. *Dev Biol* **338**: 270-279.

Zheng W, Rosenstiel P, Huse K, Sina C, Valentonyte R, Mah N *et al* (2006). Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. *Genes Immun* **7**: 11-18.

Zweitzig DR, Smirnov DA, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM, Moran E (2007). Physiological stress induces the metastasis marker AGR2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* **306**: 255-260.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andrew Cato für die Möglichkeit, in seinem Labor an diesem herausfordernden und spannenden Thema zu arbeiten und für die Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jörg Kämper danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Vielen Dank an Frau Dr. Antje Neeb für die Betreuung meiner Arbeit in Laborfragen, für viele Tipps & Tricks und immer ein offenes Ohr – auch in den stressigsten Momenten!

Ganz besonderen Dank an die Labore 109 & 114 und das Doktorandenzimmer!

Jutta & Anne für Eure helfenden Hände, Rebecca & Katja für unzählige Mittagspausen und Hilfe in allen Labor- und Lebensfragen, Erald – I couldn't have asked for a better AGR team member, Danilo, Manu, Emml, Tobi, Ambili, Tamara, Jana & David für eine tolle Zeit! Olli, Dana, Mark (Hi Mark!), Katharina, Isabella, Olga, Dieter, Arul und allen Ex-Bewohnern für das unvergessliche Doktorandenzimmerflair!

Natürlich gibt es auch außerhalb des Labors viele Menschen, die mich in den vergangenen drei Jahren unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Christian, der meine Aufs und Abs ohne zu Murren ertragen und mich mit Mitbringseln aus der großen weiten Welt immer wieder motiviert hat. Tausend Dank auch an meine Familie für die nie endende Unterstützung aus der Ferne, sogar vom anderen Ende der Welt!

Für meinen Großvater, Kurt Bormann.

Curriculum Vitae

Name: Stefanie Bormann
Geburtsdatum : 03. November 1983 (in 46446 Emmerich am Rhein)
Nationalität: deutsch

Anschrift: Weidenweg 16
76189 Karlsruhe

Telefon: 0163 – 201 20 22

E-Mail Stefanie.Bormann@web.de

Universitäre Ausbildung:

02/2009 – 02/2012 Anfertigung einer Dissertation
Institut für Toxikologie und Genetik des Karlsruher Instituts für
Technologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andrew Cato
Thema: Anterior Gradient 2 Genprodukte als Marker und
Regulatoren der Prostatakrebsprogression

03/2008 – 12/2008 Anfertigung einer Diplomarbeit
Institut für Toxikologie und Genetik der Universität Karlsruhe/ des
Forschungszentrums Karlsruhe (jetzt KIT)
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andrew Cato
Thema: Charakterisierung der androgen-regulierten Gene human
Anterior Gradient 2 und 3 in Prostatakrebs

10/2003 – 12/2008 Universität Karlsruhe (TH)
Studiengang Biologie (Diplom)
Hauptfach: Zellbiologie
Nebenfächer: Genetik, Zoologie
Abschluss: Diplom (sehr gut (1,5))

Schulische Ausbildung:

1994 - 2003 Gymnasium
Freiherr-vom-Stein Gymnasium, 47533 Kleve
Abschluss: Abitur (2,0)

1990 - 1994 Grundschule
Gemeinschaftsgrundschule Kleve Unterstadt, 47533 Kleve

Publikationen: Bu H, Bormann S, Schafer G, Horninger W, Massoner P, Neeb A, Lakshmanan V-K, Maddalo D, Nestl A, Sültman H, Cato A, Klocker H. (2011). **The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection.** *Prostate* 71: 575-587.

Lehre: Betreuung der Bachelorarbeit „Untersuchung von human Anterior Gradient 2 – ein in Prostatakrebs überexprimiertes Sekretionsprotein“ (Lea Krutzke, 2010)

Betreuung von F3 Projektpraktikanten

Betreuung des F2 Moduls „Signaltransduktion und Genregulation“

Betreuung des genetischen Schnupperpraktikums