



Schülerpraktikum „Prostatakarzinom“

1. Einleitung

In Deutschland ist das Prostatakarzinom der häufigste Tumor beim Mann (ca. 32.000 Neuerkrankungen im Jahr). Das Hauptrisiko tragen Männer ab 75 Jahren. In diesem Alter tritt ein Prostatakarzinom mehr als 12mal so häufig auf wie zwischen 45 und 59 Jahren. Prostatakrebs führt in ca. 10% der Fälle zum Tode. Weshalb Prostatakrebszellen entstehen, ist unbekannt. Als Risikofaktoren gelten neben der Ernährung das Alter sowie hormonelle und genetische Faktoren.

Hormonelle Faktoren, Umwelteinflüsse und Ernährung

Androgene (männliche Geschlechtshormone) spielen bei der Entstehung und dem Wachstum des Prostatakarzinoms eine wichtige Rolle. So soll dieser Krebs nach Kastration vor der Pubertät (bei Eunuchen) nicht vorkommen. Zudem führt die Absenkung der Androgene ("Androgenentzug") sowohl zu einer Schrumpfung der Prostata als auch in etwa 80% zur Rückbildung eines Prostatakarzinoms. Ein weiterer Hinweis auf eine hormonelle Ursache ist die relative Seltenheit des Prostatakarzinoms bei Asiaten. Bei ihnen soll die Androgenbildung niedriger sein als bei Europäern und Nordamerikanern. Bei Asiaten, die in die USA einwandern, steigt das Prostatakarzinom-Risiko an, es ist in der nächsten Generation gleich hoch wie bei gebürtigen US-Amerikanern. Dies verdeutlicht den Einfluss von Umwelt und Ernährung auf die Entstehung des Prostatakarzinoms. Unter den Umweltfaktoren gibt es auch solche mit einem positiven Effekt: Die natürliche UV-Strahlung der Sonne fördert die Bildung von Vitamin D in der Haut und soll so eine schützende Wirkung haben. Bezüglich der Ernährung gelten als Risiko-erhöhend: Vermehrter Verzehr von Fleisch (tierischen Eiweißen) und Fett (vor allem tierischen, gesättigten Fetten), verminderter Verzehr von Obst, Gemüse, Getreide und Ballaststoffen, Übergewicht (durch Einfluss auf den Hormonstoffwechsel?).

Genetische Faktoren

Die unterschiedliche Häufigkeit des Prostatakarzinoms in verschiedenen Bevölkerungen (gering in Asien, höher bei farbigen als bei weißen US-Amerikanern, höher in Nordeuropa als in Südeuropa) lässt einen Einfluss von Erbfaktoren vermuten. Etwa 10% der Prostatakarzinome sollen erblich bedingt sein. Es ist bekannt, dass das Prostatakarzinom in manchen Familien gehäuft auftritt (familiäre Häufung). So steigt das Risiko auf das Zwei- bis Dreifache, wenn ein Verwandter ersten Grades (Bruder, Vater) an einem Prostatakarzinom erkrankt ist. Man vermutet, dass mehrere Gene verändert sind, und spricht deshalb von genetischer Disposition („Veranlagung“). Die Veränderungen können bei Vater oder Mutter vorhanden oder spontan in einer ihrer Keimzellen entstanden sein und an die nächste Generation vererbt werden. Um welche Gene es sich dabei handelt und warum sich selbst

bei vorhandenen Genveränderungen nicht in jedem Fall ein Prostatakarzinom entwickelt, wird noch untersucht.

Forscher der Klinik für Urologie und Kinderurologie in Homburg haben herausgefunden, dass es in Tumorzellen der Prostata auf dem Chromosom 3 verschiedene Gene gibt, die sehr hohe Amplifikationsraten aufweisen, d.h. in zahlreichen Kopien vorkommen. Dabei weist das Gen *TLOC1/SEC62* die höchste Amplifikationsrate auf. Die Überexpression dieses Gens in Tumorzellen wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie bestätigt (das vom Gen *TLOC1/SEC62* kodierte Protein wird als TLOC1/Sec62 bezeichnet). Es gilt nun, den Zusammenhang zwischen einer *TLOC1/Sec62*-Überexpression und der Entwicklung eines Tumors beim Menschen aufzuklären. Darüber hinaus sollen die Untersuchungen dazu führen, TLOC1/Sec62 als möglichen Tumormarker zu validieren. In den Arbeiten kommen die verschiedensten molekularbiologischen und biochemischen Methoden zum Einsatz. Zwei dieser Methoden werden Sie bei uns selbst anwenden.

2. Versuchsdurchführung

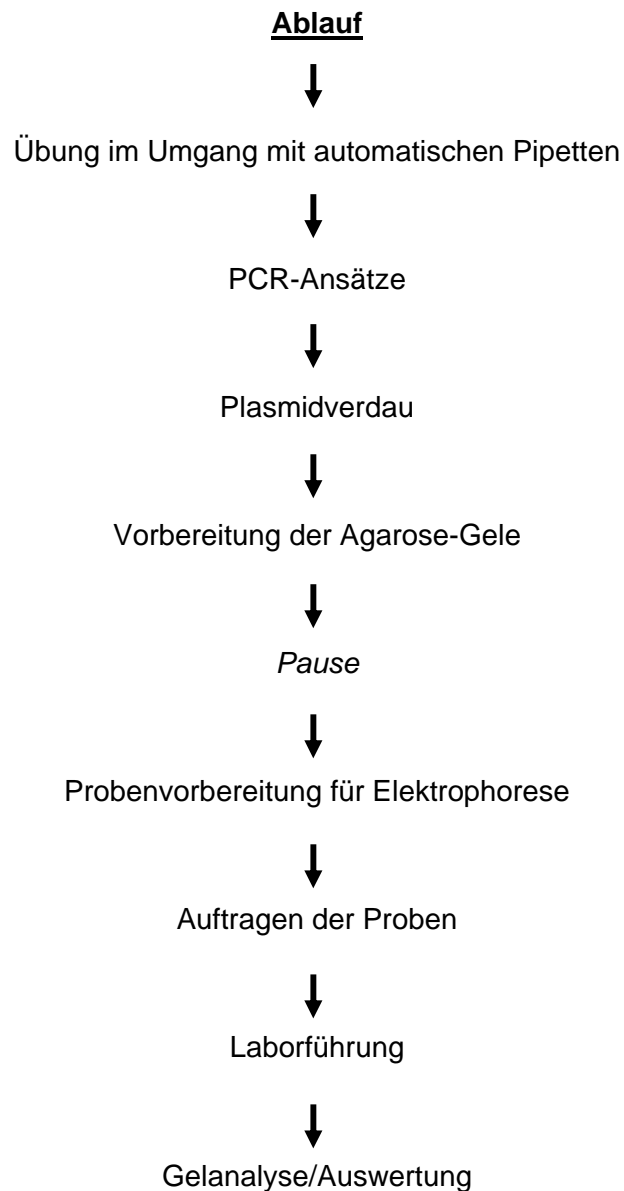
Im Rahmen dieses Praktikums soll von Ihnen mittels PCR das Gen *TLOC1/SEC62* aus einer cDNA-Probe von Tumorzellen amplifiziert werden. Das PCR-Produkt aus der Tumorzelllinie kann in ein Plasmid kloniert werden, welches als Ausgangspunkt für die Herstellung transgener Zelllinien benutzt werden kann. Im Rahmen dieses Praktikums wird ein Plasmid zur Verfügung gestellt, in das die cDNA bereits eingebracht wurde. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen soll es wieder aus dem Vektor ausgeschnitten werden, um im anschließenden Vergleich der cDNA mit dem PCR-Produkt in einem Agarosegel die Korrektheit des Plasmids zu bestätigen.

2.1 Theoretische Grundlagen

cDNA, mRNA, PCR, Primer, Plasmid, Klonierung, E. coli, Transformation, Restriktionsenzyme, Gelelektrophorese

2.2 Praktische Durchführung

Es werden jeweils Gruppen aus 2 Teilnehmern gebildet.



2.2.1 PCR Reaktion

Für die PCR macht jede 2er Gruppe 2 Ansätze, wobei einmal der Mastermix + (**MM+**) und einmal der Mastermix – (**MM-**) eingesetzt wird. Der Mastermix + enthält eine cDNA-Probe von Tumorzellen mit dem Gen *TLOC1/SEC62*, der Mastermix – nicht (Negativ-Kontrolle). Neben der "Template-DNA" (Matrize) enthält der Mastermix noch folgende weitere Komponenten, die für die PCR-Reaktion notwendig sind:

Primer (2)	Oligonukleotide, die als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme wie die DNA-Polymerase dienen, da die DNA-Polymerase nur an ein vorhandenes DNA-Fragment Nucleotide anhängen, nicht aber einen Strang "de novo" synthetisieren kann. Für die PCR werden Nucleotidsequenzen, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, bestimmt. Gemäß diesen Sequenzen werden passende Primersequenzen synthetisch hergestellt. Ein Primer repräsentiert hierbei jeweils den gegenläufigen Strang zu seinem „Primerpartner“. Primer für PCR-Ansätze haben in der Regel eine Länge von 18-30 Nucleotiden.
Polymerase Puffer	stellt die optimalen Bedingungen bezüglich pH-Wert und Salzkonzentration - insbesondere $MgSO_4$ - für die Polymerase her.
dNTP-Mix	Nucleotide dATP, dGTP, dTTP, dCTP

In zwei PCR-Reaktionsgefäße werden folgende Lösungen pipettiert (WICHTIG: Reaktionsgefäße beschriften!):

Ansatz 1:

24 µl MM-
1 µl Polymerase

Ansatz 2:

24 µl MM+
1 µl Polymerase

Beide Ansätze werden kurz durchmischt (Vortex), an zentrifugiert und in das PCR-Gerät gestellt. Folgendes **PCR-Programm** wird verwendet:

1. Initiales Denaturieren (94°C, 2 min.)
2. eigentliche Reaktion (25 Zyklen)
 - Denaturieren (94°C, 0,5 min.)
 - Annealing (Primer Anlagerung, 56°C, 0,5 min.)
 - Kettenverlängerung (72°C, 1,5 min.)
3. Finale Kettenverlängerung (72°C, 2,0 min.)
4. Kühlung (4°C, optional)

Nach der PCR-Reaktion werden die Ansätze aus dem PCR-Gerät entnommen. Jeweils 10 µl werden in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Anschließend werden 2 µl 6-fach konzentrierter DNA-Probenpuffer zugegeben (Endvolumen 12 µl). Die Proben stehen dann für die Gelelektrophorese zur Verfügung.

1.2.2. Plasmidverdau mit Restriktionsendonukleasen

Die Teilnehmer erhalten 2 Plasmide, von denen eines die für Sec62 kodierende cDNA enthält, das andere nicht. Beide Plasmide werden mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Diese "zerschneiden" dabei als molekulare Scheren den DNA Strang, wobei jede Restriktionsendonuklease genau eine spezifische Sequenz auf der DNA als Schnittstelle erkennt. Enthält das Plasmid die für Sec62 kodierende cDNA, so wird dieses Stück ausgeschnitten und kann in der nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese vom Rest des Plasmides aufgrund seiner geringeren Größe getrennt werden. Ist keine cDNA in dem Plasmid enthalten, so wird das Plasmid nur linearisiert und das Bild der Agarose-Gelelektrophorese liefert nur eine Bande.

Pipettierschema: (WICHTIG: Reaktionsgefäße beschriften!)

	Ansatz 1	Ansatz 2
Plasmid mit Sec62	1 µl	-
Plasmid ohne Sec62 (Kontrolle)	-	1 µl
10-fach Puffer (Tango)	1 µl	1 µl
Wasser	7 µl	7 µl
Kpn 1	0,5 µl	0,5 µl
Sac 1	0,5 µl	0,5 µl

Beide Ansätze werden kurz durchmischt (Vortex), an zentrifugiert und für 30 - 45 min. bei 37°C inkubiert. Danach werden jedem Ansatz 2 µl 6-fach konzentrierter DNA-Probenpuffer zugesetzt (12 µl Endvolumen). Die Proben stehen dann für die Gelelektrophorese zur Verfügung.

1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) nach ihrer Größe zu trennen und um ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Dazu werden lange Fäden aus Agarosepolymeren zu einem Gel vernetzt. Je höher die Agarose-Konzentration im Gel gewählt wird, desto kleiner sind die Poren, die sich im Gel ausbilden. Ein elektrisches Feld wird verwendet, um die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix zu ziehen, wobei kleinere Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen können und somit eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird.

Für die Agarose-Gelelektrophorese werden benötigt

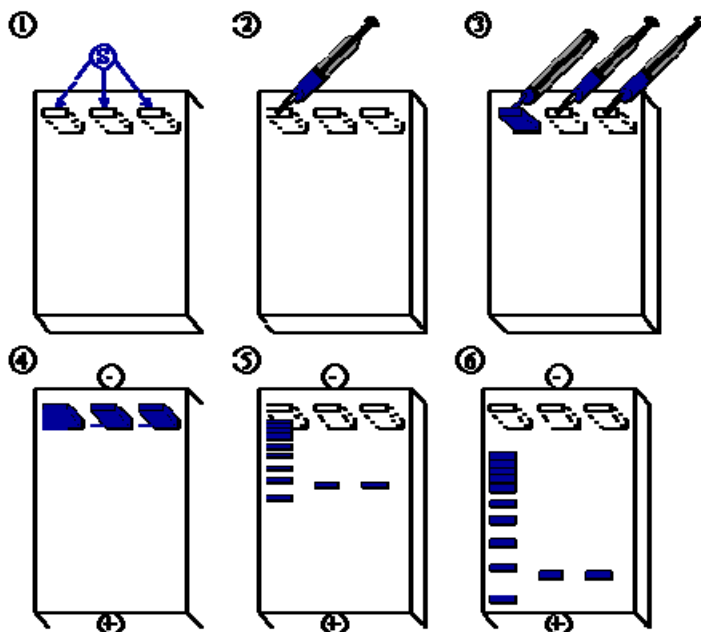
1. Die DNA, die nach ihrer Größe aufzutrennen ist
2. Ein Marker (manchmal)
Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Länge, mit der die DNA-Probe verglichen werden kann, um deren Größe zu bestimmen.
3. Puffer, pH 8,0 (TBE oder TAE)
*TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
Borat (Salz der Borsäure)
Acetat (Salz der Essigsäure)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)*
4. Agarose
Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactose, die glycosidisch miteinander verbunden sind. Es stellt die Hauptkomponente des Agars dar und wird vor allem aus den Rotalgengattungen Gelidium und Gracillaria gewonnen. Agarose ist ein starker Gelbildner und für die Gelierfähigkeit des Agars verantwortlich.
5. Ethidiumbromid (5 mg/ml in Wasser) oder anderer Nukleinsäure-Farbstoff
Ethidiumbromid wird in der Molekularbiologie zum Anfärben von Nukleinsäuren bei der Gelelektrophorese verwendet. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen die Basen der DNA bzw. RNA (Einlagerung im Abstand von 10 Basenpaaren), wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäuren dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorliegenden DNA/RNA-Konzentration, sowie zur Länge der Nukleinsäure. Die verwendete Ethidiumbromid-Konzentration im Agarosegel liegt üblicherweise bei 0,1–0,5 µg/ml

6. Ein Farbmarker (*loading dye*)
z. B. ein niedermolekularer Farbstoff wie Bromphenolblau, um den Fortschritt der Elektrophorese abschätzen zu können
7. Eine Elektrophoresekammer aus Plexiglas
8. Ein "Kamm" (normalerweise aus Plexiglas oder Teflon)
9. Eine Stromquelle, die eine Gleichstromspannung von etwa 100 V liefert

Herstellung eines 1% Agarosegels

- 1 g Agarose in Erlenmeyerkolben abwiegen
- 100 ml TAE-Puffer zugeben
- Agaroselösung aufkochen, bis die Agarose gelöst ist
- Die Lösung bei Raumtemperatur bis auf ca. 60 °C abkühlen lassen
- Gelkammer an Rändern mit Klebeband abkleben
- Den Kamm auf einer Seite des Gels hineinstecken, ca. 5-10 mm vom oberen Rand entfernt
- Die Gellösung in die Gelkammer gießen
- Wenn das Gel fest geworden ist, den Kamm entfernen. Die Aussparungen, die im Gel zurückbleiben, werden als *Taschen* bezeichnet
- Das Gel in TAE-Laufpuffer legen. Das Gel muss vollständig bedeckt sein. Die Taschen müssen an der negativen Elektrode der Kammer zu liegen kommen
- Proben mit einer Pipette in jeweils eine Tasche pipettieren
- Konstante elektrische Spannung nach Länge der Elektrophoresekammer anlegen (5 Volt/cm); d.h. bei 20 cm Länge eine Spannung von 100 V
- Elektrophorese beenden, wenn die DNA-Fragmente genügend aufgetrennt sind (anhand der Farbfront abschätzen)

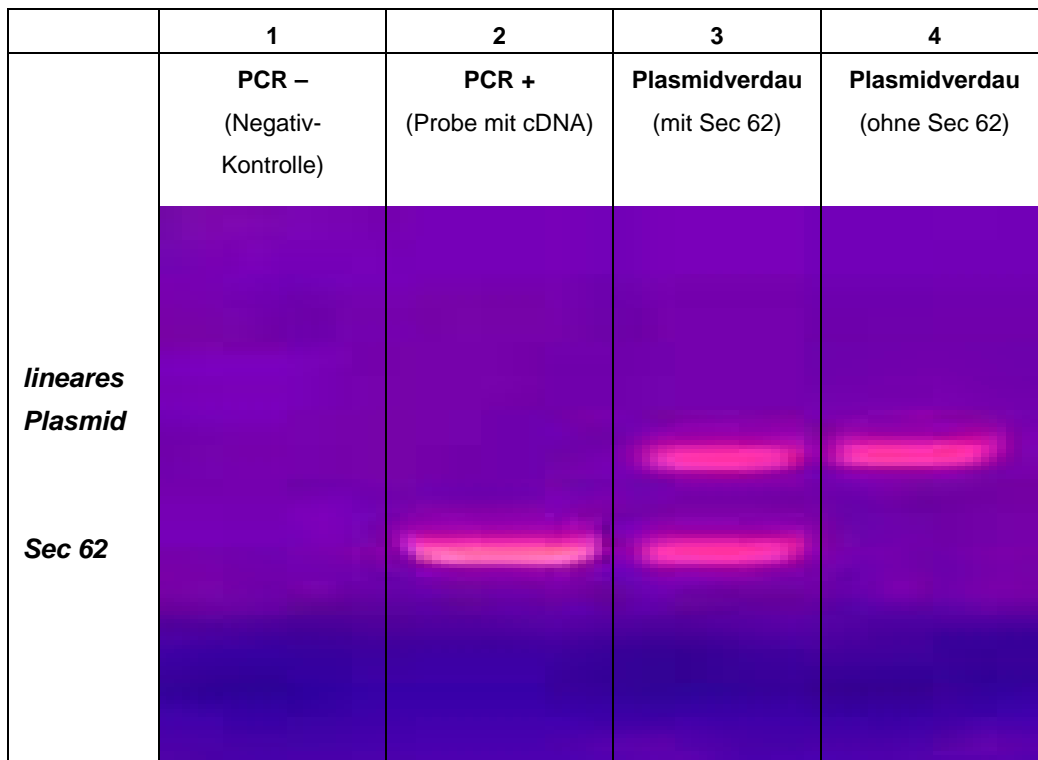
Die Dauer der Elektrophorese hängt hierbei von der eingesetzten Spannung (je höher die Spannung, desto schneller wandern die Fragmente), der Prozentigkeit des Gels (je höher der Agarose-Anteil, desto länger dauert die Elektrophorese) sowie der Länge der Wegstrecke, die die Fragmente wandern sollen, ab. Diese Parameter müssen je nach Analyse neu gewählt werden, um eine optimale Auftrennung in der kürzest möglichen Zeit zu erreichen.



Das Färben der Gele wird von den Betreuern übernommen.

Quelle: <http://www.wikipedia.de/>

Zu erwartendes Ergebnis



Kompetenzzentrum Molekulare Medizin



Dr. Gabriele Amoroso
Fachrichtung 2.3 - Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes
Universitätskliniken Geb. 44
D-66424 Homburg/Saar
Phone: +49(0)6841-16-26541
Fax: +49(0)6841-16-26288
Email: amoroso@mx.uni-saarland.de
<http://www.uni-saarland.de/komm>