

Aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
(Direktorin Univ.- Prof. Dr. rer. nat. habil. Elke Krüger)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema

Expressionsprofile von Enzymen des Argininstoffwechsels unter besonderer
Berücksichtigung der Arginase-1 als potentieller Interaktionspartner des
Tumorproteins D52 in humanen Prostatakarzinomzellen unter Androgenablation

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2017

vorgelegt von:
Vivien Wagner
geb. am: 02.09.1993
in: Magdeburg

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Walther

2. Gutachter: Prof. Dr. G. v. Amsberg

Ort, Raum: Klinikum Greifswald, Seminarraum 4.2.22

Tag der Disputation: 27.02.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Anatomie der Prostata	1
1.2 Das Prostatakarzinom.....	3
1.3 Tumorproteinfamilie D52 und PC-1	6
1.4 Arginase und Argininstoffwechsel	7
1.5 Zielstellung.....	9
2 Materialien und Methoden	10
2.1 Materialien	10
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	10
2.1.2 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen	13
2.1.3 Zelllinien und Kulturmedien	18
2.1.4 Plasmide und Primer	19
2.1.5 Antikörper	20
2.1.6 Software	21
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Zellkultur.....	22
2.2.2 Zellernte und Zellyse	23
2.2.3 Molekularbiologische Methoden - Nukleinsäureanalytik.....	26
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung	32
2.2.6 Bestimmung der Arginase-Enzymaktivität	33
2.2.7 Statistische Auswertung	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Interaktion zwischen Arginase-1 und PC-1	34
3.1.1 Kolokalisationsanalyse nach Transfektion von pEYFP-N-PC-1 und indirekter Immunfluoreszenz von Arginase-1	34
3.1.2 Co-Immunpräzipitation	36

3.2	Charakterisierung der Expressionsprofile von Enzymen des Argininstoffwechsels in LNCaP-Zellen	37
3.2.1	Einfluss der Androgenablation - Kultivierung 3 Tage in CTM	37
3.2.2	Hormonelle Stimulation mit R1881 für 3 Tage in CTM	41
3.2.3	Expressionskinetik bei hormoneller Stimulation mit R1881 in CTM	43
3.2.4	Zellfraktionierung	50
3.2.5	Immunfluoreszenz.....	51
3.3	Expressionsprofile von PC-1 in LNCaP-Zellen.....	52
3.3.1	Einfluss der Androgenablation – Kultivierung 3 Tage in CTM.....	52
3.3.2	Hormonelle Stimulation mit R1881 für 3 Tage in CTM	53
3.3.3	Expressionskinetik bei hormoneller Stimulation mit R1881 in CTM	53
3.3.4	Immunfluoreszenz.....	54
3.4	Expression von PC-1, ARG1 und ARG2 in LNCaP-PC-1-Zellen	55
3.5	Enzymaktivität	57
4	Diskussion	58
5	Zusammenfassung.....	66
6	Literaturverzeichnis.....	67

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
<i>A. deionisata</i>	<i>aqua deionisata</i>
Abb.	Abbildung
ADC	Arginindecarboxylase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
ARG1	Arginase-1 (laut Swiss-Prot ARG11)
ARG2	Arginase-2 (laut Swiss-Prot ARG12)
ASL	Argininosuccinatlyase
ASSY	Argininosuccinatsynthetase
BPH	<i>benigne</i> Prostatahyperplasie
BSA	<i>bovines</i> Serumalbumin
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
c.t.	<i>charcoal-treated</i>
CCF	Van Steensel's Kreuzkorrelationskoeffizient
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CLS	Cell Lines Service GmbH
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTM	<i>charcoal-treated</i> Medium
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
Dox	Doxycyclin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DRU	Digitale rektale Untersuchung
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemolumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
for	<i>forward</i> (vorwärts)
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GST	Glutathion-S-Transferase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
ICA	<i>intensity correlation analysis</i> (Intensitätskorrelationsanalyse)
ICQ	Li's Intensitätskorrelationskoeffizient/-quotient
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
JACoP	<i>Just Another Colocalization Plugin</i>
kDa	kilo-Dalton
M-MLV-RTase	<i>moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
MDS	<i>myeloid derived suppressor cells</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase)
OAT	Ornithinaminotransferase
OAZ	<i>ornithine decarboxylase antizyme</i>
ODC	Ornithindecaboxylase
OTC	Ornithintranscarbonylase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC-1	<i>human prostate and colon gene-1</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPP	Protein-Proben-Puffer
PrLZ	<i>prostate leucine zipper</i> (Tumorprotein D52)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSP	Prostata-saure Phosphatase
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rev	reverse (rückwärts)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
R1881	Methyltrienolon (synthetisches Androgen)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STM	Standardmedium
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBA	α -Tubulin
TBP	<i>TATA-box-binding protein</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS mit 0,1 % Tween [®] 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPD52	Tumorprotein D52
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TV	Transkriptvariante
Tween [®] 20	Polysorbat 20
V	Volt
WB	Western Blot
× g	relative Erdbeschleunigung
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (gelb fluoreszierendes Protein)

1 Einleitung

1.1 Anatomie der Prostata

Die kastaniengroße Prostata (Vorsteherdrüse) ist eine exokrine Drüse und liegt extraperitoneal im Becken des Mannes der Faszie des *Musculus transversus perinei profundus* auf (siehe Abb. 1). Als größte akzessorische Geschlechtsdrüse umschließt sie unterhalb der Harnblase die *Pars prostatica* der Urethra (Harnröhre) und beide *Ductus ejaculatorii* (Spritzkanälchen) [1, 2]. Mit einer derben, fibromuskulären Kapsel grenzt die Prostata nach dorsal an das Rektum, durch welches sie bei einer digitalen rektalen Untersuchung (DRU) tastbar ist [1, 3]. Ventral ist die Drüse durch das *Ligamentum puboprostaticum* am Hinterrand der Symphyse befestigt [3].

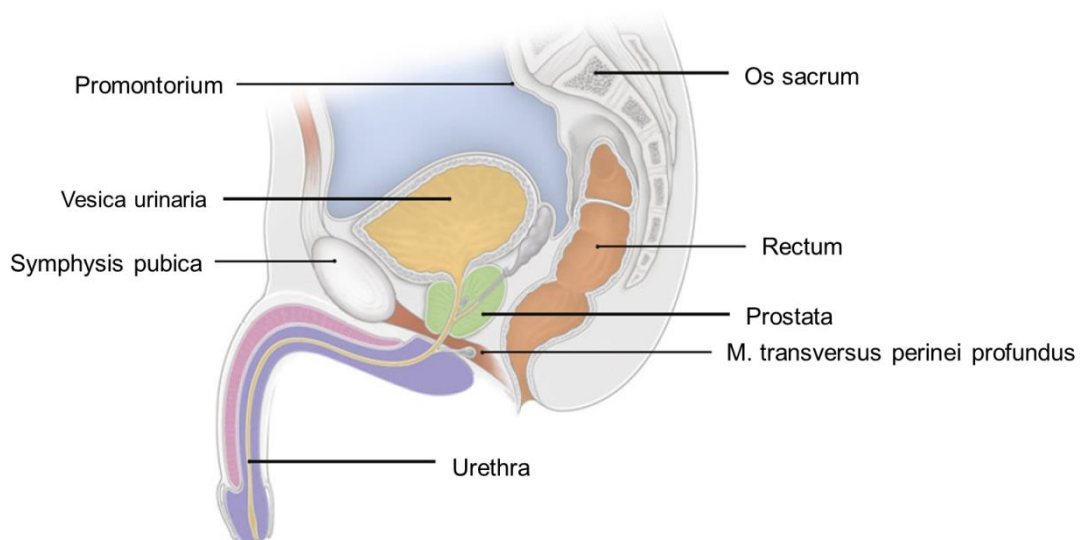


Abb. 1: Anatomische Lage der Prostata im männlichen Becken

Ansicht von lateral, Sagittalschnitt (modifiziert nach [2])

Es werden vier bis fünf Zonen der Prostata unterschieden (siehe Abb. 2). Die periurethrale Zone als kleinster Organanteil umgibt die *Pars prostatica* der Urethra. Darauf folgt die zentrale Zone (auch Innenzone genannt), welche keilförmig die *Ductus ejaculatorii* umfasst. Den größten Anteil bildet die periphere Zone (Außenzone) [1]. Im ventralen Bereich der Prostata liegt die drüsenfreie anteriore Zone. In manchen Einteilungen wird noch eine schmale Transitionszone (Übergangszon) unterschieden [3]. Die Zonengliederung der Prostata ist klinisch bedeutsam, da *benigne* Prostatahyperplasien meist in der zentralen Zone entstehen, während *maligne* Prostatakarzinome oft in der peripheren Zone lokalisiert sind [4].

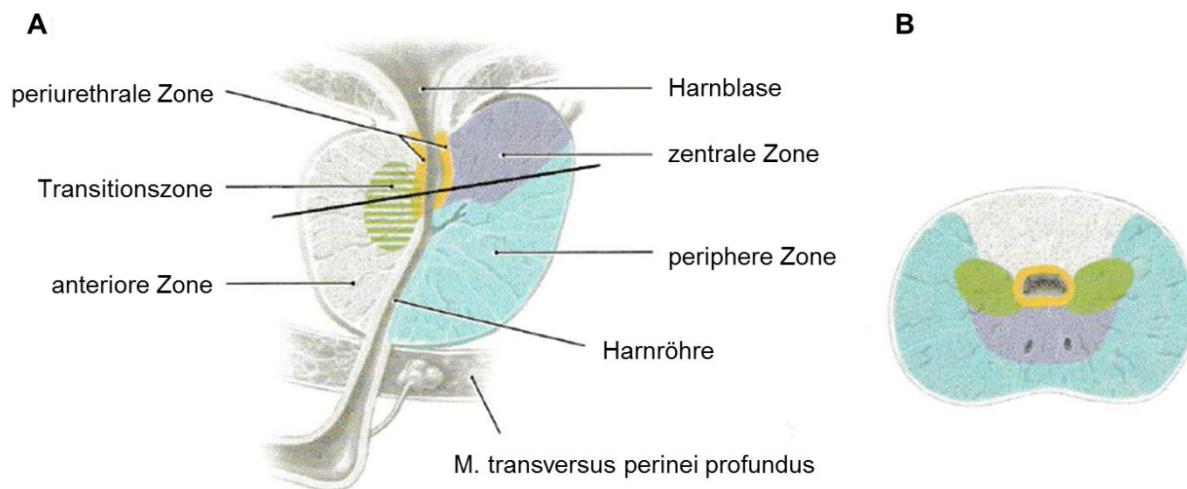


Abb. 2: Anatomische Lage und Zonengliederung der Prostata

A: Ansicht von lateral, Sagittalschnitt (modifiziert nach [5])

B: Ansicht von kaudal, Horizontalschnitt (modifiziert nach [5])

Histologisch besteht die Prostata aus 30 - 50 verzweigten tubuloalveolären Einzeldrüsen, welche über 15 - 30 Ausführungsgänge zusammen mit den *Ductus ejaculatorii* am *Colliculus seminalis* (Samenhügel) in die Urethra münden [6]. Die Drüsen besitzen ein zweireihiges Epithel mit Basalzellen und Hauptzellen. Die Epithelhöhe ist von der sekretorischen Aktivität abhängig. Außerdem finden sich im Epithel Stammzellen und endokrine Zellen. Die zahlreichen glatten Muskelzellen im Stroma dienen der Emission des Sekrets in die Urethra. Im Drüsenlumen entstehen gelegentlich Prostatasteine – kleine konzentrische Konkremente aus verkalktem abgeschilferten Epithel und Sekretbestandteilen [2, 7].

Die exokrine Drüse produziert ein schwach saures Sekret (pH 6,4) und trägt 30 % Volumenanteil des Ejakulats bei. Diagnostische Bedeutung hat das enthaltene Prostata-spezifische Antigen (PSA), welches bei Erkrankungen des Organs wie Prostatakarzinom oder *benigner* Prostatahyperplasie (BPH) in erhöhten Mengen vorliegt. Dieses Glykoprotein ist eine Serinprotease und verflüssigt das koagulierte Ejakulat durch Spaltung von Semenogelin-1 [7-8]. Als weitere Bestandteile enthält das Prostatasekret saure Phosphatase, Proteasen, Zitronensäure, Immunglobuline und das Polyamin Spermin, welches die Spermienmotilität erhöht [1, 6].

1.2 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist der häufigste urologische Tumor des Mannes, der mit Hilfe des PSA-Tests und der Biopsie früh entdeckt und mit Prostatektomie, Bestrahlung oder Hormonablation therapiert werden kann [9]. Über die letzten Jahrzehnte hat sich diese Erkrankung zu einem der bedeutsamsten Malignome mit der zweithäufigsten Krebstodesursache in den westlichen Industrieländern entwickelt. Epidemiologisch auffällig ist die unterschiedliche Inzidenz des Prostatakarzinoms zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen [10]. Die Neuerkrankungsrate pro 100.000 Einwohner schwankt zwischen 10 in der asiatisch-pazifischen Region [11], 250 in der schwarzen US-Bevölkerung [12] und 120 in Deutschland (2007/2008) [13]. Als höchster Risikofaktor ist das Alter bekannt. Während der Tumor bei Patienten unter 40 Jahren eine Seltenheit darstellt, werden 75 % der Erkrankungsfälle bei Männern über 65 Jahren diagnostiziert [14]. Weitere Faktoren für die Entstehung des Prostatakarzinoms wie familiäre Häufigkeit, ethnische Herkunft, Ernährung, Infektionskrankheiten und Hormone konnten ebenfalls bisher bestimmt werden [15-17].

Die klinische Symptomatik der Patienten ist vom Stadium des Tumors abhängig. Frühe Stadien sind oft symptomlos, während später Obstruktionssymptome, Hämaturie oder Skelettbeschwerden durch Knochenmetastasen auftreten können. Die steigenden Inzidenzraten sind u.a. auf verbessertes Screening und Früherkennung zurückzuführen. Durch die Ende der 1980er-Jahre neu etablierte PSA-Bestimmung erfolgte statistisch gesehen eine Stadienverschiebung der diagnostizierten Prostatakarzinome [10, 18]. Während früher ein Großteil der Karzinome in einem organüberschreitenden Stadium befundet wurde, werden heute mehr lokal begrenzte Tumoren mit kurativer Therapieoption entdeckt. Der PSA-Wert ist ein Organmarker, weniger ein Tumormarker, da dieser neben Prostatakarzinom auch pharmakologisch bedingt bei anderen prostatistischen Erkrankungen (BPH, Prostatitis) oder urologischer Manipulation (Biopsie, DRU) erhöht sein kann. Anstelle des Normwertes von < 4 ng/ml wird inzwischen ein altersspezifischer Grenzwert definiert, was mit der steigenden PSA-Konzentration mit zunehmendem Alter begründet wird [8]. Männern ab dem 45. Lebensjahr wird außerdem die digital-rektale Untersuchung empfohlen, bei der durch das Rektum Knoten oder derbe Veränderungen der Prostata getastet werden können. Liegt eine PSA-Erhöhung oder ein suspekter digitorektaler Tastbefund vor, folgt nach der aktuellen S3-Leitlinie vom Dezember 2016 eine Stanzbiopsie unter transrektal-sonografischer Kontrolle und Antibiotikaphylaxe, bei der zehn bis zwölf Gewebezylinder entnommen werden [19]. Diese Gewebeproben werden histologisch untersucht und dienen gegebenenfalls der Stadieneinteilung des Malignoms.

95 % der Prostatatumoren stellen Adenokarzinome mit Ursprung vom azinären Prostataepithel dar. Seltene kleinzellige, neuroendokrine und sarkomatoide Karzinome sind von großer klinischer Relevanz, da beide eine äußerst ungünstige Prognose vorweisen [20-21].

Neben der TNM-Klassifikation und Beurteilung der Resektionsflächen gehört das *Grading* nach Gleason zu den drei wichtigsten prognostischen Kriterien weltweit [22]. Der sogenannte Gleason-Score beruht auf der histologischen Architektur des Drüsenmusters. Die zunehmende Entdifferenzierung des Tumors wird in fünf Muster eingeteilt (siehe Abb. 3). Liegen verschiedene Wachstumsmuster nebeneinander vor, wird die Summe aus dem häufigsten und zweithäufigsten Drüsenmuster ermittelt. Bei einheitlichem Differenzierungsgrad wird der Gleason-Grad verdoppelt.

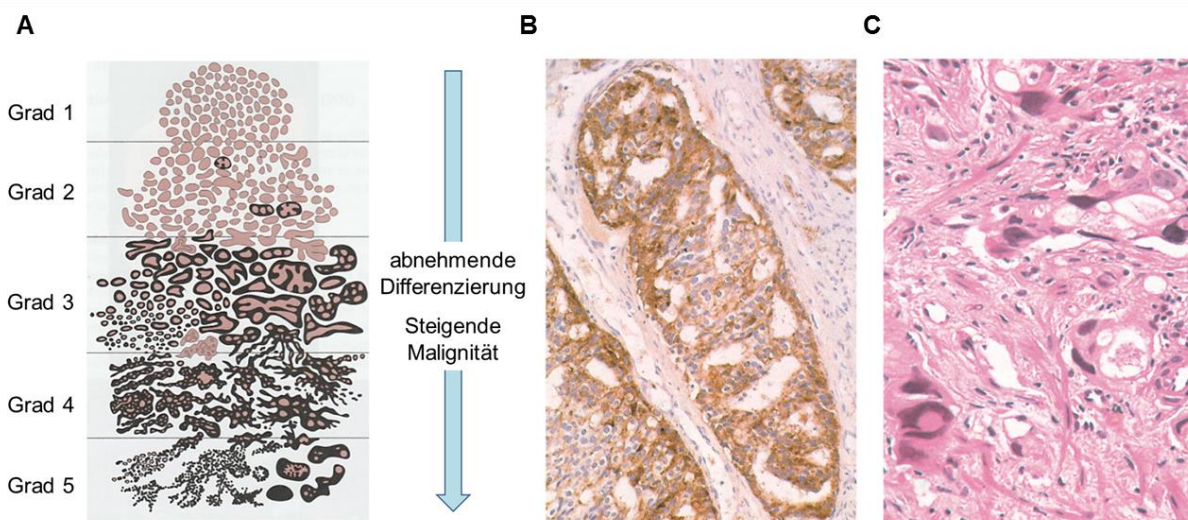


Abb. 3: Histologisches Grading nach Gleason des Prostatakarzinoms

A: Die fünf verschiedenen Drüsenmuster (modifiziert nach [22])

B: Kribriiformes Muster im Karzinom - Drüse in Drüse - entspricht einem Gleason-Grad 4, PSP-Immunhistologie (modifiziert nach [23])

C: Hoch malignes, niedrig differenziertes Karzinom mit ausgeprägter Kern- und Zellmorphologie entspricht einem Gleason-Grad 5, HE-Färbung (modifiziert nach [22])

Im Rahmen der TNM-Klassifikation werden die lokale Ausdehnung des Primärtumors (T), der regionäre Lymphknotenbefall (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) beurteilt. Dieses *Staging* dient der Auswahl einer entsprechenden Therapie sowie dem Treffen prognostischer Aussagen [10]. Das Prostatakarzinom breitet sich lokal und entlang der Nerven (perineural) aus und infiltriert im fortgeschrittenen Stadium umliegende Organe. Des Weiteren metastasiert es lymphogen primär in Lymphknoten der *Fossa obturatoria* sowie der Iliakalgefäße, später in präsakrale und inguinale Lymphknoten. Bei 85 % der an dieser Erkrankung verstorbenen Männer wurde eine hämatogene Streuung (osteoblastische Metastasen) in das Skelettsystem festgestellt [9]. Zur Entdeckung von Fernmetastasen in Knochen wird bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium eine Knochen-szintigrafie durchgeführt.

Die Therapieform richtet sich danach, in welchem Stadium die Erkrankung diagnostiziert wurde. Für Patienten mit einem auf die Prostata begrenzten Karzinom gibt es nach der aktuellen S3-Leitlinie verschiedene Behandlungsoptionen: radikale Prostatektomie, Strahlentherapie, Brachytherapie und Lymphadenektomie [19]. Die radikale Prostatektomie wird retropubisch, perineal laparoskopisch oder roboterassistiert operiert. Hierbei werden das gesamte Organ, die Samenblasen sowie regionäre Lymphknoten entfernt werden.

Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom wird eine hormonablative Therapie angeboten. Dieser Ansatz begründet sich auf biochemische Zusammenhänge von Hormonen und der Tumorprogression sowie der Tatsache, dass Eunuchen und Männer mit defekter 5 α -Reduktase kein Prostatakarzinom entwickeln [24-25]. Die Aktivität und das Wachstum der Prostata sind abhängig von endogenen Geschlechtshormonen. Das Androgen Testosteron wird durch die 5 α -Reduktase Typ-2 in den Stromazellen zu dem aktiven Metaboliten Dihydrotestosteron reduziert, welches an die gleichen Rezeptorproteine wie Testosteron bindet, jedoch mit höherer Affinität [6, 26-29]. Die biologische Aktivität nimmt durch die Umwandlung um etwa das Zweieinhalbfache zu [28]. Durch Bindung an den inaktiven Androgenrezeptor (AR) im Zytoplasma von Epithel- und Stromazellen der Prostata erfolgt eine Dissoziation der zuvor gebundenen Hitzeschockproteine (Hsp90). Der Hormon-Rezeptor-Komplex dimerisiert zu einem Homodimer, wird phosphoryliert und in dieser Form in den Zellkern transportiert, wo er an die DNA bindet und der Transkriptionsapparat aktiviert wird [28-29]. In diesen Signalweg wird bei der Hormonablation an verschiedenen Stellen mit Medikamenten eingegriffen. Die Therapieform ist jedoch rein palliativ und führt selten zu einer Remission. Ziel dabei ist die Prävention oder Verzögerung der Entwicklung eines hormonrefraktären Stadiums und eine möglichst lange Erhaltung der Hormonsensitivität des Tumors [10]. Nach einigen Jahren schreitet die Erkrankung fort und es bildet sich ein kastrationsresistentes Prostatakarzinom verbunden mit Veränderungen des Androgenrezeptors, wie Genamplifikationen, Überexpression des Proteins, Mutationen oder Phosphorylierungen [30-31].

1.3 Tumorproteinfamilie D52 und PC-1

1995 wurde das Tumorprotein D52 erstmals von Byrne *et al.* in Karzinomzellen und Fibroadenomen der Brustdrüse detektiert und beschrieben [32]. Später konnte durch weitere Untersuchungen gezeigt werden, dass TPD52 in anderen Geweben wie Lungen-, Prostata-, oder Ovarialtumoren überexprimiert vorkommt [33-36]. Die Gensequenz liegt auf dem Chromosom 8q21 und codiert für kleine hydrophile Polypeptide [37]. Die Proteinfamilie umfasst das Tumorprotein D52, D53, D54 und D55, welche alle ein *coiled-coil*-Motiv von 50 Aminosäuren zur Interaktion mit homologen und heterologen Molekülen sowie C- und N-terminale PEST-Sequenzen besitzen [37-39]. Durch alternatives Spleißen entstehen mehrere Isoformen der Tumorproteinfamilie [40-41]. Während die Transkriptvariante 3 (laut NCBI-Nomenklatur) von *TPD52* in verschiedenen Organen exprimiert wird, wurde die Transkriptvariante 1, auch *PC-1* oder *PrLZ* genannt, in der Prostata sowie in geringen Mengen in Drüsengeweben und im Gastrointestinaltrakt gefunden [35, 42]. Durch Dihydrotestosteron oder das synthetische Androgen R1881 kann die Proteinexpression von TPD52-Isoform 1 (PC-1) gesteigert werden, im Gegensatz dazu ist die Expression von TPD52-Isoform 3 Androgen-unabhängig [34-35].

Die Isoform 1 des Tumorproteins spielt bei der Proliferation und Tumorprogression eine entscheidende Rolle, indem es die AR- und PSA-Expression steigert [43-44]. Es wurde nachgewiesen, dass PC-1 sowohl in der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie als auch im Prostatakarzinom überexprimiert ist [35]. Durch AR-Transaktivierung unter Androgen-ablatierten Bedingungen und Aktivierung des Proteinkinase B/Akt-Signalweges begünstigt PC-1 die Entwicklung eines kastrationsresistenten Karzinoms [45-47]. Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass die Isoform 1 Interleukin-6-abhängig die neuroendokrine Transdifferenzierung beeinflusst, welche mit dem hormonrefraktären Stadium der Erkrankung assoziiert ist [44].

1.4 Arginase und Argininstoffwechsel

Die Arginase, ein 36 kDa schweres Enzym, hydrolysiert L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff. Bisher sind zwei Isoformen des Proteins bekannt, welche sich in ihren Organverteilungen, subzellulären Lokalisationen sowie den physiologischen Funktionen unterscheiden [48]. Die Arginase-1 (ARG1), welche vorwiegend im Zytoplasma von Hepatozyten aber auch in Zellen der Prostata vorkommt, dient als Bestandteil des Harnstoffzyklus der Entgiftung von Ammoniak im Körper. Die mitochondriale Arginase-2 (ARG2) wird in verschiedenen Geweben wie Niere, Prostata, Gehirn und Skelettmuskel exprimiert und ist an der Biosynthese von Polyaminen, Glutamat und Prolin sowie der Modulierung der Stickstoffmonooxidsynthese beteiligt [49-51].

In Prostatakarzinomen wurde eine erhöhte Arginase-Aktivität im Vergleich zu tumorfreiem Prostatagewebe beschrieben [51-53]. Außerdem konnte in Brust-, Darm- und Nierenzellkrebs festgestellt werden, dass hohe Arginase-Aktivität mit steigender Proliferation korreliert [54-57]. Als Enzym des Polyaminsyntheseweges produziert Arginase Ornithin, welches Ausgangspunkt für die Bildung von Putrescin, Spermidin und Spermin darstellt (siehe Abb. 3) [28]. Diese Polyamine werden zur Zellteilung und Differenzierung benötigt. Shipper *et al.* konnten 2003 zeigen, dass die Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit Polyaminanaloga oder Inhibitoren der Enzyme des Polyaminstoffwechsels zum Arrest des Zellwachstums und zum Zelltod führt [58]. Erst kürzlich wurde Rosuvastatin mit protektiven Wirkungen auf Brustkrebsentwicklung beschrieben. Als ein vielversprechendes Antikrebsmedikament hemmt das Statin die Arginase-Aktivität und Polyaminbildung [59]. Weitere Studien konnten zeigen, dass Hemmung bzw. Verminderung der Arginase mit Hilfe von siRNA, Epilobiumextrakten (Weidenröschen) oder anderen Substanzen zu sinkenden Proliferationsraten führt [57, 60-61].

Des Weiteren spielt das Enzym Arginase eine Rolle bei der Immunsuppression in Tumorgeweben, indem unter Argininmangel, induziert durch enzymatische Umsetzung zu Ornithin, die T-Zellproliferation und NO-vermittelte Zytotoxizität gehemmt werden [62-64]. Rotondo *et al.* konnten nachweisen, dass Arginase-1 in segmentkernigen, neutrophilen Granulozyten gespeichert wird und nach Aktivierung der Zellen über Exozytose der Granula in den Extrazellularraum gelangt [65-66]. In vielen Studien wurde die Arginase im Zusammenhang mit Makrophagen untersucht. ARG2 ist mit Funktionen von proinflammatorischen M1-Makrophagen assoziiert, wohingegen ARG1 vorwiegend in antiinflammatorischen M2-Makrophagen von Bedeutung ist und weitgehend als M2-Marker dient [67-68]. Ein Ungleichgewicht des M1/M2-Verhältnisses trägt zur Pathogenese einiger entzündlicher bzw. entzündungsassoziierter Erkrankungen wie Karzinom, Infektion oder Adipositas bei [69-70].

Arginin, eine proteinogene, semiessentielle, basische Aminosäure mit einer Guanidino-Gruppe in der Seitenkette, ist an verschiedenen biochemischen Prozessen im Körper beteiligt. Hierzu zählen Proteinsynthese, Synthese von Stickstoffmonooxid in Endothelien sowie Biosynthese von Kreatin und Polyaminen [28, 71-72]. Im Harnstoffzyklus wird Arginin durch die Arginase hydrolytisch zu Ornithin und Harnstoff gespalten. Der entstandene Harnstoff wird anschließend über die Nieren im Urin ausgeschieden, während Ornithin, eine nichtproteinogene Aminosäure, im Harnstoffzyklus durch Umsetzung zu Citrullin wiederverwendet werden kann. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Ornithintranscarbamylase (OTC) im Mitochondrium. Die Argininosuccinatsynthetase (ASSY) und Argininosuccinatyase (ASL) wandeln Citrullin über Argininosuccinat schließlich in Arginin um (siehe Abb. 4) [28, 72].

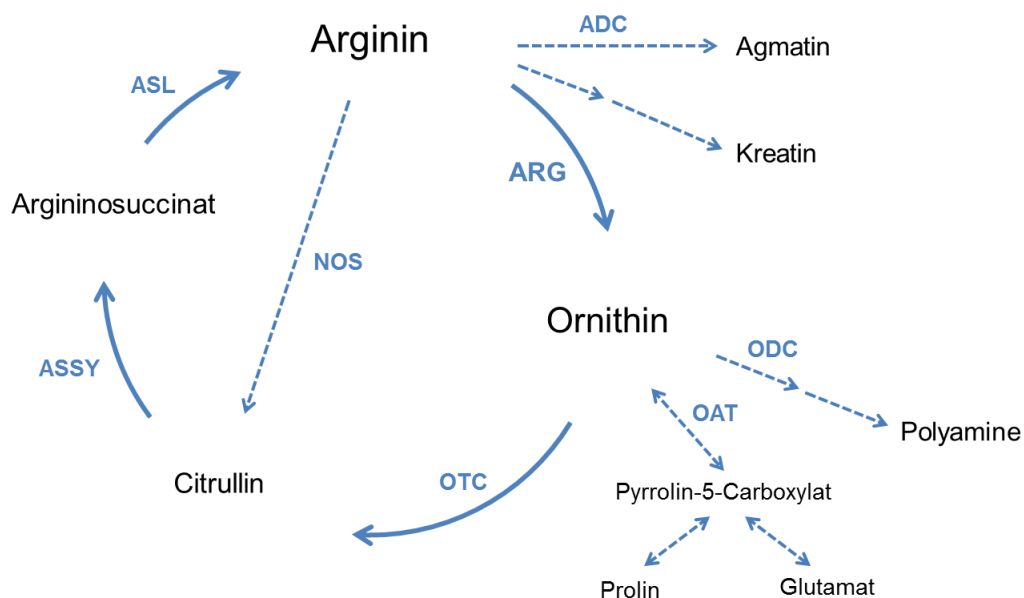


Abb. 4: Argininstoffwechsel

ADC, Arginindecarboxylase; ARG, Arginase; ASL, Argininosuccinatyase; ASSY, Argininosuccinatsynthetase; NOS, Stickstoffmonoxidsynthase; OAT, Ornithinaminotransferase; ODC, Ornithindecaboxylase; OTC, Ornithintranscarbamylase

Des Weiteren geht die Synthese der für die Zellproliferation notwendigen Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin mit Hilfe des Enzyms Ornithindecaboxylase (ODC) von Ornithin aus [73]. Über die Arginindecarboxylase (ADC) und Agmatinase existiert ein zweiter Weg der Polyaminbiosynthese [74]. Die Ornithinaminotransferase (OAT) ist an der Umwandlung von Ornithin in Glutamat und Prolin beteiligt, letzteres wird zur Kollagenbiosynthese benötigt [75-76]. Mumenthaler *et al.* konnten 2008 zeigen, dass die OAT und ARG2 im umgekehrten Verhältnis in verschiedenen Prostatakrebszelllinien exprimiert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass erhöhte OAT-Expression zur Kompensation der Ornithinbildung im Polyaminstoffwechselweg bei geringer ARG2-Expression dient [51].

1.5 Zielstellung

Arginase-1 fördert mit seinen immunsupprimierenden Eigenschaften und der Bildung von Polyaminvorläufern die Proliferation in verschiedenen Tumorgeweben. Die entscheidende Rolle von PC-1 bei der Proliferation und Tumorprogression des Prostatakarzinoms konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden. Sowohl der Einfluss dieses Proteins auf Prostatakrebszellen als auch genaue Mechanismen des Androgen-abhängigen und Androgen-unabhängigen Wachstums sind bis heute nicht vollständig geklärt. Beide Proteine, PC-1 und ARG1, sind im Prostatakarzinom überexprimiert und beeinflussen auf noch unklare Weise das Verhalten des Tumors.

Neben den Möglichkeiten der Analyse des Prostatakarzinoms anhand von Patientenmaterial stellt die Nutzung von Modellzelllinien eine etablierte Methode dar, gewonnene Erkenntnisse zu verifizieren und Funktionsanalysen durchzuführen. In den am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie in Greifswald angefertigten Graduierungsarbeiten (Diplomarbeit von Marika Klein und Bachelorarbeit von Paula Heinke) wurde mit Hilfe von *Pulldown*-Experimenten das Enzym Arginase-1 als möglicher Interaktionspartner von PC-1 identifiziert [77-78].

Basierend auf den Erkenntnissen der Interaktionsstudien in der Modellzelllinie LNCaP des humanen Prostatakarzinoms sollen unter Androgen-ablatierten Zellkulturbedingungen die Expressionsprofile von PC-1, Arginase-1 und weiteren Enzymen des Argininstoffwechsels auf mRNA- und Proteinebene vergleichend quantifiziert werden. Zur Verifizierung der Interaktion soll mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz an fixierten Zellen sowie der Co-Immunpräzipitation eine Kollokalisierung von PC-1 und Arginase-1 nachgewiesen werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Firma, Ort
Agarosegelkammer mit Zubehör (Kämme, Gießstand, Gelträger)	Armin Baack Labor- und Medizintechnik, Schwerin
BioPhotometer Spectrophotometer UV/VIS	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Block-Thermostat QBT4	Grant Instruments, Cambridge
CFX96™ C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eppendorf® Mastercycler personal	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Eppendorf Reference® 2	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
EVOS® XL Core Imaging System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Feinwaage BP160P	Sartorius, Göttingen
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim
Gel Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Gelelektrophoresekammer mit Zubehör (Kämme, Glasplatten, Dichtungsgummis)	Biometra, Göttingen
Heizblock QBT 4	Grant Instruments Ltd, Royston, Großbritannien
Helios Beta Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heracell 240 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Konfokal-Mikroskop, Leica TCS SP5	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Magnetrührer IKA-RH basic 2	IKA® Werke, Staufen
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach

Mikroskop, Telaval 3	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Mikrowelle, MW 7803 silber	Severin, Sundern
Mikrozentrifuge, Micro Star 17R	VWR International GmbH, Darmstadt
Milli-Q®-Anlage Millipore	Merck Millipore, Billerica, USA
Mono-Mixer	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
pH-Meter FE20-FiveEasy™	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Pipettierhelfer pipeo®	Vitlab, Großostheim
Pumpe	Laborbedarf Erich Wiegand GmbH, Hamburg
Rollinkubator, RM5	Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim
Röntgenkassette, CURIX	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Scanner, ViewPix 1100	Biostep GmbH, Jahnsdorf
Semi-Dry Blotter	Armin Baack Labor- und Medizintechnik, Schwerin
Spectrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermo-Shaker TS-100	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tischzentrifuge, MR1822	Jouan GmbH, Unterhaching
Transferpetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Uniequip Unitwist RT	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg
Unipack 250 Power supply Stromgerät	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg
Universal 320 R	HETTICH AG, Bäch, Schweiz
Universal Schwenkmischer SM	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Vortexer LabDancer	VWR International GmbH, Darmstadt
VWR® PCR plate spinner	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage, PT1200	Sartorius, Göttingen

Wasserbad WiseCircu	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Wipp-Schüttler 3013	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
xRF & RFS Model, Flake Ice Machine	Manitowoc Company Inc., Manitowoc, USA
Zellkultur-Sicherheitswerkbank Maxisafe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Verbrauchsmaterialien

Materialien	Firma, Ort
15 ml-Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
50 ml-Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
<i>Amersham™ Protran™ 0.2 µm Nitrocellulose Blotting Membrane</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
<i>Biosphere®</i> Filterspitzen 20 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
BZO Adhesive Optical Seal Film	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Extra Thick Western Blotting Filter Paper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Filterpapier	Whatman GmbH, Dassel
Handschuhe Peha-soft Nitrile	Paul Hartmann AG, Heidenheim
<i>Low binding SafeSeal-Tips professional</i> Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
PCR 96-Well TW-MT-Platte, weiß	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
PCR SoftTubes, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen ohne Filter 10 µl, 250 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
ratiolab® Pipettenspitzen Makro II 5.000 µl	Ratioloab GmbH, Dreieich
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röntgenfilme	CAE, Hamburg

Rotilab® Einmalküvetten 1,6 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotilabo®-Reagenzröhrchen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Serologische Pipetten steril, 5 ml, 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SpinTrap (IP-Säulen)	GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Schweiz
<i>SuperFrost</i> ® Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Superior Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
<i>SurPhob SafeSea</i> ® LOW BINDING Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatten 6-Well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturschalen 35, 60, 100 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellschaber 30 cm	TPP, Trasadingen CH

2.1.2 Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Chemikalie	Firma, Ort
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	Kallies Feinchemie AG, Sebnitz
CHAPS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Complete</i> TM Mini Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka Chemie GmbH, Buchs

DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DEPC	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMSO steril	AppliChem GmbH, Darmstadt
Doxycyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald
Ethanol, vergällt	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerol, 87 %	GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Schweiz
Guanidin-Hydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Harnstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
α -Isonitrosopropiophenon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Laborchemie Apolda GmbH, Apolda
Kaliumphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
L-Arginine Hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat-7-hydrat	Laborchemie Apolda GmbH, Apolda
Methanol	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald
Natriumazid (NaN_3)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumdeoxycholat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumvanadat	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
<i>Nonidet</i> [®] <i>P-40</i> (NP-40)	Fluka Chemie GmbH, Buchs
ortho-Phosphorsäure, 85 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
R1881	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure (HCl), 37 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Schwefelsäure, 96 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thioharnstoff	Merck KGaA, Darmstadt
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton [®] X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Gebrauchsfertige Lösungen

Lösung	Firma, Ort
6 × DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Acrylamidlösung Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dako Fluorescent Mounting Medium	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dulbecco's PBS, steril	GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Schweiz
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
Fetales Kälberserum, c.t.	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
G153A, B Developer (Entwickler)	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
G354 Rapid Fixierer	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
<i>GeneRuler™ DNA Ladder Mix</i>	Fermentas-Thermo Scientific, Schwerte
<i>ImmunoPure® Immobilized Protein A</i> (Protein A-Sepharose-Beads)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
jetPRIME® Transfection Reagent	Polyplus transfection SA, Illkirch, Frankreich
jetPRIME® buffer	Polyplus transfection SA, Illkirch, Frankreich
5 × M-MLV-Puffer	Promega Corporation, Madison
M-MLV-RTase (200 U/μl)	Promega Corporation, Madison
Oligo-d(T)15-Nukleotid	Invitrogen, Carlsbad
<i>PageRuler™ Unstained Protein Ladder</i>	Fermentas-Thermo Scientific, Schwerte
Paneticin G418	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100 ×)	PAA Laboratories, Piscataway, USA
<i>peqGOLD TriFast™</i>	Peqlab, Erlangen
pH Puffer-Lösungen HI 7009, 7006, 7004	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
<i>RedSafe™</i> (100.000 ×)	IntRON Biotechnology, Seongnam Korea
<i>Restore™ Western Blot Stripping Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

<i>RNasin[®] Plus</i> (40 U/μl), RNase Inhibitor	Promega Corporation, Madison
<i>Roti[®]Block</i> (10 x)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Roti[®]Blot A</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Roti[®]Blot K</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Gel 30 (Acrylamid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 mit Phenolrot	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
RPMI 1640 ohne Phenolrot	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
<i>SensimixTM SYBR[®] Hi-ROX</i>	Bioline GmbH, Luckenwalde
Sodium Pyruvate (100 mM)	GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Schweiz
<i>SuperSignalTM West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin EDTA (10 x)	PAA Laboratories, Piscataway, USA
<i>Tween[®]20</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinien	Firma, Ort
LNCaP	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig
LNCaP-PC-1	LNCaP (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim) stabil transfiziert mit prtTAneo-PC-1; ermöglicht Doxycyclin-induzierte Überexpression von PC-1 (im Institut etabliert, zur Nutzung zur Verfügung gestellt)

LNCaP-Zellen sind hormonsensitive, humane Prostatakarzinomzellen und entstammen der linken supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Mannes (Ethnie: Kaukasier) aus dem Jahr 1977.

Kulturmedien	Zusammensetzung
Vollmedium für LNCaP-Zellen (Standardmedium; STM)	RPMI-1640 mit Phenolrot 20 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Androgen-freies Medium für LNCaP-Zellen (<i>charcoal-treated</i> Medium; CTM)	RPMI-1640 ohne Phenolrot 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes c.t. FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Vollmedium für LNCaP-PC-1-Zellen (Standardmedium; STM-PC-1)	RPMI-1640 mit Phenolrot 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS 1 mM Natrium-Pyruvat (<i>Sodium Pyruvate</i>) 300 µg/ml Paneticin G418
Androgen-freies Medium für LNCaP-PC-1-Zellen (<i>charcoal-treated</i> Medium; CTM-PC-1)	RPMI-1640 ohne Phenolrot 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes c.t. FCS 1 mM Natrium-Pyruvat 300 µg/ml Paneticin G418

2.1.4 Plasmide und Primer

Plasmide

pEYFP-N-PC-1	im Institut etabliert, zur Nutzung zur Verfügung gestellt
pcDNA3.1 (+)	im Institut etabliert, zur Nutzung zur Verfügung gestellt

Primer

Genname	Kürzel	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur	Produktlänge
<i>Arginase-1</i>	<i>ARG1</i> for	TTG GCT TGA GAG ACG TGG AC	65 °C	394 bp
	<i>ARG1</i> rev	CGA GCA AGT CCG AAA CAA GC		
<i>Arginase-2</i>	<i>ARG2</i> for	GAA TCC ACG CTC AGT GGG TC	65 °C	359 bp
	<i>ARG2</i> rev	AAT GTT CAG GAG GGT CCA CG		
<i>Arginin-decarboxylase</i>	<i>ADC</i> for	GAG ATG GAG TTG GTC CAG CAT	56 °C	179 bp
	<i>ADC</i> rev	AGA ACC ATC TTG GCA CTG GG		
<i>Argininosuccinatlase</i>	<i>ASL</i> for	AAG CGG ATC AAT GTC CTG CC	65 °C	318 bp
	<i>ASL</i> rev	CCG GAT CAG CTC CAA ACT GT		
<i>Argininosuccinatsynthetase</i>	<i>ASSY</i> for	GAG GGG GCC AAG TAT GTG TC	65 °C	268 bp
	<i>ASSY</i> rev	GGT TCT CCA GGA TTC CAG CC		
<i>Ornithinamino-transferase</i>	<i>OAT</i> for	GGC TGG AGA GAC TGC CTG TA	65 °C	259 bp
	<i>OAT</i> rev	TTC TAC CAT GAA CGC AGC CA		
<i>Ornithin-decarboxylase</i>	<i>ODC</i> for	GTT TGA CTG CCA CTT CCT CG	65 °C	177 bp
	<i>ODC</i> rev	GCA TAA AAG GGG GTG ACA CG		
<i>Ornithin-transcarboxylase</i>	<i>OTC</i> for	TGG CTG ATT ACC TCA CGC TC	56 °C	261 bp
	<i>OTC</i> rev	ATA CAT TGC CTC CAT GCG CT		
<i>Tumorprotein D52 IF1 (PC-1)</i>	<i>PC-1</i> for	CCG GAT CAC CTA CTC TTC AG	60 °C	371 bp
	<i>PC-1</i> rev	GAT GAC TGA GCC AAC AGA CG		

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Firma, Ort
anti-TBA	Maus	1:50.000		Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-ARG1	Kaninchen	1:5.000	1:20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
anti-ARG2	Kaninchen	1:10.000	1:20	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
anti-ASSY	Maus	1:50.000	1:5.000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
anti-CREB	Kaninchen	1:1.000		Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-OAT	Kaninchen	1:2.000	1:100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
anti-OTC	Kaninchen	1:1.500	1:20	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
anti-PC-1	Kaninchen	1:1.000	1:100	institutseigen, hergestellt von Tom Moritz
IgG	Kaninchen			Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA

Sekundärantikörper

Antikörper	gekoppeltes Enzym	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Firma, Ort
anti-Kaninchen IgG	Meerrettich- peroxidase	1:10.000, 1:15.000		Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main
anti-Maus IgG	Meerrettich- peroxidase	1:10.000, 1:15.000		Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main

anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 488	1:500	Life Technologies, Carlsbad, USA
anti-Maus IgG	Alexa Fluor® 488	1:500	Abcam, Cambridge, Großbritannien
anti-Kaninchen IgG	Cy3®	1:500	Jackson ImmunoResearch, Suffolk Großbritannien

2.1.6 Software

Software	Firma, Ort
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin
<i>CFX Manager™</i> Software Version 2.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>GraphPad PRISM®</i> Version 6.03	GraphPad Software, La Jolla, USA
ImageJ	National Institute of Health, Bethesda, USA
Intas GDS ²	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Leica Application Suite X	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
NanoDrop 2000	Fermentas-Thermo Scientific, Schwerte
ViewPixControl	Biostep GmbH, Jahnsdorf

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivieren und Passagieren der Zellen

Das Kultivieren der Prostatakarzinomzellen erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen in einem Begasungsbrutschrank mit konstantem Milieu von 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre. Die Zellen wurden im Abstand von drei bis vier Tagen nach Erreichen einer Konfluenz von 80 bis 90 % passagiert. Sowohl die Zellkulturmedien als auch 2 × Trypsin wurden im Wasserbad vor Verwendung auf 37 °C erwärmt.

Nach Absaugen des Mediums wurde der Zellrasen mit 7 ml DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden eine Inkubation mit 2 ml 2 × Trypsin für 3 min im Brutschrank. Die Trypsin-Aktivität wurde mit 12 ml Kulturmedium abgestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und 5 min bei 1.500 rpm und 25 °C zentrifugiert. Dem Absaugen des Überstandes folgte eine Zugabe von 2 bis 4 ml Medium (je nach Splittungsverhältnis) und gründliches Resuspendieren der Zellen. 1 ml dieser Zellsuspension wurde für die Aussaat in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche mit 25 ml frischem Medium verwendet.

Standardmedium für LNCaP-Zellen: RPMI-1640 mit Phenolrot, 20 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Charcoal-treated Medium für LNCaP-Zellen: RPMI-1640 ohne Phenolrot, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes c.t. FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Standardmedium für LNCaP-PC-1-Zellen: RPMI-1640 mit Phenolrot, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 300 µg/ml Paneticin G418

Charcoal-treated Medium für LNCaP-PC-1-Zellen: RPMI-1640 ohne Phenolrot, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes c.t. FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 300 µg/ml Paneticin G418

Androgenablation

Zur Beurteilung des Einflusses von Androgenen auf die Prostatakarzinomzellen wurde anstelle des FCS-haltigen Standardmediums (STM) ein hormonfreies, *charcoal-treated* FCS-Medium (CTM) zum Kultivieren verwendet. Die Zugabe von 0,5 nM des synthetischen Androgens R1881 in DMSO ermöglichte eine definierte Dosierung im Vergleich zu Versuchen in Standardmedium. Zur Kontrolle erfolgte ein Ansatz mit DMSO ohne das Hormon R1881.

Charcoal-treated Medium für LNCaP-Zellen: RPMI-1640 ohne Phenolrot, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes c.t. FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Charcoal-treated Medium für LNCaP-PC-1-Zellen: RPMI-1640 ohne Phenolrot, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes c.t. FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 300 µg/ml Paneticin G418

Induzierbare Überexpression von PC-1

Für die induzierbare Überexpression von PC-1 wurde mit stabil transfizierten LNCaP-PC-1-Zellen gearbeitet. Die in Standardmedium kultivierten Zellen wurden für Experimente in Androgen-freies *charcoal-treated* Medium umgesetzt. Zur Induktion der Überexpression von PC-1 wurden den Zellen 0,5 ng/ml Doxycyclin in 50 % Ethanol zugesetzt und eine Kontrolle mit gleicher Menge Lösungsmittel mitgeführt.

Standardmedium für LNCaP-PC-1-Zellen: RPMI-1640 mit Phenolrot, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 300 µg/ml Paneticin G418

Charcoal-treated Medium für LNCaP-PC-1-Zellen: RPMI-1640 ohne Phenolrot, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes c.t. FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 300 µg/ml Paneticin G418

Transiente Transfektion von LNCaP-Zellen

Die transiente Transfektion von LNCaP-Zellen war Basis für eine mikroskopbasierte Kolokalisationsanalyse von Arginase-1 und PC-1 in LNCaP-Zellen. Dazu wurden die Zellen in CTM auf Deckgläsern kultiviert und mit den Plasmiden pEYFP-N-PC-1 und pcDNA3.1(+) transfiziert. Das Einbringen der DNA wurde mit dem Transfektionsreagenz *jetPRIME*[®] nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz wurden 2 µg DNA bestehend aus 0,2 µg pEYFP-N-PC-1 und 1,8 µg pcDNA3.1 eingesetzt. Nach dreitägiger Inkubation fand die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Arginase-1 statt. Zur Detektion der Expression des gelb fluoreszierenden Fusionsproteins EYFP-PC-1 und der indirekten Immunfluoreszenz von ARG1 in den Prostatakrebszellen wurde ein Konfokal-Mikroskop verwendet. Die Auswertung der Bilder zur Kolokalisationsanalyse erfolgte mit der ImageJ Erweiterung JACoP [79].

2.2.2 Zellernte und Zellyse

*TriFast*TM-Präparation

Zur Gewinnung von RNA, genomischer DNA und Proteinen aus den Zellen wurde das Reagenz *peqGOLD TriFast*TM verwendet. Die Zugabe von Chloroform und die anschließende Zentrifugation führen zur einer Auftrennung des Homogenats in drei Phasen. Die obere, wässrige Phase enthält RNA, die Interphase genomische DNA und die organische, phenolrote Phase Proteine.

Aufgrund der geringen Adhärenz wurden die Zellen vor der Lyse dreimal in Suspension mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dafür bei 3.000 rpm und 25 °C für 3 min zentrifugiert und anschließend mit 1 ml PBS resuspendiert. Das Zellpellet wurde für 5 min mit 0,5 ml *peqGOLD TriFast*TM inkubiert und danach mit 0,1 ml Chloroform versetzt. Nach sofortigem Invertieren und Inkubation über 3 min auf einer Wippe schloss sich ein 15-minütiger

Zentrifugationsschritt bei 12.000 × g und 4 °C an. Alle weiteren Zentrifugationen erfolgten unter den gleichen Bedingungen, sofern nicht anders angegeben. Das Zellysate trennte sich in drei Phasen auf.

Zur Gewinnung der RNA wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Isopropanol durch Invertieren gefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und 10 min Zentrifugieren wurde das entstandene RNA-Pellet zweimal mit 75 %-igem Ethanol gewaschen und 3 min bei 7.500 × g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet unter einem Abzug getrocknet. Es folgte eine Zugabe von 20 bis 50 µl DEPC-Wasser je nach Größe des RNA-Pellets. Über Nacht bei 4 °C wurde die RNA in diesem RNase-freien Wasser gelöst.

Bei der Protein-Präparation wurden die zwei verbliebenen Phasen mit 150 µl Ethanol versetzt und die genomische DNA durch Invertieren gefällt. Nach 3 min Inkubation auf einer Wippe schloss sich ein zweiminütiger Zentrifugationsschritt an. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,75 ml Isopropanol, sofortiges Invertieren und 20 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Fällung der Proteine. Anschließend wurde die Probe 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das entstandene Proteinpellet viermal mit 1,5 ml Guanidin-HCl-Lösung für 20 min gewaschen. Jedem Waschschrift folgte eine zweiminütige Zentrifugation. Die Pellets wurden analog noch zweimal mit 1,5 ml Ethanol gewaschen und danach unter dem Abzug getrocknet. Je nach Größe der Protein-Pellets wurden sie in 30 bis 180 µl 2D-Lysispuffer gelöst und bei - 20 °C aufbewahrt.

1 × PBS: 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, in *A. deionisata*, autoklaviert

DEPC-Wasser: 0,1 % (v/v) DEPC in *A. deionisata*, bei Raumtemperatur 24 h inkubiert, autoklaviert

Guanidin-HCl-Lösung: 0,3 M Guanidin-HCl in 95 %-igem Ethanol

2D-Lysispuffer: 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 40 mM Tris Base, in *A. deionisata*

Zellernte mit RIPA-Puffer

Bei der Zellernte mit RIPA-Puffer wurden aus LNCaP-Zellen Gesamtproteinlysate gewonnen. Nach Kultivierung der Zellen in einer 100 mm-Schale wurde das Medium abgesaugt, PBS zugegeben und der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Anschließend wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3.000 rpm und 25 °C für 3 min zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1 ml PBS im Reaktionsgefäß. Der Überstand konnte abgenommen und das Pellet in 200 bis 250 µl RIPA-Puffer gelöst werden. Nach einmaligem Einfrieren bei - 80 °C und Auftauen wurden die Zelltrümmer bei 16.000 × g durch eine fünfminütige Zentrifugation pelletiert, sodass der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden konnte. Dieses Proteinlysate wurde bei - 20 °C aufbewahrt.

1 × PBS: 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, in *A. deionisata*, autoklaviert

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM Na-EDTA, 0,5 % (v/v) NP-40, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (w/v) Na-deoxycholat, 0,5 % (w/v) SDS, 1 mM Na₃VO₄, 0,5 % (w/v) *Complete*TM Mini, 50 mM NaF, in *A. deionisata*

Zellfraktionierung

Zur Untersuchung der Lokalisation von Proteinen in der Zelle wurde eine Zellfraktionierung nach Schreiber [80] durchgeführt, bei der eine Zytoplasma- und eine Zellkernfraktion gewonnen wurden. Nach Lyse der Zellen in einem hypotonen Puffer für die Proteine im Zytoplasma konnten anschließend die Kernproteine in einem hypertonen Puffer extrahiert werden. Alle Schritte der Methode mussten auf Eis durchgeführt und die verwendeten Lösungen vorgekühlt werden. Kurz vor Verwendung wurden die Lagerlösungen von Puffer A und Puffer C mit *Complete*TM Mini EDTA-free, PMSF und DTT versetzt.

LNCaP-Zellen wurden 3 Tage in einer 100 mm-Schale kultiviert und nach Absaugen des Mediums zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zellernte mit PBS und einem Zellschaber in ein 2 ml Reaktionsgefäß. Die Zellen wurden in einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 800 × g sedimentiert.

Bei der Gewinnung der Zytoplasmafraktion wurde das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 400 µl Puffer A resuspendiert. Einer Inkubation von 20 min auf Eis folgte die Zugabe von 25 µl 10 %-igem NP-40 und sofortiges Invertieren für 60 s. Anschließend wurde das Lysat 30 s bei 9.300 × g zentrifugiert und der Überstand mit den enthaltenen zytoplasmatischen Proteinen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zur Gewinnung der Kernfraktion erfolgte nach dreimaligem Waschen des verbliebenen Pellets mit 400 µl Puffer A durch zweiminütige Inkubation die Zentrifugation bei 9.000 × g für 60 s. Das Pellet wurde in 80 µl Puffer C resuspendiert. Während der sich anschließenden 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat alle 2 min kräftig durchmischt. Im letzten Schritt der Fraktionierung konnte nach 5 min Zentrifugation bei 16.000 × g der Überstand mit den Kernproteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Die Aufbewahrung der Zytoplasma- und Kernfraktion erfolgte bei - 20 °C.

Lagerlösung Puffer A: 10 mM HEPES (pH 7,9), 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA (pH 8,0), in *A. deionisata*

Puffer A: 0,5 % (w/v) *Complete*TM Mini EDTA-free, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, in Lagerlösung Puffer A

10 %-iges NP-40: 10 % (v/v) NP-40, in *A. deionisata*

Lagerlösung Puffer C: 20 mM HEPES (pH 7,9), 420 mM NCl, 25 % (v/v) Glycerol, 0,2 mM EDTA (pH 8,0), in *A. deionisata*

Puffer C: 0,5 % (w/v) *Complete*TM Mini EDTA-free, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, in Lagerlösung Puffer C

2.2.3 Molekularbiologische Methoden - Nukleinsäureanalytik

Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach der *TriFast*TM-Präparation erfolgte die Konzentrationsbestimmung der im DEPC-Wasser gelösten RNA mit Hilfe des Spectrophotometers NanoDrop 2000c.

Zuerst wurde ein Leerwert durch Messung von 2 µl DEPC-Wasser definiert. Die Proben wurden gut gemischt und 2 µl auf die Messoberfläche pipettiert. Die Messung erfolgte bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gegen den Leerwert. Die RNA-Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz von der Software berechnet.

DEPC-Wasser: 0,1 % (v/v) DEPC in *A. deionisata*, bei Raumtemperatur 24 h inkubiert, autoklaviert

cDNA-Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase wird die bei der *TriFast*TM-Präparation gewonnene RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dabei werden 1,5 µg RNA mit 1 µl Oligo-d(T)15-Nukleotid als Primer (0,5 µg/µl) und entsprechendem Volumen DEPC-Wasser auf 13,5 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 5 min bei 65 °C im Heizblock denaturiert, abgekühlt und mit 6,5 µl Reaktionsansatz bestehend aus 4 µl 5 × M-MLV-Puffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,5 µl *RNasin*[®] *Plus* sowie 1 µl M-MLV-RTase versetzt. Nachfolgend wurde für eine Stunde bei 42 °C und dann für 10 min bei 70 °C im PCR-Cycler inkubiert. Die 20 µl Probe mit der neu synthetisierten cDNA wurden mit 180 µl *A. deionisata* verdünnt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei - 20 °C aufbewahrt.

DEPC-Wasser: 0,1 % (v/v) DEPC in *A. deionisata*, bei Raumtemperatur 24 h inkubiert, autoklaviert

dNTP-Mix: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, in *A. deionisata*

Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Bei der qPCR wird über Fluoreszenzfarbstoffe die exponentielle Vervielfältigung von DNA und damit die Menge von PCR-Produkten bestimmt. Für die Messung wurde SYBR-Green als Farbstoff verwendet, der nach Interkalation mit doppelsträngiger DNA Licht emittiert.

In eine 96-Well-Platte wurden 2,5 µl verdünnter cDNA der Proben vorgelegt und 12,5 µl Mastermix zugesetzt. Dieser beinhaltete 7,5 µl *Sensimix*TM *SYBR*[®] *Hi-ROX*, 1,5 µl Primer mit einer Konzentration von 5 µM (*forward* und *reverse*) und 3,5 µl *A. deionisata*. Für jeden Mastermix wurde auf der gleichen PCR-Platte eine Negativkontrolle (*A. deionisata* statt cDNA) mitgeführt. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der jeweiligen Primerpaare wurde vorher ermittelt.

Nach Versiegelung der Platte mit einer durchsichtigen Folie erfolgte die qPCR im CFX96TM C1000 TouchTM Thermal Cycler. Das Protokoll bestand aus mehreren Phasen,

beginnend mit einer Initialisierung zur Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95 °C für 10 min. Die anschließenden Schritte der Denaturierung bei 95 °C für 10 s, Anlagerung der Primer für 15 s und Elongation bei 72 °C für 20 s wurden 44 Mal wiederholt. Nach jeder Elongation wurde das Fluoreszenzsignal detektiert.

Zum Nachweis des Amplicons wurde nach Abschluss der PCR die Schmelzkurve der DNA ermittelt. Dabei erfolgte nach einer Denaturierung bei 95 °C für 20 s ein Absenken auf *Annealing*-Temperatur gefolgt von einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur um 0,5 °C alle 5 s. Während dieser Zeit wurden die Fluoreszenzsignale kontinuierlich gemessen. Die Auswertung konnte mit Hilfe der Software *CFX Manager™* 2.0 durchgeführt werden. Die Proben wurden gegen das *House-keeping-Gen TATA-box-binding protein (TBP)* normalisiert.

Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hier wurde sie für den Nachweis der korrekten Amplicongröße genutzt. Bei dieser Methode wurde stets ein 1,5 %-iges Agarose-Gel verwendet.

Für das Gel wurden 0,75 g Agarose in 50 ml 1 × TAE in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen erwärmt. Nach zehnmütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurde *RedSafe™* im Verhältnis von 1:100.000 hinzugegeben und das Gel luftblasenfrei in einen Gelträger mit entsprechendem Kamm gegossen. Während der Polymerisation konnten die Proben vorbereitet werden.

Dabei wurden 15 µl der zu untersuchenden qPCR-Proben mit 3 µl 6 × *DNA Loading Dye* versetzt und gut gemischt. Nach Entfernen des Kammes aus dem Gel wurde der Gelträger mit dem polymerisierten Gel in eine Laufkammer eingesetzt und diese mit 1 × TAE gefüllt. Der Marker *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (6 µl) sowie die Probengemische (10 µl) wurden auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V. Anschließend wurden die unter UV-Licht sichtbaren Banden mit dem Intas-System visualisiert und überprüft.

1 × TAE: 40 mM Tris Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA (pH 8,0), in *A. deionisata*

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationen der in 2D-Lysispuffer gelösten Proteine wurden mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt [81]. Der im Bradfordreagenz enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verschiebt sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm nach Komplexbildung mit Proteinen. Unter Verwendung einer Standardreihe kann die Konzentration der Probelösung aus der photometrischen Messung berechnet werden, da sich die Proteinkonzentration direkt proportional zur Extinktion bei 595 nm verhält. Die Standardreihe wurde anhand des in Tabelle 1 dargestellten Pipettierschemas vorbereitet.

Tab. 1: Pipettierschema der Standardreihe bei der Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinmenge	BSA- Stammlösung (0,2 µg/µl)	<i>A. deionisata</i>	2D-Lysispuffer	Bradfordreagenz
0 µg	0 µl	98 µl	2 µl	1,5 ml
2 µg	10 µl	88 µl	2 µl	1,5 ml
4 µg	20 µl	78 µl	2 µl	1,5 ml
6 µg	30 µl	68 µl	2 µl	1,5 ml
8 µg	40 µl	58 µl	2 µl	1,5 ml
10 µg	50 µl	48 µl	2 µl	1,5 ml
12 µg	60 µl	38 µl	2 µl	1,5 ml
15 µg	75 µl	23 µl	2 µl	1,5 ml

2 µl der Proben wurden jeweils mit 98 µl *A. deionisata* und 1,5 ml Bradfordreagenz gemischt. Nach zehnmütiger Inkubation im Dunkeln erfolgte die Messung der Extinktionen in Küvetten am Photometer. Mit Hilfe der Werte der Standardreihe konnte eine Regressionsgerade erstellt und anschließend die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben berechnet werden.

Bradfordreagenz: 10 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 % (v/v) Ethanol, 8,5 % (v/v) ortho-Phosphorsäure (85%), in *A. deionisata*

2D-Lysispuffer: 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 40 mM Tris Base, in *A. deionisata*

Eindimensionale Gelelektrophorese (1D-SDS-PAGE)

Die eindimensionale Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht. Durch Mitführen eines Markers mit Proteinen bekannter Größe können Molekülmassen bestimmt werden.

Bei der 1D-SDS-PAGE wurden 10 und 12 %-ige Trenngelle sowie 4 %-ige Sammelgelle verwendet, deren Zusammensetzungen in Tabelle 2 dargestellt sind. Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit einem Gemisch aus 66 % Isopropanol in *A. deionisata* und einer Spatelspitze Bromphenolblau überschichtet. Dadurch konnte eine gerade Grenzoberfläche des Gels erreicht werden. Nach der Polymerisation des Trenngels erfolgte das Abspülen des Isopropanol-Gemisches und Gießen des Sammelgels mit Einsetzen eines Kammes zur Bildung von Probestaschen (Polymerisationsdauer 30 min). Das Gel wurde anschließend luftblasenfrei in eine mit SDS-PAGE-Laufpuffer vorbereitete Gelelektrophoresekammer gesetzt. In dem Probenvolumen von 20 µl befanden sich 20 bis 30 µg Protein, entsprechende Mengen 2D-Lysispuffer und 5 µl 4 × PPP. Als Marker wurde ein Gemisch aus 6 µl *PageRuler™ Unstained Protein Ladder*, 9 µl 2D-Lysispuffer und 5 µl 4 × PPP verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreichte.

SDS-PAGE-Laufpuffer: 192 mM Glycin, 24,8 mM Tris Base, 0,1 % (w/v) SDS, in *A. deionisata*

2D-Lysispuffer: 8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 40 mM Tris Base, in *A. deionisata*

4 × PPP: 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, in *A. deionisata*

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl, in *A. deionisata* (pH 6,8)

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, in *A. deionisata* (pH 8,8)

Tab. 2: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels bei der 1D-SDS-PAGE

Lösungen	10 % Trenngel	12 % Trenngel	4 % Sammelgel
<i>A. deionisata</i>	4,0 ml	3,3 ml	2,8 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	1,25 ml
30 % Acrylamidlösung	3,3 ml	4,0 ml	750 µl
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml	50 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Western Blot und immunologische Detektion

Ein Western Blot ermöglicht den Transfer der im Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Für die immunologische Detektion der zu untersuchenden Proteine findet zunächst die Bindung eines spezifischen Primärantikörpers statt. In einem weiteren Schritt erfolgt die Bindung eines Sekundärantikörpers, welcher z. B. mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Nach Zugabe eines entsprechenden Substrates wird die Chemilumineszenzreaktion des Enzyms durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

Das Trenngel der 1D-SDS-PAGE und eine Lage des Filterpapiers wurden in Kathodenpuffer äquilibriert, die Nitrocellulosemembran und eine Lage Filterpapier in Anodenpuffer. Anschließend wurden nacheinander das Filterpapier aus dem Anodenpuffer, die Nitrocellulosemembran, das Gel und das Filterpapier aus dem Kathodenpuffer luftblasenfrei auf die Anode des Geräts gelegt (siehe Abb. 5). Der Semi-Dry Blotter wurde geschlossen und eine Stromstärke von 1 mA/cm^2 eingestellt. Nach 70 min konnte der Transfer beendet werden.

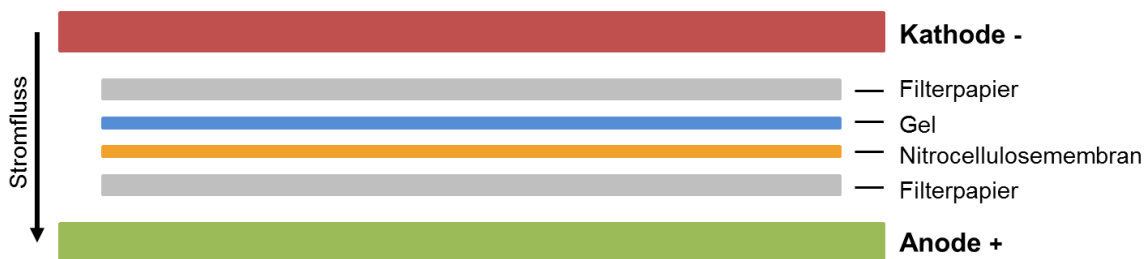


Abb. 5: Schematischer Aufbau beim Western Blot

Zum Fixieren der Proteine und Überprüfen der Transfereffizienz wurde die Membran 3 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt. Danach wurde sie dreimal mit Wasser kurz gewaschen und für 1 h in Blockierungspuffer gelegt. Einem fünfminütigen Waschschrift mit TBST folgte die Inkubation mit einer Primärantikörperlösung über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Am nächsten Tag wurde die Membran $3 \times 5 \text{ min}$ mit TBST gewaschen und anschließend für 30 min mit Sekundärantikörperlösung inkubiert. Drei weitere Waschschrift mit TBST folgten. Anschließend konnte für 2 min die Chemilumineszenzlösung hinzugegeben werden, wobei entweder ECL-Lösung oder *SuperSignal™ West Dura* verwendet wurde. Die Detektion der Signale erfolgte auf einem Röntgenfilm. Nach 1 - 30 min, je nach erwarteter Signalstärke, wurde dieser in Entwicklerlösung inkubiert, die Reaktion mit Wasser abgestoppt und in Fixierlösung fixiert. Nachdem der Röntgenfilm mit *A. deionisata* abgespült und getrocknet wurde, konnten die digitalisierten Banden mit der Software ImageJ quantifiziert werden.

Zur Detektion von Proteinen mit ähnlichem Molekulargewicht musste die Membran zweimal 5 min mit TBST und für 15 min mit *RestoreTM Western Blot Stripping Buffer* gewaschen werden, um alle gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend folgten ein Waschschrift mit TBST und eine erneute Inkubation mit Blockierungspuffer für 30 min. Die immunologische Detektion erfolgte mit dem zweiten Primärantikörper wie bereits beschrieben.

Kathodenpuffer: 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Roti[®]-Blot K, in *A. deionisata*

Anodenpuffer: 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Roti[®]-Blot A, in *A. deionisata*

Ponceau S-Lösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure, in *A. deionisata*

Blockierungspuffer: 10 % (v/v) Roti[®]-Block, in *A. deionisata*

TBST: 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1 % (v/v) Tween[®]20, in *A. deionisata* (pH 7,6)

Primärantikörperlösung: 5 % (w/v) BSA, Spatelspitze NaN₃, in TBST, + Primärantikörper

Sekundärantikörperlösung: 10 % v/v Roti[®]-Block, in *A. deionisata*, + Sekundärantikörper

ECL-Lösung: 10 ml Lösung A, 1 ml Lösung B, 3 µl 30 %-iges H₂O₂

Lösung A: 0,1 M Tris-HCl, 14,1 mM Luminol, in *A. deionisata* (pH 8,6)

Lösung B: 55 mg para-Hydroxycoumarinsäure, in 50 ml DMSO

Entwicklerlösung: 1,25 l Wasser, 1 l G153 A Developer, 0,25 l G153 B Developer

Fixierlösung: 2 l Wasser, 0,5 l G354 Rapid Fixierer

Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei wird das Zielprotein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und Protein A-Sepharose-Beads präzipitiert. Gleichzeitig werden mögliche Interaktionspartner dieses Zielproteins kopräzipitiert. Die Interaktionspartner, die am Zielprotein gebunden sind, werden anschließend mit Hilfe 1D-SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen.

Da in LNCaP-Zellen die endogene Expression von PC-1 nur gering ausgeprägt ist, wurden zum besseren Nachweis einer Interaktion LNCaP-PC-1-Zellen verwendet. Diese am Institut etablierte Zelllinie LNCaP-PC-1 weist nach stabiler Transfektion und Selektion das Merkmal einer mit Doxycyclin induzierbaren Überexpression des Zielproteins PC-1 auf. Für die Versuche wurden LNCaP-PC-1-Zellen mit 0,5 µg/ml Doxycyclin induziert und nach siebentägiger Kultivierung in Standardmedium (STM-PC-1) geerntet.

Bei der Co-Immunpräzipitation wurde 1 mg Protein aus RIPA-Proteinlysaten verwendet. Der Ansatz wurde entsprechend der Proteinkonzentration 1:10 in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C leicht schwenkend mit dem spezifischen Antikörper gegen PC-1 inkubiert. Zum Nachweis unspezifischer Bindungen von Proteinen an die Protein A-Sepharose-Beads diente eine Kontrolle mit IgG-Antikörper.

Nach Bindung der Antikörper wurden 25 µl der durch dreimaliges Waschen äquilibrierten Protein A-Sepharose-Beads zugegeben und ein bis zwei Stunden bei 4 °C leicht schwenkend inkubiert. Ungebundene Proteine wurden als Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Beads mit dem gebundenen Zielprotein und möglichen Interaktionspartnern fünfmal mit 500 µl IP-Waschpuffer gewaschen. Dabei wurden die 1,5 ml Reaktionsgefäße nach Zugabe des Puffers vorsichtig kurz geschwenkt und zum Sedimentieren der Beads 10 min auf Eis gestellt. Zuletzt wurden der IP-Waschpuffer abgenommen und 10 µl 4 × PPP zum Ablösen der Proteine von den Beads zugeben (Eluatproben). Die bei der Co-Immunpräzipitation entstandenen Proben des Überstandes und des Eluats wurden zusammen mit dem unbehandelten Zelllysate und dem Kontrollansatz mit IgG im Western Blot auf Vorhandensein von Arginase-1 untersucht. Die Ansätze mussten vor Verwendung für die eindimensionale Gelelektrophorese 5 min bei 95 °C zur Denaturierung der Proteine inkubiert werden.

1 × PBS: 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, in *A. deionisata*

IP-Waschpuffer: 10 % RIPA-Puffer, in PBS

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM Na-EDTA, 0,5 % (v/v) NP-40, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (w/v) Na-deoxycholat, 0,5 % (w/v) SDS, 1 mM Na₃VO₄, 0,5 % (w/v) Complete™ Mini, 50 mM NaF, in *A. deionisata*

4 × PPP: 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 4 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, in *A. deionisata*

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung werden die zu untersuchenden Proteine in fixierten Zellen mit Hilfe eines Primärantikörpers detektiert. In einem zweiten Schritt wird dieser von einem Sekundärantikörper gebunden, welcher mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist.

LNCaP-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte auf sterile Deckgläser ausgesät und im Brutschrank für mehrere Tage inkubiert, bis sie die gewünschte Konfluenz erreicht hatten. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 1 ml 3 mM MgCl₂ in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 1 ml kaltem PFA oder eiskaltem Methanol über 15 min. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml PBS für 5 min folgte die Blockierung mit 1 ml Immunfluoreszenzpuffer (IF-Puffer) über 45 min. Es schloss sich eine 90-minütige Inkubation mit 150 µl Primärantikörperlösung bei Raumtemperatur an. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 ml IF-Puffer gewaschen und für 45 min mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Weitere drei Waschschriffe mit IF-Puffer folgten. Für die Kernfärbung wurden 50 µl DAPI-Lösung verwendet. Nach 2 min wurden die Zellen noch dreimal 3 min mit 1 ml PBS gewaschen. Das Eindecken der Präparate erfolgte unter

Verwendung des Dako Fluorescent Mounting Medium. Für die Detektion wurde ein konfokales Mikroskop (Leica TCS SP5 System; 63-fache Vergrößerung) genutzt.

1 × PBS: 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,1 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, in *A. deionisata*

PFA: 4 % Paraformaldehyd, in 1 × PBS

IF-Puffer: 0,2 % BSA, 0,05 % Saponin, 0,1 % NaN₃, 10 % 10 × PBS, in *A. deionisata* (pH 7,4)

10 × PBS: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 101 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 18 mM KH₂PO₄, in *A. deionisata*

Primärantikörperlösung: Primärantikörper in IF-Puffer

Sekundärantikörperlösung: Sekundärantikörper in IF-Puffer

DAPI-Lösung: 2,5 µg/ml in IF-Puffer

2.2.6 Bestimmung der Arginase-Enzymaktivität

Die Bestimmung der Arginase-Enzymaktivität in den LNCaP-Zellen erfolgte photometrisch. Bei der Hydrolyse von Arginin entsteht neben Ornithin Harnstoff, welcher bei Reaktion mit α -Isonitrosopropiophenon einen Farbstoff bildet, dessen Extinktion gemessen werden kann. Bei dieser Methode wurde pro Ansatz 1 mg Protein aus zuvor gewonnenen RIPA-Proteinlysaten in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 300 µl Aktivierungspuffer gemischt und 15 min bei 55 °C zur Aktivierung der Arginase inkubiert. Anschließend erfolgte nach der Zugabe von 30 µl L-Argininlösung eine weitere Inkubation über 30 min bei 37 °C. Mit Hilfe von 250 µl 85 % Phosphorsäure wurde die Hydrolyse des Arginins abgestoppt. Diese Untersuchungslösung wurde in ein Reagenzglas mit 100 µl α -Isonitrosopropiophenonlösung gegeben und mit 2,5 ml Säuremischung versetzt. Nach Inkubation über 60 min im Wasserbad bei 95 °C wurden die Reagenzgläser auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein Kontrollansatz mit *A. deionisata* wurde mitgeführt. Die Messung der Extinktionen erfolgte bei einer Wellenlänge von 546 nm am Helios Beta Spectrophotometer.

Aktivierungspuffer: 10 mM K₃PO₄ (pH 7,8), 7,5 mM MgSO₄, in *A. deionisata*

L-Argininlösung: 100 mM Argininhydrochlorid, in *A. deionisata*

α -Isonitrosopropiophenonlösung: 4 % α -Isonitrosopropiophenon, in Ethanol

Säuremischung: H₂SO₄ konzentriert, H₃PO₄ konzentriert, *A. deionisata*, im Verhältnis 1 : 3 : 6

2.2.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse der qPCR sowie der Proteinanalysen wurde mit Hilfe der Software *GraphPad PRISM*[®] Version 6.03 durchgeführt. Mittels des Mann-Whitney Testes, einem nichtparametrischen Test zum Vergleich der Mediane zweier unabhängiger Stichproben, wurden die Signifikanzen bestimmt. Die Kennzeichnung der Signifikanzen erfolgte für p<0,001 mit ***, für p<0,01 mit ** und für p<0,05 mit *.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden Ergebnisse der molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen in der Modellzelllinie LNCaP dargestellt. PC-1 sowie folgende Enzyme des Argininstoffwechsels waren von Interesse (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Charakterisierung der untersuchten Proteine; Parameter aus UniProt (Februar 2017)

Proteinname	Genname	Proteinkürzel	UniProt- Nummer	theoretisches Molekulargewicht
Arginase-1	ARG1	ARGI1_HUMAN	P05089	34,7 kDa
Arginase-2	ARG2	ARGI2_HUMAN	P78540	38,6 kDa
Argininosuccinatsynthetase	ASS1	ASSY_HUMAN	P00966	46,5 kDa
Ornithintranscarbamylase	OTC	OTC_HUMAN	P00480	39,9 kDa
Ornithinaminotransferase	OAT	OAT_HUMAN	P04181	48,5 kDa 32,8 kDa
PC-1	TPD52	TPD52_HUMAN	P55327	24,3 kDa

3.1 Interaktion zwischen Arginase-1 und PC-1

3.1.1 Kolokalisationsanalyse nach Transfektion von pEYFP-N-PC-1 und indirekter Immunfluoreszenz von Arginase-1

LNCaP-Zellen wurden in *charcoal-treated* Medium (CTM) mit pEYFP-N-PC-1 transfiziert und weitere 3 Tage kultiviert. Es erfolgte eine mikroskopische Kolokalisationsanalyse mit Hilfe der ImageJ-Erweiterung JACoP (Tab. 4 und Abb. 6) [79].

Tab. 4: Ergänzende Angaben zur JACoP-Analyse

Analysenmethode	Analysenwerte	Grenzwerte
Pearson's Koeffizient	$r = 0,639$	-1 negative Korrelation 0 keine Korrelation 1 positive Korrelation
Van Steensel's Kreuzkorrelations- koeffizienten (CCF)	CCF min. = 0,12 für dx = 100 CCF max. = 0,639 für dx = 0	Verkleinerung des Pearson's Koeffizienten im Gegensatz zum Originalwert = positive Korrelation
Li's Intensitätskorrelations- koeffizient/-quotient (ICQ)	ICQ = 0,358	-0,5 keine Kolokalisation 0,5 Kolokalisation

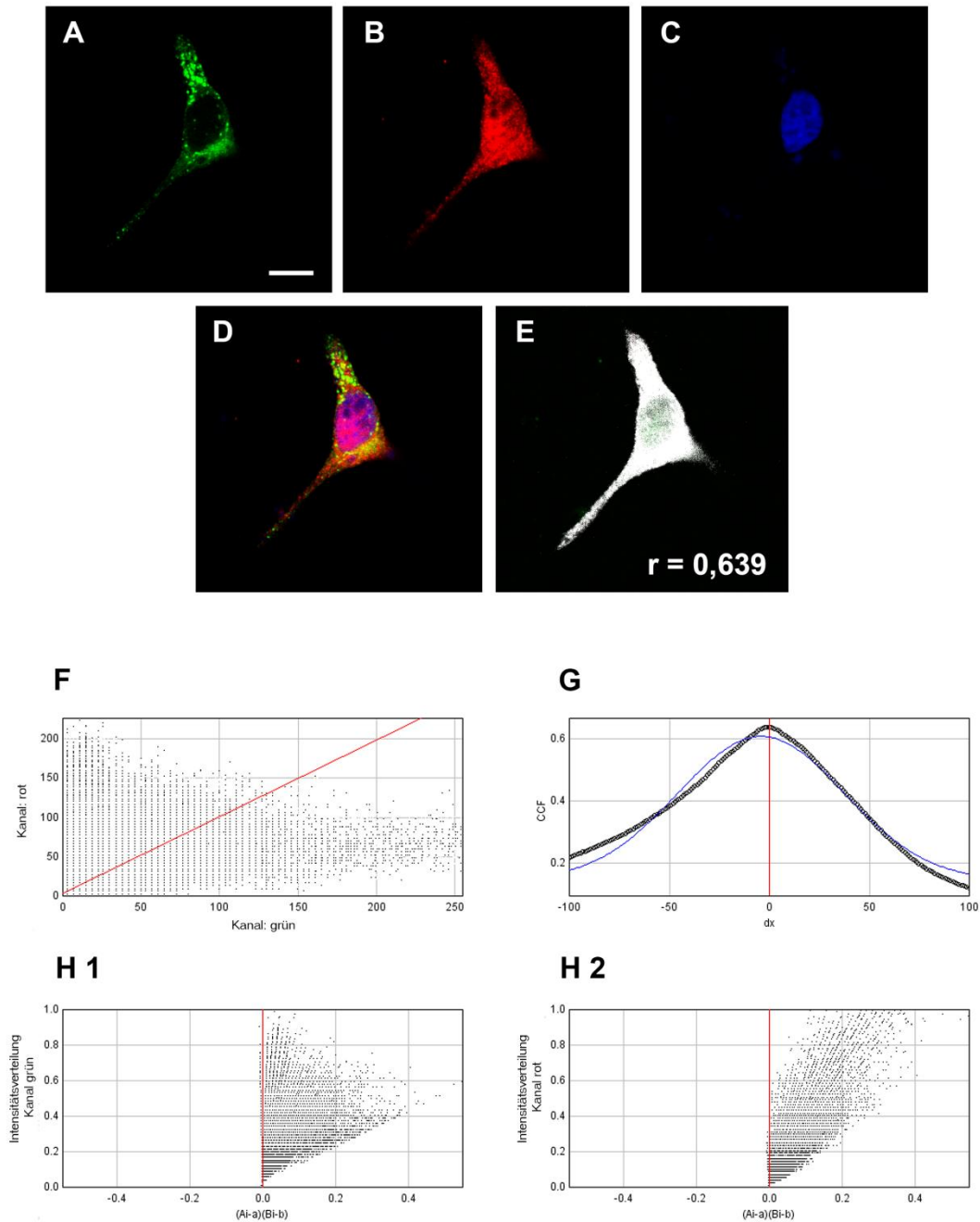


Abb. 6: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von LNCaP-Zellen nach Transfektion mit pEYFP-N-PC-1 und Fluoreszenzfärbung von Arginase-1 sowie Kolokalisationsanalyse mit ImageJ

LNCaP-Zellen in CTM 3 Tage nach Transfektion mit pEYFP-N-PC-1; Balken entspricht 10 μm

A: Detektion von PC-1 im YFP Kanal (grün)

B: Detektion von ARG1 (Kaninchen anti-ARG1 und anti-Kaninchen Cy3; rot)

C: Kernfärbung mit DAPI (blau)

D: Überlagerungsbild aller Kanäle

E: JACoP Analyse nach Costes - Kolokalisationsbild; r = Pearsons's Koeffizient

F: JACoP Analyse - Zytofluorogramm (*scatter plot*) der Farbkanäle rot gegen grün

G: JACoP Analyse - Van Steensel's Kreuzkorrelationskoeffizient (CCF) mit Pixelverschiebung von $dx = \pm 100$

H1: JACoP Analyse - ICA (*intensity correlation analysis*) nach Li für Kanal grün

H2: JACoP Analyse - ICA (*intensity correlation analysis*) nach Li für Kanal rot

Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzaufnahmen konnte eine Kolokalisation von PC-1 und Arginase-1 bestätigt werden. Abbildung 6 A verdeutlicht eine erfolgreiche Transfektion mit pEYFP-N-PC-1 (grün). PC-1 ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Ebenso konnte Arginase-1 immunologisch detektiert werden (rote Fluoreszenz, Abb. 6 B). Hier werden Signale sowohl im Kern als auch im Zytoplasma erkennbar. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt.

Im Überlagerungsbild (Abb. 6 D) sind Bereiche der Kolokalisation von PC-1 und ARG1 in Gelb und Bereiche der Kolokalisation von ARG1 und der DAPI-Kernfärbung in Pink dargestellt. Die ImageJ-Kolokalisationsanalyse erstellte für einzelne Kriterien die Abbildungen 6 E bis H2. Die Auswertung nach Costes ergab nach statistischer Analyse einer Bildrandomisierung ein Kolokalisationsbild, in dem die positive Korrelation weiß gekennzeichnet wurde (Abb. 6 E). Der Pearson-Koeffizient wurde mit 0,639 für das dargestellte Beispiel ermittelt. Die ergänzenden Berechnungen nach van Steensel und nach Li verifizierten diese positive Korrelation (Abb. 6 G und H). In Tabelle 4 sind die ermittelten Parameter zusammengestellt.

3.1.2 Co-Immunpräzipitation

Zur Verifizierung der Protein-Protein-Interaktionen zwischen Arginase-1 und PC-1 wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt, bei der mit dem spezifischen Antikörper gegen PC-1 das Zielprotein und daran gebundene, mögliche Interaktionspartner präzipitiert werden konnten. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit unspezifischem IgG-Antikörper verwendet.

Mit Hilfe der immunologischen Detektion der schweren Kette von IgG konnte eine annähernd gleichmäßige Verwendung der Primärantikörper bei der Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Abb. 7 A und B). Abbildung 7 C zeigt die Detektion von Arginase-1 im LNCaP-PC-1-Zelllysate, im Überstand und im Eluat aus der Immunpräzipitation mit dem anti-PC-1 Antikörper. In der Eluatspur ist eine schwache Bande für die Arginase-1 im Western Blot erkennbar. Somit gelang der Nachweis als möglicher Interaktionspartner des Zielproteins PC-1.

Bei der Detektion im Kontrollansatz mit IgG waren spezifische Signale für die Arginase-1 nur in den Spuren des Überstandes und des LNCaP-PC-1-Zelllysates erkennbar (Abb. 7 D). Im Eluat des Kontrollansatzes mit IgG wurden viele, eher unspezifische Banden beobachtet.

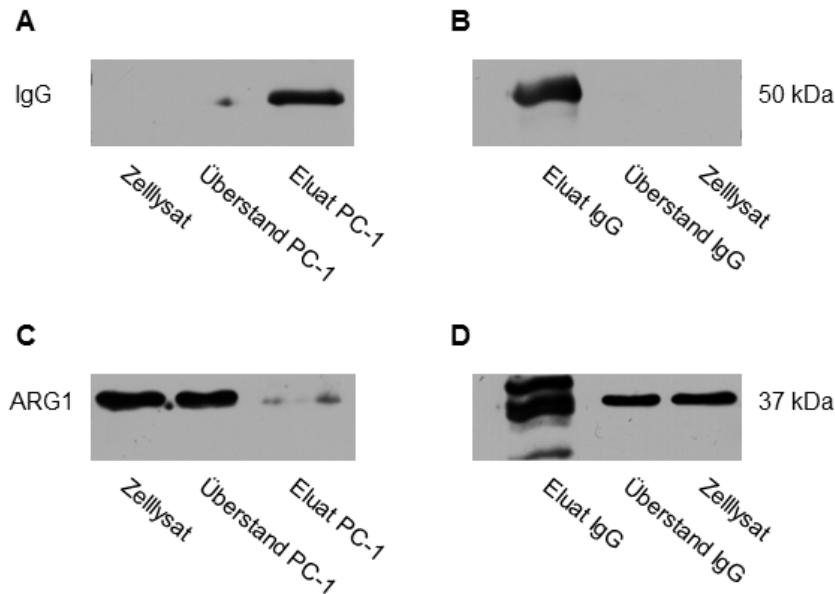


Abb. 7: Western Blot der Co-Immünpräzipitationen

LNCaP-PC-1-Zellen 7 Tage in STM-PC-1 mit 0,5 µg/ml Doxycyclin kultiviert; Zelllysat von LNCaP-PC-1-Zellen nach 7 Tagen mit RIPA geerntet; 20 µg Protein aufgetragen; n = 3

A: Western Blot der Co-Immünpräzipitation mit anti-PC-1-Antikörper; Detektion der schweren Kette vom IgG mit anti-Kaninchen-Sekundäntikörper

B: Western Blot der Co-Immünpräzipitation mit anti-IgG-Antikörper; Detektion der schweren Kette vom IgG mit anti-Kaninchen-Sekundäntikörper

C: Western Blot der Co-Immünpräzipitation mit anti-PC-1-Antikörper; Detektion mit anti-Kaninchen-ARG1

D: Western Blot der Co-Immünpräzipitation mit anti-IgG-Antikörper; Detektion mit anti-Kaninchen-ARG1

3.2 Charakterisierung der Expressionsprofile von Enzymen des Argininstoffwechsels in LNCaP-Zellen

3.2.1 Einfluss der Androgenablation - Kultivierung 3 Tage in CTM

Zur Bestimmung des Einflusses von Androgenen auf die Expression von Enzymen des Argininstoffwechsels in LNCaP-Zellen wurden zwei verschiedene Kulturmedien verwendet – FCS-haltiges Standardmedium (STM) und hormonfreies, *charcoal-treated* FCS-Medium (CTM). LNCaP-Zellen wurden für 3 Tage in den beiden Medien kultiviert und zur Analyse der Expressionsprofile mit *TriFast*TM geerntet. Nach Durchführung der qPCR, 1D-SDS-PAGE und des Western Blots erfolgte die statistische Auswertung gegen die Expression im Standardmedium. Als Ladekontrolle beim Western Blot diente α-Tubulin. Gekennzeichnet wurden signifikante Werte für p<0,05 mit *, für p<0,01 mit ** und für p<0,0001 mit ***.

Verifizierung der Amplicons für die qPCR

Zur Überprüfung der korrekten Amplicongrößen wurden die PCR-Produkte in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 8).

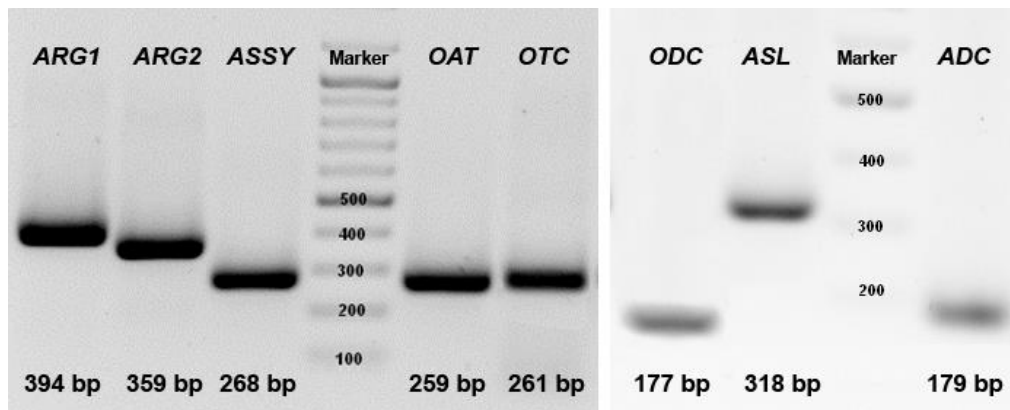


Abb. 8: Agarosegel der qPCR-Produkte

LNCaP-Zellen 3 Tage in STM kultiviert; für *OTC* wurde DNA von HepG2-Zellen verwendet
 Gene: *ARG1*, *ARG2*, *ASSY*, *OAT*, *OTC*, *ODC*, *ASL*, *ADC*
 Marker: *GeneRuler™ DNA Ladder Mix*, Amplicongrößen in bp

Die qPCR-Produkte zeigten die zu erwartenden Größen. In LNCaP-Zellen war die mRNA-Expression der *OTC* gering bis nicht nachweisbar, sodass im Folgenden auf Analysen der Ornithintranscarbamylase auf mRNA-Ebene verzichtet wurde. Die Eignung der Primer konnte an zur Verfügung gestellter DNA von HepG2-Zellen (Leberkrebszellen) als Positivkontrolle verifiziert werden. Die Schmelzkurve des Amplicons stellt ein weiteres Qualitätsmerkmal dar und erlaubt ebenfalls Aussagen über die Spezifität der Primer. Abbildung 9 stellt exemplarisch die Schmelzkurven des Amplicons von Arginase-2 dar. Alle anderen Schmelzkurven zeigten einen ähnlichen Verlauf mit den jeweiligen, primerspezifischen Schmelzpunkten.

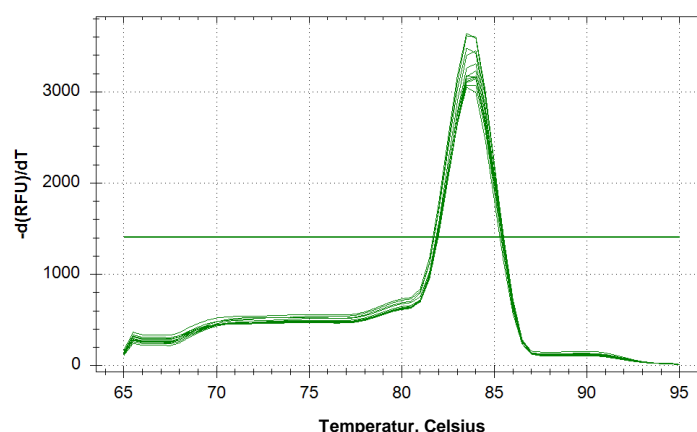


Abb. 9: Schmelzkurve des Amplicons von Arginase-2 in der qPCR

Arginase-1 (ARG1) und Arginase-2 (ARG2)

Die Änderungen der Expression der beiden Arginase-Isoformen wiesen auf mRNA-Ebene Ähnlichkeiten auf, während die Proteinebene unter Androgen-ablatierten Bedingungen unterschiedlich beeinflusst wurde (Abb. 10). Sowohl ARG1 als auch ARG2 zeigten bei Kultivierung in CTM eine geringere relative mRNA-Menge als in STM. Der Unterschied war bei der ARG2 hoch signifikant (0,41). Die relativen Proteinmengen wiesen nur geringe Veränderungen auf. Die Expression von ARG1 war leicht erhöht (1,2-fach), die von ARG2 ist hingegen leicht vermindert.

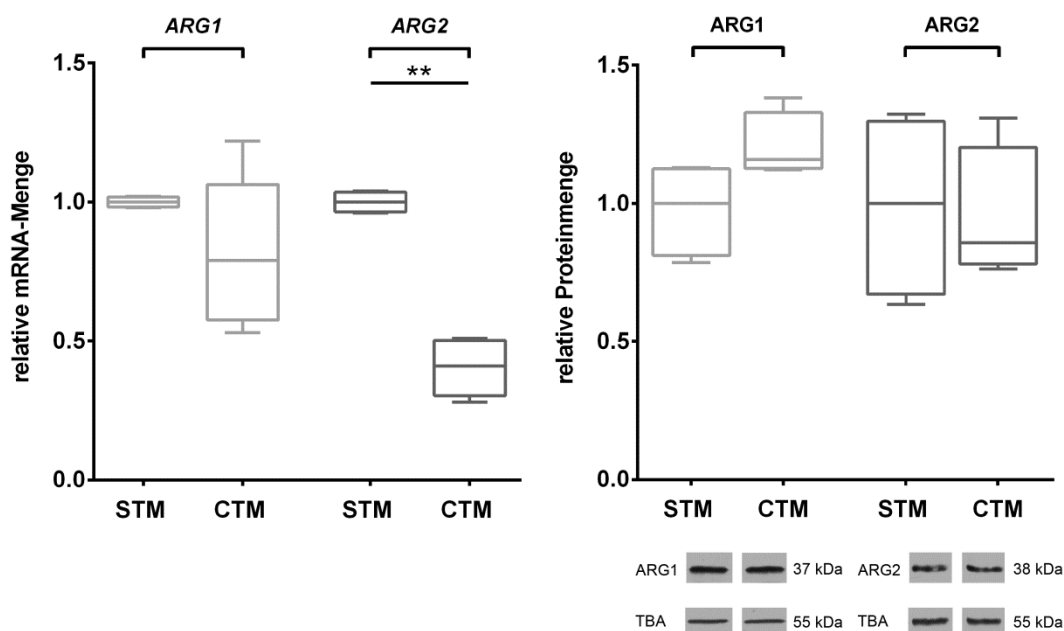


Abb. 10: Expressionsprofile von Arginase-1 und Arginase-2 auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zellkulturmedien nach 3 Tagen

LNCaP-Zellen 3 Tage kultiviert in STM und CTM

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression; STM n = 4; CTM n = 6

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ARG1, ARG2 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen; n = 4

Argininosuccinatsynthetase (ASSY) und Ornithintranscarbamylase (OTC)

Die Expression der ASSY stieg auf mRNA-Ebene minimal an (1,13-fach) und wies auf Proteinebene fast keinen Unterschied auf (Abb. 11). Bei der immunologischen Detektion wurde eine Doppelbande auf Höhe von 42 kDa beobachtet.

Da die OTC in LNCaP-Zellen in der qPCR nicht nachweisbar war, wurden nur protein-biochemische Methoden angewendet. Das theoretische Molekulargewicht beträgt laut UniProt (Februar 2017) 39,9 kDa. Im Gel konnten jedoch zwei Signale verschiedener Molekulargewichte detektiert werden – eine untere Bande bei 38 kDa und eine obere Bande bei 48 kDa. Für beide Detektionen konnte nur ein leichter Anstieg der Expression nachgewiesen werden.

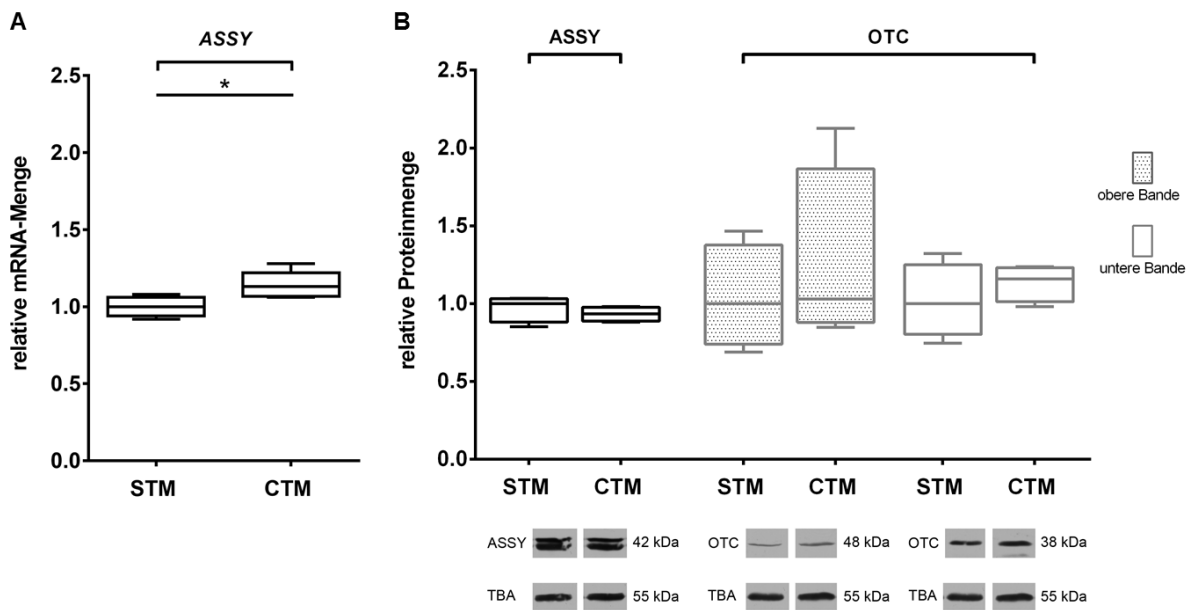


Abb. 11: Expressionsprofile von Argininosuccinatsynthetase und Ornithintranscarbamylase auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zellkulturmedien nach 3 Tagen

LNCaP-Zellen 3 Tage kultiviert in STM und CTM

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression von ASSY; STM n = 4; CTM n = 6

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ASSY, OTC und TBA; 20 µg Protein aufgetragen; n = 4

Ornithinaminotransferase (OAT)

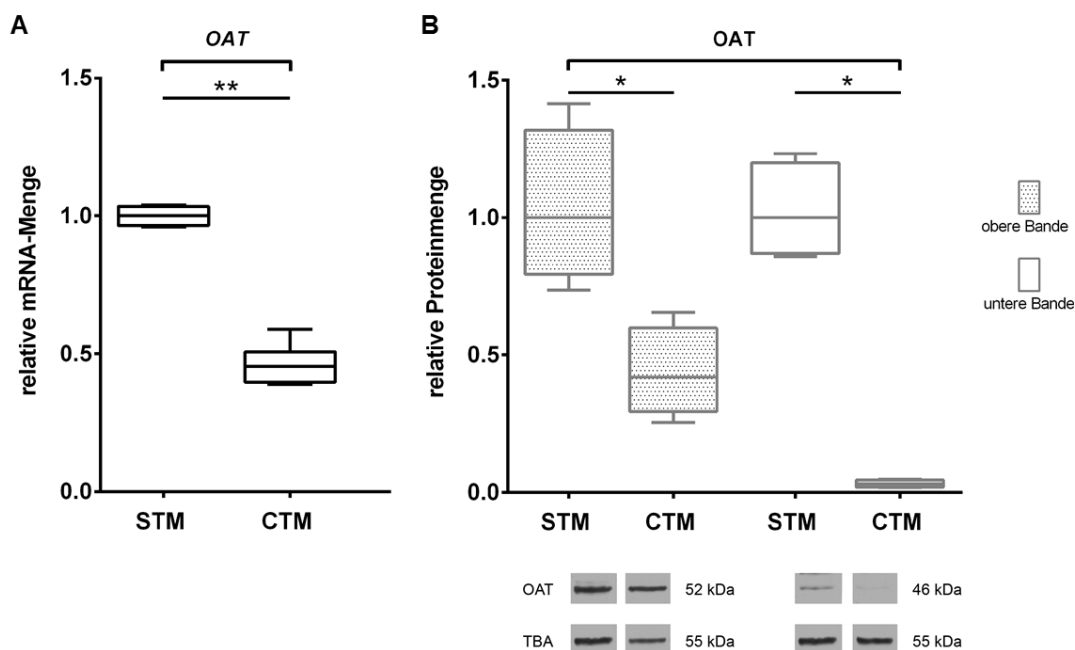


Abb. 12: Expressionsprofile von Ornithinaminotransferase auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zellkulturmedien nach 3 Tagen

LNCaP-Zellen 3 Tage kultiviert in STM und CTM

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression; STM n = 4; CTM n = 6

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von OAT und TBA; 20 µg Protein aufgetragen; n = 4

Die Zellen, die in CTM kultiviert wurden, wiesen bereits nach 3 Tagen eine hoch signifikant geringere relative mRNA-Menge der OAT (0,455) verglichen mit STM auf. Auch bei diesem Protein ergab die immunologische Detektion mehrere Banden. Signale wurden auf Höhen von 52 kDa und 46 kDa detektiert. Die Proteinexpression war signifikant verringert. Für die Bande bei 52 kDa wurde ein Faktor von 0,41 und für die Bande bei 46 kDa ein Faktor von 0,03 ermittelt. Laut UniProt gibt es zwei Isoformen dieses Enzyms. Isoform 1 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 48,5 kDa und Isoform 2 von 32,8 kDa.

3.2.2 Hormonelle Stimulation mit R1881 für 3 Tage in CTM

Anschließend wurde die Rolle von Androgenen in der Regulation der Enzymexpressionen auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Das Steroid R1881 ist ein synthetischer Agonist des Androgenrezeptors und wurde in der Konzentration von 0,5 nM eingesetzt. LNCaP-Zellen wurden 3 Tage in CTM mit oder ohne R1881 kultiviert. Die statistische Auswertung erfolgte gegen die Expression in CTM ohne Hormon. Signifikanzen errechneten sich wie oben beschrieben.

Arginase-1 (ARG1) und Arginase-2 (ARG2)

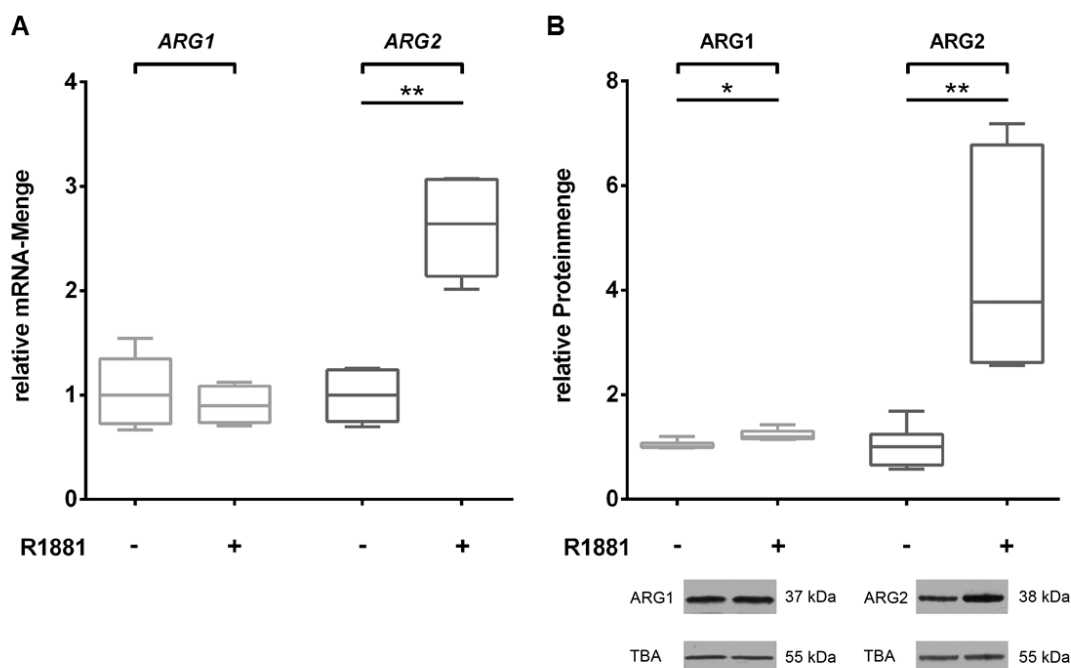


Abb. 13: Expressionsprofile von Arginase-1 und Arginase-2 auf mRNA- und Proteinebene in CTM mit R1881 und ohne R1881 nach 3 Tagen

LNCaP-Zellen; 0,5 nM R1881; n = 6

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ARG1, ARG2 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

Die hormonelle Stimulation der LNCaP-Zellen wirkte sich unterschiedlich auf die Expressionen der beiden Isoformen der Arginase aus (Abb. 13). Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zeigte die ARG1 kaum Veränderungen in den Expressionen. Bei ARG2 stiegen die relative mRNA-Menge hoch signifikant auf das 2,6-Fache und die relative Proteinmenge ebenfalls signifikant auf das 3,8-Fache.

Argininosuccinatsynthetase (ASSY) und Ornithintranscarbamylase (OTC)

Die relative mRNA-Menge der ASSY war unter Einfluss von R1881 signifikant geringer als in CTM ohne Hormonzugabe, die relative Proteinmenge wies keine Veränderung auf.

Bei der OTC wurde unter Anwesenheit des Androgens ein Anstieg der Proteinexpression ermittelt. Die Signalstärke der oberen Bande ist signifikant auf das 1,9-Fache gestiegen, die der unteren Bande nur auf das 1,3-Fache (Abb. 14).

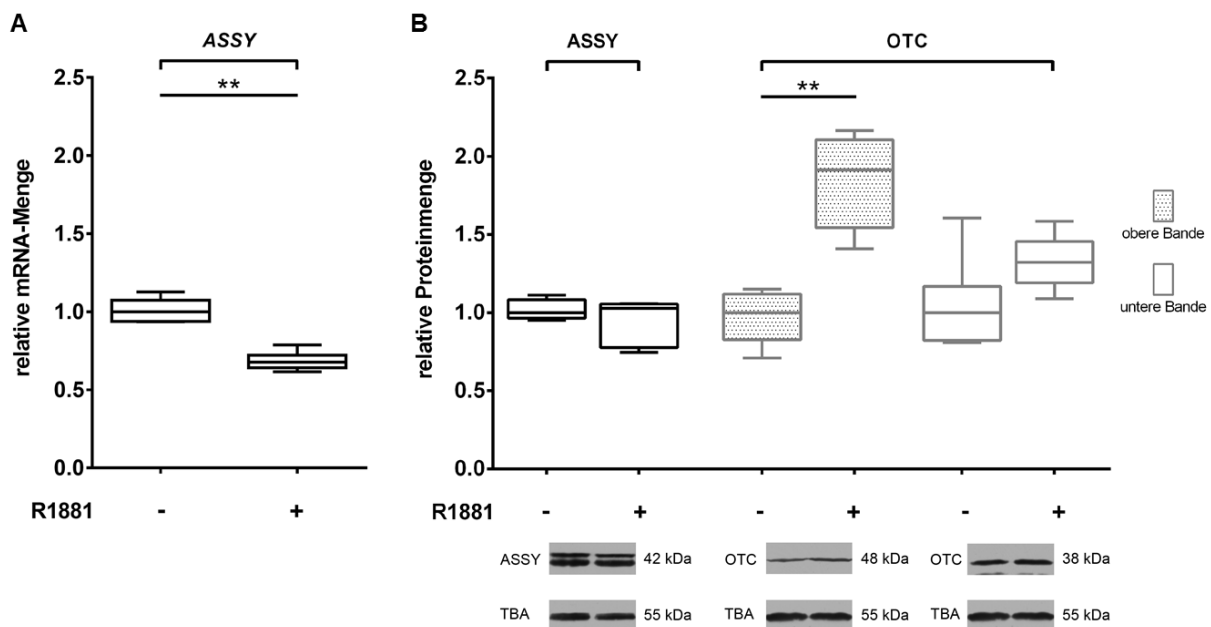


Abb. 14: Expressionsprofile von Argininosuccinatsynthetase und Ornithintranscarbamylase auf mRNA- und Proteinebene in CTM mit R1881 und ohne R1881 nach 3 Tagen

LNCaP-Zellen; 0,5 nM R1881; n = 6

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression von ASSY

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ASSY, OTC und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

Ornithinaminotransferase (OAT)

Zellen, die in CTM mit Zugabe von R1881 kultiviert wurden, zeigten einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression der OAT auf das 2,2-Fache (Abb. 15). Die relative Proteinmenge für die Bande bei 52 kDa stieg nur leicht an, die für die Bande bei 46 kDa erhöhte sich hoch signifikant auf das 24,2-Fache bei Stimulation mit dem synthetischen Androgen.

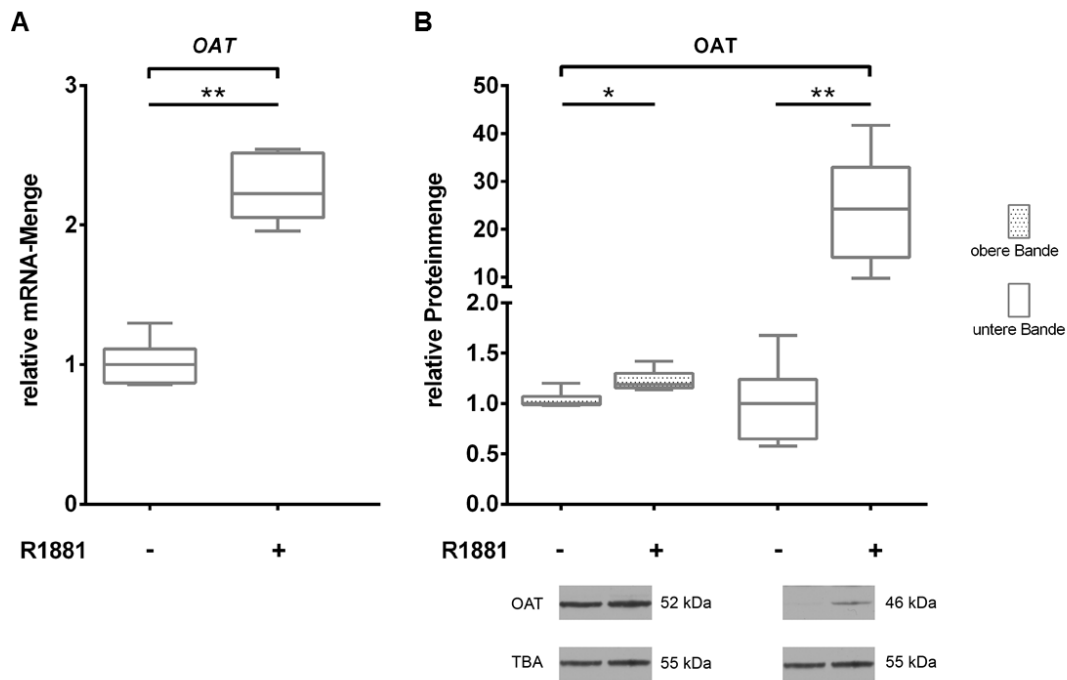


Abb. 15: Expressionsprofile von Ornithinaminotransferase auf mRNA- und Proteinebene in CTM mit R1881 und ohne R1881 nach 3 Tagen

LNCaP-Zellen; 0,5 nM R1881; n = 6

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von OAT und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

3.2.3 Expressionskinetik bei hormoneller Stimulation mit R1881 in CTM

Als Nächstes wurde der Einfluss des Steroidhormons über verschiedene Zeiträume untersucht. Nach Kultivierung der LNCaP-Zellen über 3, 7 und 11 Tage unter hormonfreien Bedingungen und bei Zugabe von 0,5 nM R1881 konnten die Expressionsprofile der Enzyme des Argininstoffwechsels erneut bestimmt werden. Für die Analysen über 3 Tage wurden die gleichen Werte, wie oben dargestellt, verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte gegen die Expression im CTM ohne R1881.

Arginase-1 (ARG1) und Arginase-2 (ARG2)

Bei der ARG1 waren die relativen mRNA-Mengen über die verschiedenen Zeiträume nicht signifikant verändert (Abb. 16). Auf Proteinebene war die Expressionserhöhung zeitabhängig. Nach 3 Tagen ist unter Einfluss von R1881 die relative Proteinmenge auf das 1,2-Fache, nach 7 Tagen auf das 1,8-Fache und nach 11 Tagen auf das 2,5-Fache gestiegen. Alle Änderungen waren statistisch signifikant.

Die Expressionen der mRNA der mitochondrialen Isoform 2 der Arginase wiesen bei allen drei Zeiträumen signifikante, jedoch zeitlich unabhängige Anstiege (2,5- bis 2,7-fach) auf. Im

Western Blot zeigten sich schwankende, signifikante Verstärkungen der Signale auf das 3,8-Fache bei 3 Tagen, 11,4-Fache bei 7 Tagen und 4,2-Fache bei 11 Tagen Kultivierung.

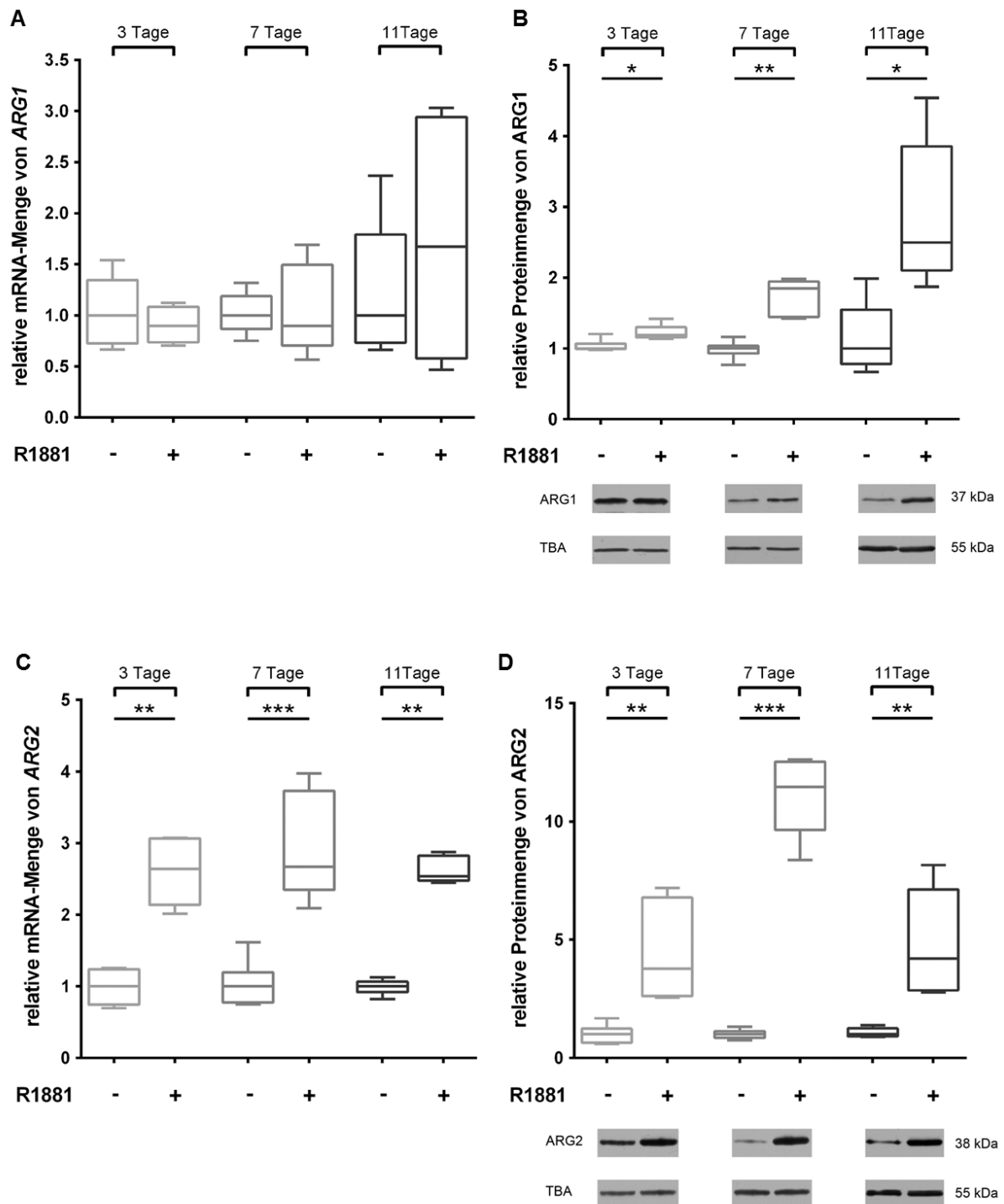


Abb. 16: Kinetik der Expressionsprofile von Arginase-1 und Arginase-2 auf mRNA- und Proteinebene in CTM mit R1881 und ohne R1881

LNCaP-Zellen; Probennahme nach 3, 7 und 11 Tagen; 0,5 nM R1881; 3 Tage n = 6; 7 Tage n = 8; 11 Tage n = 6

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression Arginase-1

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ARG1 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

C: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression Arginase-2

D: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ARG2 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

Argininosuccinatsynthetase (ASSY)

Das Expressionsprofil der Argininosuccinatsynthetase war unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen der LNCaP-Zellen sehr variabel (Abb. 17). Nach Absinken der relativen mRNA-Menge bei 3 Tagen erfolgte ein zeitabhängiger Anstieg auf das Ausgangsniveau bis zum Tag 11. Umgekehrt verhielt es sich bei der relativen Proteinmenge. Nach 3 und 7 Tagen waren die Expressionen in Androgen-freiem und Androgen-haltigem Medium tendenziell sinkend, erst bei Kultivierung über 11 Tage zeigte sich eine deutliche Abnahme auf 0,74.

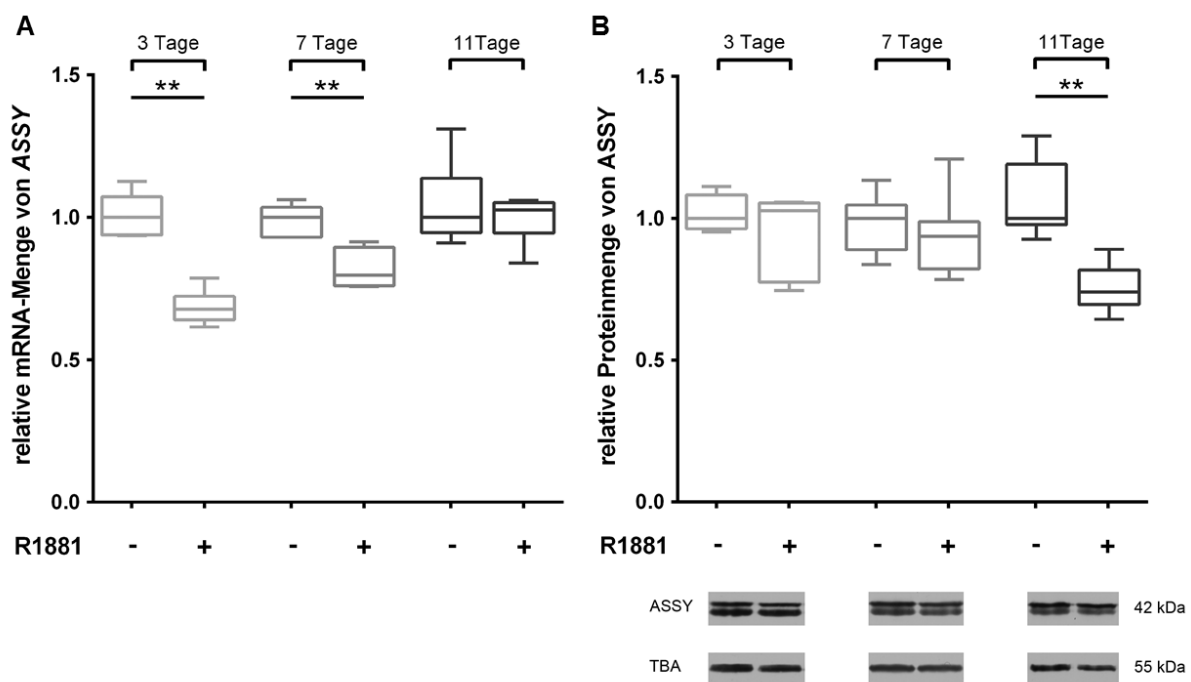


Abb. 17: Kinetik der Expressionsprofile von Argininosuccinatsynthetase auf mRNA- und Proteinebene in CTM mit R1881 und ohne R1881

LNCaP-Zellen; Probenahme nach 3, 7 und 11 Tagen; 0,5 nM R1881; 3 Tage n = 6; 7 Tage n = 8; 11 Tage n = 6

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ASSY und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

Ornithintranscarbamylase (OTC)

In den verschiedenen Zeiträumen unter Androgeneinfluss waren die Proteinexpressionen der OTC im Western Blot unterschiedlich (Abb. 18). Bei der 48 kDa-Bande war der ursprüngliche Anstieg der relativen Proteinmenge von 90 % nach 3 Tagen zeitabhängig (nach 7 Tagen nur noch 60 %) bis zum Tag 11 gesunken. Nach 11 Tagen konnte keine Expressionsänderung mehr detektiert werden. Die Veränderung der Expression der 38 kDa-Bande verhielt sich zeitabhängig entgegengesetzt. Nach 7 Tagen zeigte sich ein Anstieg um das 2,7-Fache.

Nach 11-tägiger Hormonstimulation war sie am größten (6-fach). Allerdings war hier die Schwankungsbreite recht groß.

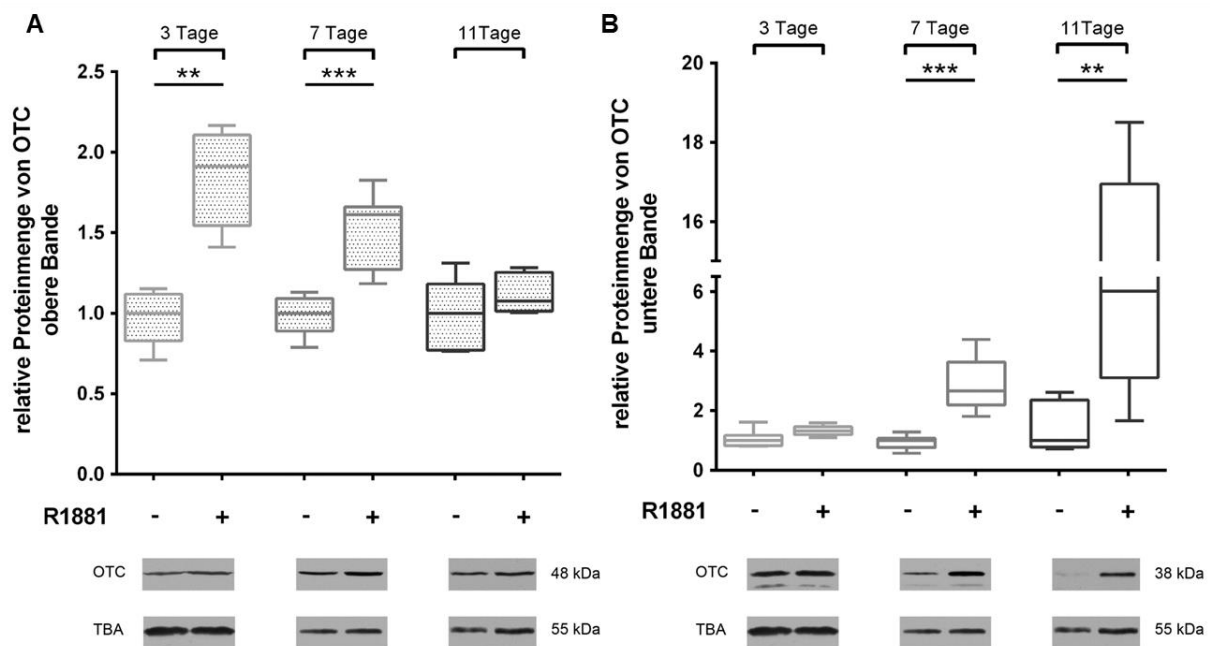


Abb. 18: Kinetik der Expressionsprofile von Ornithintranscarbamylase auf Proteinebene in CTM mit R1881 und ohne R1881

LNCaP-Zellen; Probennahme nach 3, 7 und 11 Tagen; 0,5 nM R1881; 3 Tage n = 6; 7 Tage n = 8; 11 Tage n = 6; 20 µg Protein aufgetragen

A: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression von der 48 kDa-Bande und Western Blot von OTC und TBA

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression von der 38 kDa-Bande und Western Blot von OTC und TBA

Ornithinaminotransferase (OAT)

Die Expressionsprofile der Ornithinaminotransferase sind in Abbildung 19 dargestellt. Wurde dem Zellkulturmedium Hormon hinzugegeben, erhöhten sich die relativen mRNA-Mengen der OAT zeitunabhängig, jedoch signifikant auf das 2,1- bis 2,3-Fache im Vergleich zu CTM ohne R1881.

Veränderungen der Proteinexpressionen waren zwischen den beiden Formen der OAT unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei der 52 kDa-Bande zeigte sich eine Verstärkung der Signale im Western Blot auf das 1,2- bis 1,3-Fache. Bei der 48 kDa-Bande sind die Expressionen nach 3 Tagen (24-fach), 7 Tagen (15-fach) und 11 Tagen (26-fach) erheblich gestiegen. Alle Expressionsveränderungen zeigten keine Zeitabhängigkeit.

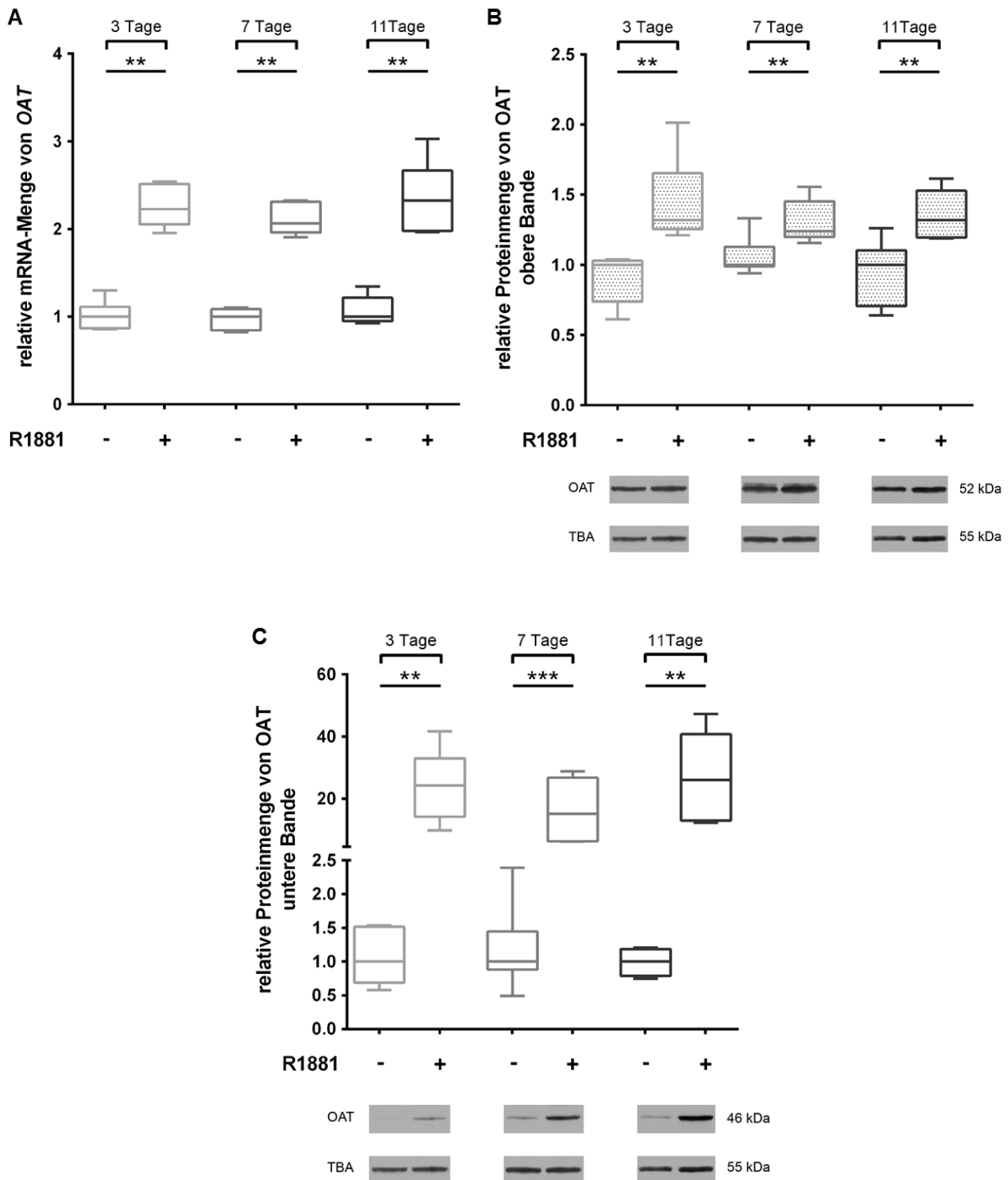


Abb. 19: Kinetik der Expressionsprofile von Ornithinaminotransferase auf mRNA- und Proteinebene in charcoal-treated Medium mit R1881 und ohne R1881

LNCaP-Zellen; Probenahme nach 3, 7 und 11 Tagen; 0,5 nM R1881; 3 Tage n = 6; 7 Tage n = 8; 11 Tage n = 6

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression von der 52 kDa-Bande und Western Blot von OAT und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

C: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression von der 46 kDa-Bande und Western Blot von OAT und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

Arginindecarboxylase (ADC), Argininosuccinatlyase (ASL) und Ornithindecarboxylase (ODC)

Zusätzlich zu den bisher untersuchten Enzymen des Argininstoffwechsels in LNCaP-Zellen wurden die mRNA-Expressionsprofile der Arginindecarboxylase, Argininosuccinatlyase und Ornithindecarboxylase unter den gleichen Kultivierungsbedingungen über die verschiedenen Zeiträume analysiert (siehe Abb. 20).

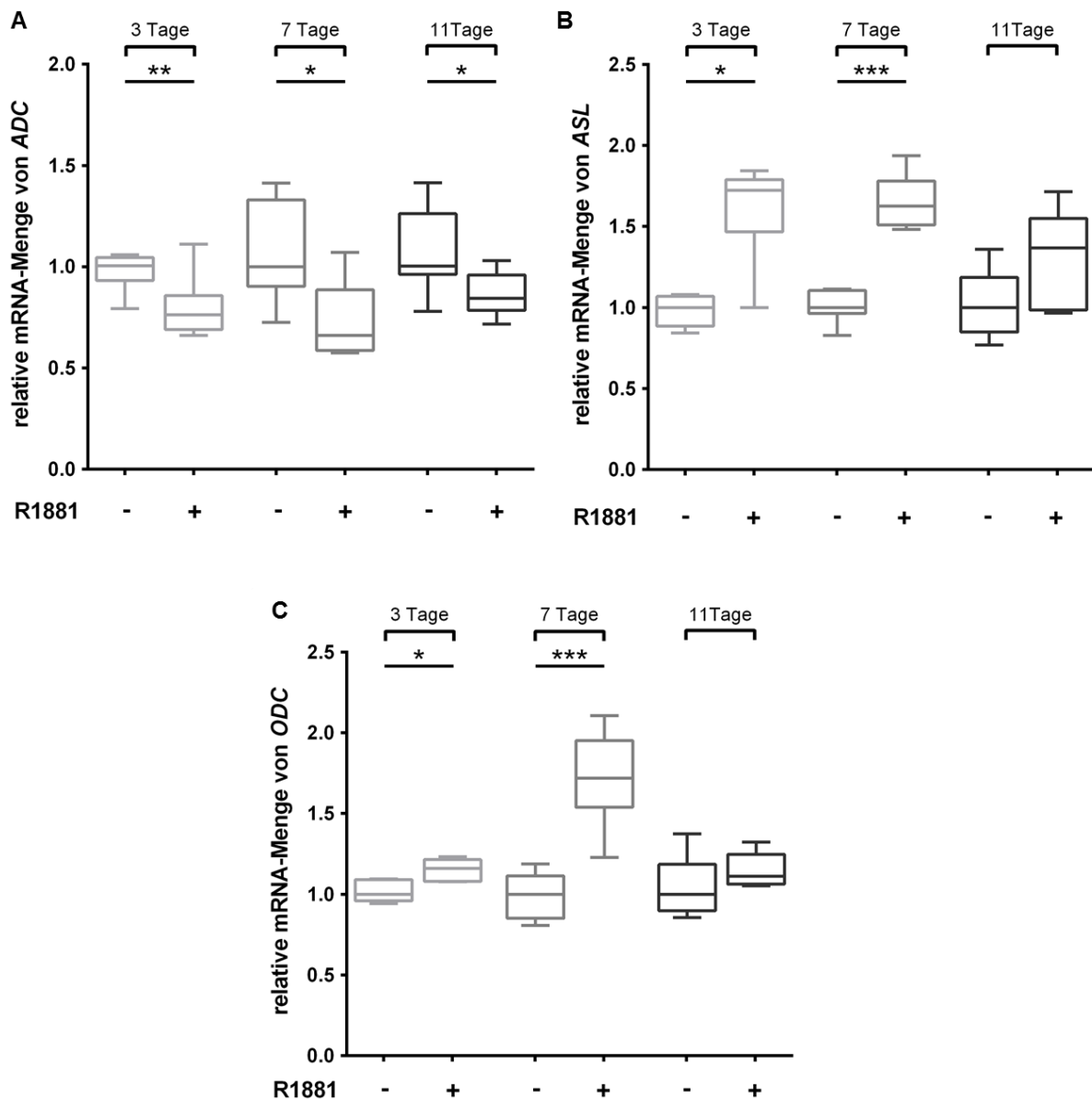


Abb. 20: Kinetik der Expressionsprofile von Arginindecarboxylase, Argininosuccinatlyase und Ornithindecarboxylase auf mRNA-Ebene in CTM mit R1881 und ohne R1881

LNCaP-Zellen; Probennahme nach 3, 7 und 11 Tagen; 0,5 nM R1881

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression der Arginindecarboxylase

B: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression der Argininosuccinatlyase

C: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression der Ornithindecarboxylase

Die relative mRNA-Menge der Arginindecarboxylase war nach 3, 7 und 11 Tagen unter hormoneller Stimulation geringer exprimiert als in CTM ohne R1881. Die relative mRNA-Menge der Argininosuccinatlyase ist bei Zugabe des Steroids auf das 1,4- bis 1,7-Fache gestiegen. Eine zeitliche Abhängigkeit konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Ornithindecarboxylase zeigten sich wechselnde Veränderungen, nach dreitägiger Kultivierung in Anwesenheit des Androgens war ein Anstieg der Expression auf das 1,2-Fache und nach 7 Tagen auf das 1,7-Fache zu verzeichnen. Wurden die Zellen 11 Tage mit R1881 stimuliert, wies die relative mRNA-Menge keine deutlichen Veränderungen auf.

Übersicht des Androgeneinflusses auf die Expressionen

In den folgenden Tabellen wurde der Einfluss von Androgen auf die mRNA- und Proteinexpressionen der untersuchten Enzyme des Argininstoffwechsels im Überblick dargestellt. Expressionsregulationen nach 3 Tagen wurden mit senkrechten Pfeilen gekennzeichnet, geringe mit einem Pfeil, über das 2-Fache mit zwei Pfeilen und über das 20-Fache mit drei Pfeilen. Ergaben sich zeitabhängige Änderungen der Werte der Expressionen (bezogen auf + R1881), wurde ein fallender Pfeil (↘) bzw. ein steigender Pfeil (↗) verwendet. Dabei wurden teilweise wieder die Ausgangsniveaus erreicht.

Tab. 5: Übersicht der Expressionsregulationen und Zeitabhängigkeiten auf mRNA-Ebene

Enzym	Expressionsregulation nach 3 Tagen	Zeitabhängigkeit 3, 7 und 11 Tage
ARG1	↔	↔
ARG2	↑↑	↔
ASSY	↓	↗
OAT	↑↑	↔

Tab. 6: Übersicht der Expressionsregulationen und Zeitabhängigkeiten auf Proteinebene

Enzym	Expressionsregulation nach 3 Tagen	Zeitabhängigkeit 3, 7 und 11 Tage
ARG1	↔	↗
ARG2	↑↑	↔
ASSY	↔	↘
OTC (48 kDa)	↑	↘
OTC (38 kDa)	↔	↗
OAT (52 kDa)	↔	↔
OAT (46 kDa)	↑↑↑	↔

3.2.4 Zellfraktionierung

Zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisation beider Isoformen der Arginase wurde nach Kultivierung von LNCaP-Zellen für 3 Tage in Standardmedium eine Zellfraktionierung durchgeführt. Die dabei gewonnenen Zytoplasmafraktionen und Kernfraktionen konnten im Western Blot immunologisch analysiert werden. Als Kontrolle diente ein Gesamtzelllysate (RIPA-Puffer) von LNCaP-Zellen, welche 3 Tage in Standardmedium kultiviert wurden. Die Zuordnung der Fraktionen erfolgte anhand von α -Tubulin als einem zytosolischen Protein und *cAMP response element-binding protein* (CREB) als einem Kernprotein.

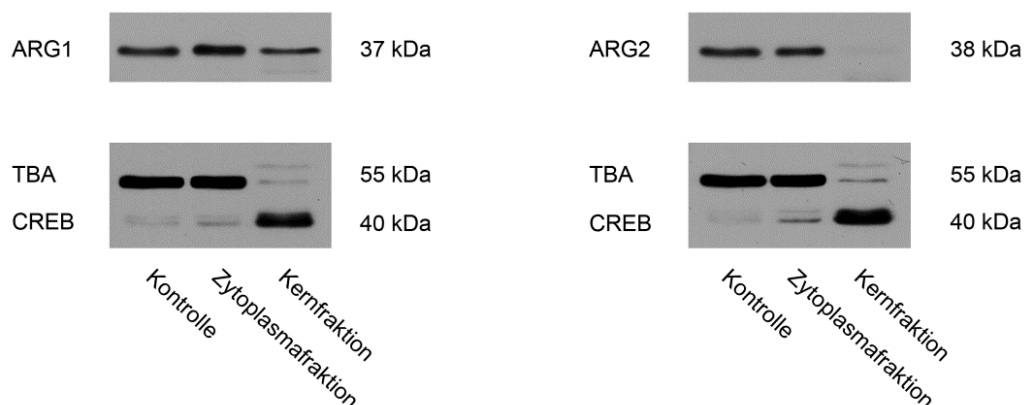


Abb. 21: Western Blot der Lysate aus den Zellfraktionierungen von LNCaP-Zellen - immunologische Detektion von ARG1, ARG2, TBA und CREB

LNCaP-Zellen 3 Tage in STM kultiviert; Kontrolle aus RIPA-Zelllysate nach dreitägiger Kultivierung der LNCaP-Zellen in STM; 20 μ g Protein aufgetragen; n = 2

Die Arginase-1 war im Western Blot in beiden Fraktionen deutlich nachweisbar, jedoch gab es in der Zytoplasmafraktion ein stärkeres Signal als in der Kernfraktion. Bei Untersuchung der Isoform 2 zeigte sich ein großer Unterschied zwischen beiden Fraktionen. In der Zytoplasmafraktion wurde deutlich die Arginase-2 detektiert, während die Kernfraktion dieses Protein kaum enthielt.

Die Fraktionierung zur Anreicherung der verschiedenen Proteinfractionen war erfolgreich. α -Tubulin konnte in der Zytoplasmafraktion und der Kontrolle in ähnlichen Mengen detektiert werden und zeigte nur sehr schwache Signale in der Kernfraktion. CREB trat im Western Blot deutlich in der Kernfraktion auf und war methodenbedingt schwach in der Kontrolle und Zytoplasmafraktion zu erkennen.

3.2.5 Immunfluoreszenz

Als weitere Möglichkeit der intrazellulären Lokalisationsuntersuchung bestimmter Proteine dienen Immunfluoreszenzaufnahmen an einem Konfokal-Mikroskop. Nach dreitägiger Kultivierung von LNCaP-Zellen in Standardmedium erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung der Enzyme des Argininstoffwechsels. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DAPI bei den Präparaten durchgeführt (Abb. 22).

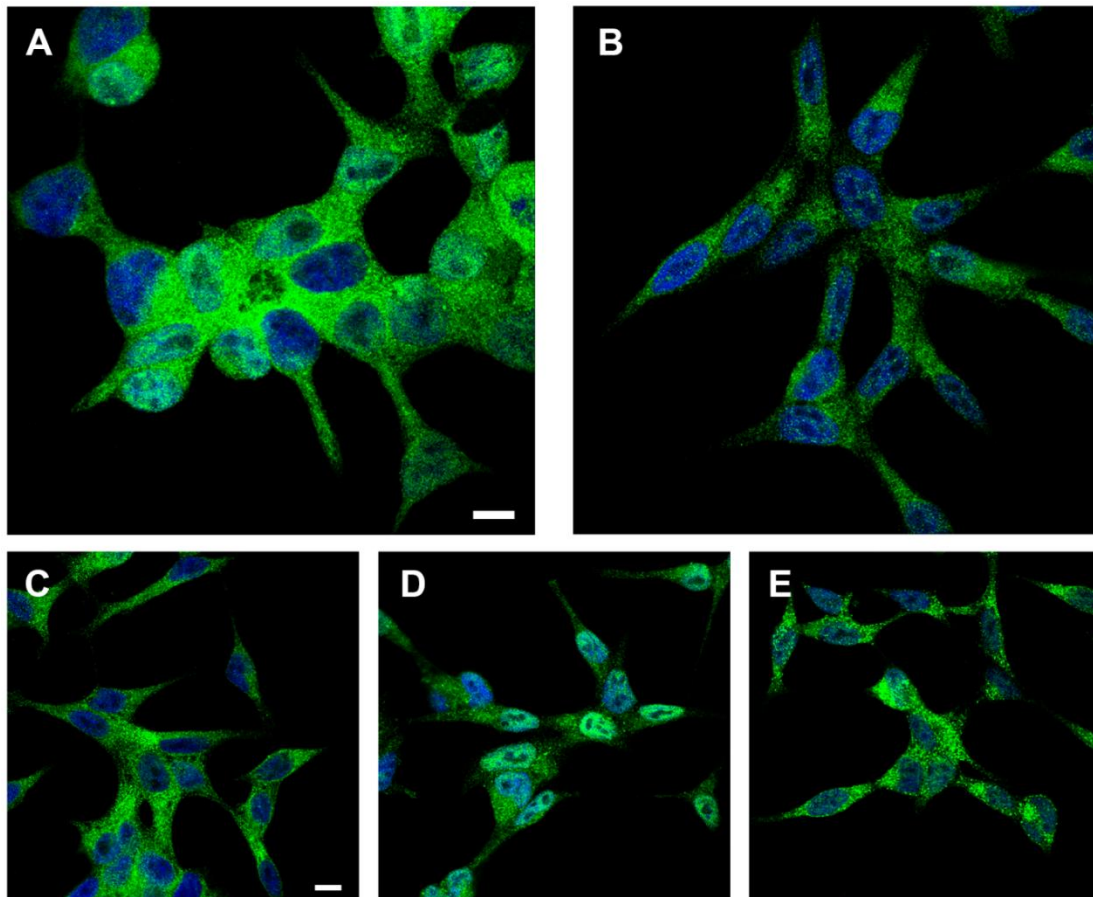


Abb. 22: Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen verschiedener Proteine des Argininstoffwechsels
 LNCaP-Zellen 3 Tage in STM kultiviert; Primärantikörper gegen A: ARG1; B: ARG2; C: ASSY; D: OTC; E: OAT; Sekundärantikörper: A, B, D, E anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 und C anti-Maus Alexa Fluor® 488; Kernfärbung mit DAPI; Balken entspricht 10 µm

In allen Immunfluoreszenzaufnahmen konnten deutlich fluoreszierende Signale beobachtet werden. Während die Arginase-1 intrazellulär sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert war, konnte die Isoform 2 fast ausschließlich im Zytosol detektiert werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Versuche zur Zellfraktionierung überein.

Signale der Argininosuccinatsynthetase und der Ornithinaminotransferase finden sich ebenfalls vorwiegend im Zellplasma. Die Ornithintranscarbamylase wurde vermehrt im Kern und in geringen Mengen im Zytoplasma ermittelt.

3.3 Expressionsprofile von PC-1 in LNCaP-Zellen

3.3.1 Einfluss der Androgenablation – Kultivierung 3 Tage in CTM

Nach Bestimmung der Expressionsprofile der Enzyme des Argininstoffwechsels wurde der Einfluss von Androgenen auf die Expressionen des Tumorproteins PC-1 auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Die Analysen und Auswertungen erfolgten wie oben beschrieben nach Kultivierung für 3 Tage in Standardmedium oder *charcoal-treated* Medium (Abb. 23).

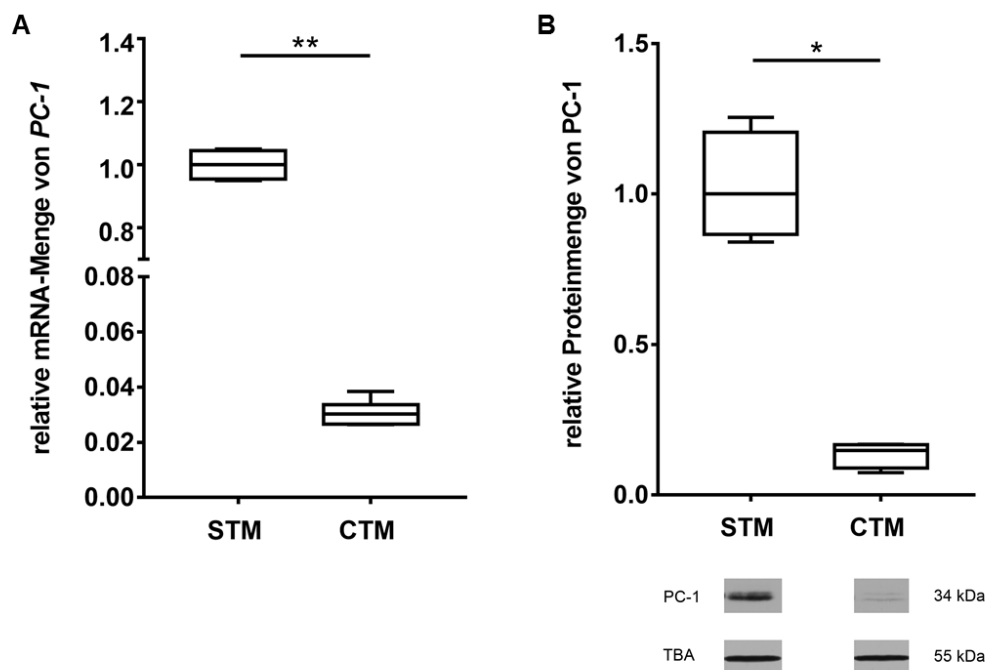


Abb. 23: Expressionsprofile von PC-1 auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen Zellkulturmedien nach 3 Tagen

LNCaP-Zellen 3 Tage kultiviert in STM oder CTM

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression; STM n = 4; CTM n = 6

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von PC-1 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen; n = 4

Die relative PC-1-mRNA-Menge ist in CTM signifikant erniedrigt. Verglichen mit der relativen Proteinmenge in STM wurde eine starke Abnahme der Proteinexpression von PC-1 in Androgen-freiem CTM beobachtet. Dies korreliert mit den mRNA-Werten.

3.3.2 Hormonelle Stimulation mit R1881 für 3 Tage in CTM

Des Weiteren wurde die hormonelle Stimulation mit 0,5 nM R1881 durch Kultivierung der LNCaP-Zellen in CTM mit bzw. ohne Zugabe des Androgens untersucht. Statistisch erfolgte die Auswertung gegen die Expression in CTM ohne R1881 (Abb. 24).

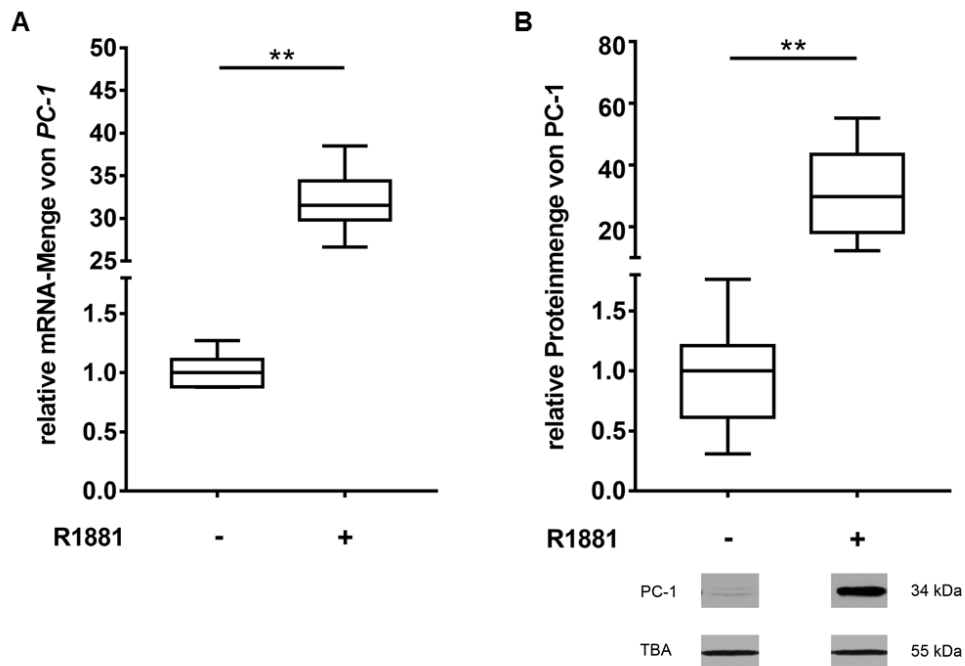


Abb. 24: Expressionsprofile von PC-1 auf mRNA- und Proteinebene in CTM mit R1881 und ohne R1881 nach 3 Tagen

LNCaP-Zellen; 0,5 nM R1881; n = 6

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von PC-1 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

Bei Anwesenheit des Steroidhormons konnte ein hoch signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Menge auf das 31,5-Fache ermittelt werden. Die Proteinexpression nahm in gleicher Weise stark (29,8-fach) zu.

3.3.3 Expressionskinetik bei hormoneller Stimulation mit R1881 in CTM

Bei der Analyse der Kinetik der Expressionsprofile zeigte sich nach hormoneller Stimulation eine erhöhte relative mRNA-Menge. Die Quantifizierung ergab Expressionssteigerungen auf das 31,6-Fache nach 3 Tagen, das 30,6-Fache nach 7 Tagen und das 52,8-Fache nach 11 Tagen. Der Unterschied war bei der Proteinexpression noch stärker zeitabhängig ausgeprägt. Nach elftägiger Kultivierung der Zellen in Anwesenheit des synthetischen Steroidhormons stieg die Expression auf das 266-Fache an (Abb. 25).

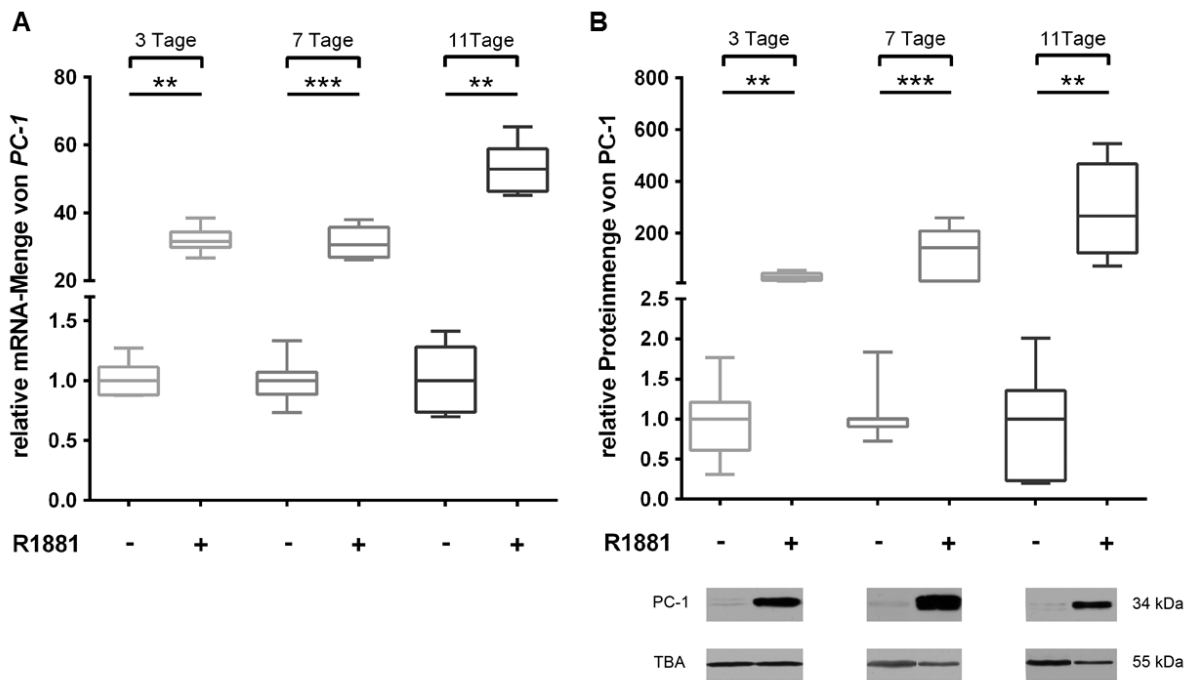


Abb. 25: Kinetik der Expressionsprofile von PC-1 auf mRNA- und Proteinebene in CTM mit R1881 und ohne R1881

LNCaP-Zellen; Probennahme nach 3, 7 und 11 Tagen; 0,5 nM R1881; 3 Tage n = 6; 7 Tage n = 8; 11 Tage n = 6

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von PC-1 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

3.3.4 Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung der Lokalisation von PC-1 in LNCaP-Zellen wurden Aufnahmen der Immunfluoreszenz- und Kernfärbungen mit Hilfe eines Konfokal-Mikroskops erstellt. Die Kultivierung der Prostatakarzinomzellen erfolgte 3 Tage in Standardmedium. In der Immunfluoreszenzaufnahme konnte PC-1 vorwiegend im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 26).

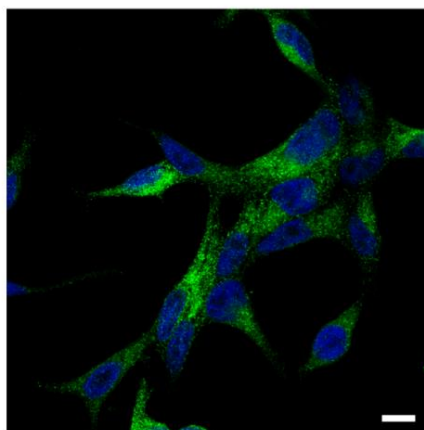


Abb. 26: Konfokale Immunfluoreszenzaufnahme von PC-1

LNCaP-Zellen 3 Tage in STM kultiviert; Primärantikörper gegen PC-1; Sekundärantikörper: anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488; Kernfärbung mit DAPI; Balken entspricht 10 µm

3.4 Expression von PC-1, ARG1 und ARG2 in LNCaP-PC-1-Zellen

Am Institut durchgeführte PC-1-Interaktionsstudien erfolgten in Überexpressionssystemen mittels *GST*- und *TAP-Tag-Pulldown*. Solche Techniken bieten artifizielle Möglichkeiten, Interaktionspartner zu finden. Eine weitere Option stellen stabile Zelllinien dar, die nach erfolgter Transfektion und Selektion die Fremd-DNA in das Genom integriert haben. Um eine solche Zelllinie handelt es sich bei LNCaP-PC-1-Zellen. Hier ermöglicht ein induzierbares System mit Doxycyclin die Überexpression des Proteins PC-1 (*Tet-On-System*). Die Expressionsprofile von PC-1, ARG1 und ARG2 in LNCaP-PC-1-Zellen wurden unter Einfluss der An- und Abwesenheit von 0,5 nM R1881 und/oder 0,5 µg/ml Doxycyclin auf mRNA- und Proteinebene nach siebentägiger Kultivierung in CTM-PC-1 untersucht. α -Tubulin diente als Ladekontrolle beim Western Blot. Die statistische Auswertung erfolgte gegen die Expression in Abwesenheit von R1881 und Doxycyclin.

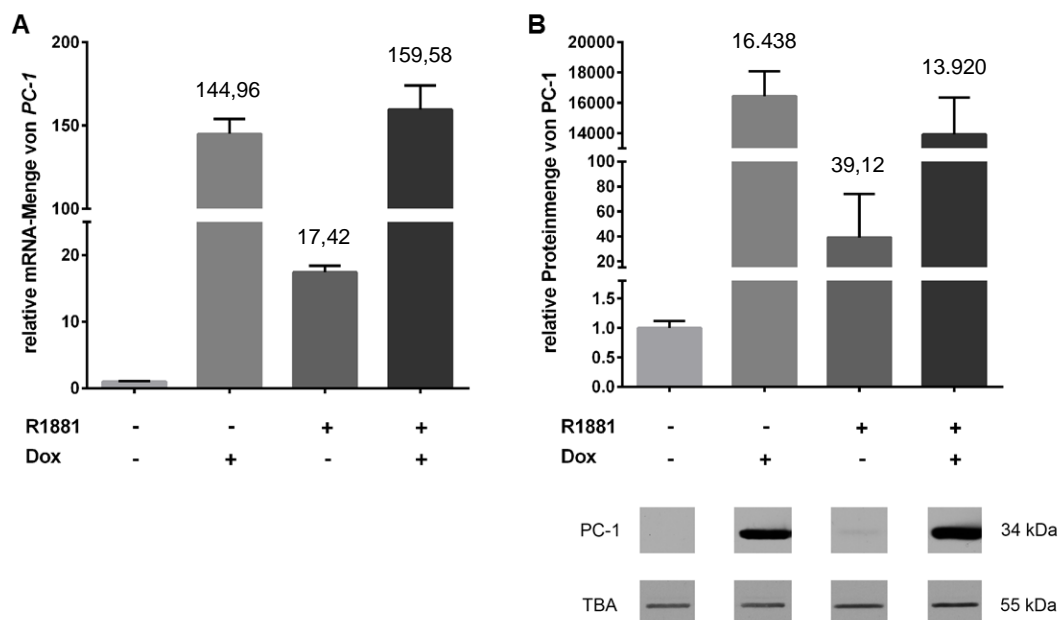


Abb. 27: Expressionsprofile von PC-1 auf mRNA- und Proteinebene in CTM-PC-1 bei Behandlung mit und ohne R1881 und mit und ohne Doxycyclin nach 7 Tagen

LNCaP-Zellen kultiviert in CTM-PC-1; 0,5 nM R1881; 0,5 µg/ml Doxycyclin; n = 3

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von PC-1 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

Bei Kultivierung der LNCaP-PC1-Zellen ohne R1881 und Doxycyclin war die Expression von PC-1 am geringsten. Die Zugabe des Androgens steigerte die relative mRNA-Menge 17,4-fach und die relative Proteinmenge 39-fach. Unter Einfluss von Doxycyclin sind stark erhöhte Expressionen des Tumorproteins auf mRNA- (144-fach) und Proteinebene (bis zu

16.400-fach) aufgetreten. Eine synergistische Wirkung beider Mediatoren konnte nicht beobachtet werden (Abb. 27).

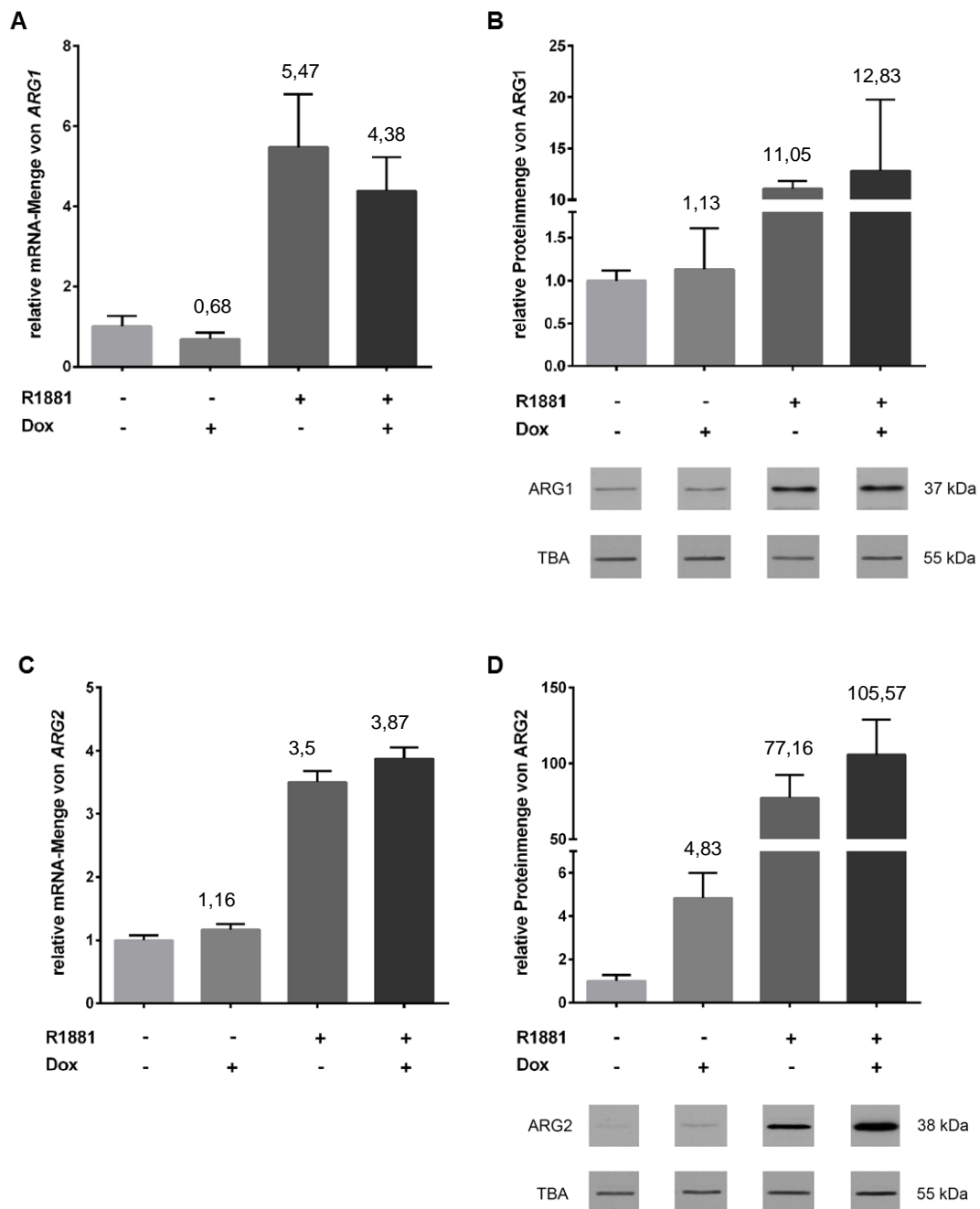


Abb. 28: Expressionsprofile von ARG1 und ARG2 auf mRNA- und Proteinebene in CTM-PC-1 bei Behandlung mit und ohne R1881 und mit und ohne Doxycyclin nach 7 Tagen

LNCaP-Zellen kultiviert in CTM-PC-1; 0,5 nM R1881; 0,5 µg/ml Doxycyclin; n = 3

A: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression Arginase-1

B: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ARG1 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

C: Quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression Arginase-2

D: Quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression und Western Blot von ARG2 und TBA; 20 µg Protein aufgetragen

LNCaP-PC-1-Zellen, die unter hormoneller Stimulation von R1881 kultiviert wurden, wiesen eine erhöhte relative mRNA-Menge von ARG1 auf. Doxycyclin als Induktor der PC-1-Überexpression wirkte hemmend auf diese Erhöhung (Abb. 28 A). Die Proteinexpressionen von ARG1 stiegen bei Zugabe von R1881 auf mehr als das 10-Fache an, bei Vorhandensein von Doxycyclin nur geringfügig mehr (Abb. 28 B).

Ähnlich verhielt sich das mRNA-Expressionsprofil von ARG2. Es konnte ein 3,5-facher bzw. 3,9-facher Anstieg detektiert werden. Die relative Proteinmenge der ARG2 wurde von dem synthetischen Steroidhormon stärker beeinflusst (77- bis 105-fach) als bei ARG1. Wurden die Zellen gleichzeitig unter Einfluss von R1881 und Doxycyclin kultiviert, konnte jeweils die höchste mRNA- und Proteinexpression der ARG2 detektiert werden (Abb. 28 C+D).

3.5 Enzymaktivität

Die Menge von Enzymen gibt keinen Aufschluss über deren katalytische Aktivität. Um dies zu überprüfen, wurde die Enzymaktivität der Arginase bestimmt. Nach siebentägiger Kultivierung von LNCaP-Zellen in STM oder in CTM mit und ohne R1881 wurden die Zellen mit RIPA-Puffer geerntet und analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf die Extinktion im Standardmedium. Signifikante Werte für $p < 0,01$ wurden mit ** gekennzeichnet.

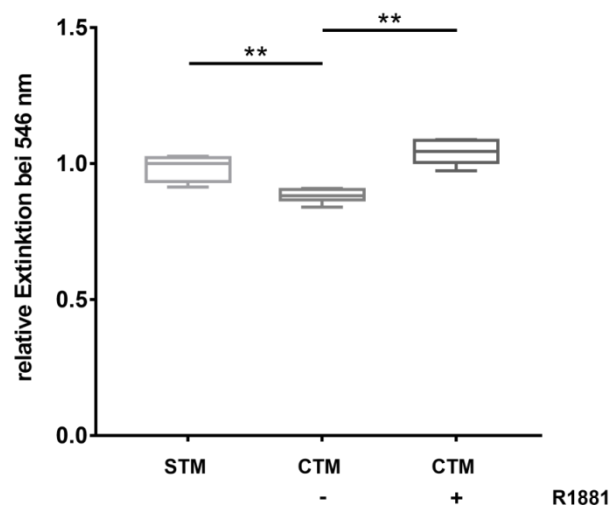


Abb. 29: Bestimmung der Arginase-Enzymaktivität in verschiedenen Zellkulturmedien nach 7 Tagen

LNCaP-Zellen 7 Tage kultiviert in STM oder CTM mit und ohne R1881; 0,5 nM R1881; Enzymaktivität gemessen bei 546 nm; STM n = 4; CTM n = 6

Die Enzymaktivität der Arginase zeigte nach siebentägiger Kultivierung in den verschiedenen Medien nur leichte Veränderungen. Unter Abwesenheit von R1881 in CTM ist die relative Extinktion auf 0,88 gesunken. Wurden die Zellen unter Einfluss des Androgens kultiviert, erhöhte sich die Enzymaktivität signifikant im Vergleich zu CTM ohne Hormon (Abb. 29).

4 Diskussion

Interaktion zwischen Arginase-1 und PC-1

In Prostatakarzinomen wurde eine erhöhte Expression von PC-1 sowie gesteigerte Arginase-Aktivität im Vergleich zu normalem Prostatagewebe nachgewiesen [35, 51-53]. Die Arginase als Enzym des Polyaminsyntheseweges sowie die Isoform 1 des Tumorproteins beeinflussen mit ihren proliferationsfördernden Eigenschaften die Progression des Malignoms.

Die durch frühere *Pulldown*-Experimente identifizierte Arginase-1 als möglicher Interaktionspartner von PC-1 konnte mit Hilfe einer Kolokalisationsanalyse an konfokalen Fluoreszenzaufnahmen bestätigt werden. Da die endogene Expression von PC-1 in LNCaP-Zellen unter Androgen-ablatierten Bedingungen gering ist (Abb. 23), ergaben sich Schwierigkeiten bei der Detektion mittels Immunfluoreszenz. In Anlehnung an die früheren Überexpressionsexperimente zu Interaktionsstudien wurden die Zellen darum transient mit pEYFP-N-PC-1 transfiziert und nach dreitägiger Kultivierung für eine Immunfluoreszenzfärbung der Arginase-1 verwendet. Die mit der Kolokalisationsanalyse der ImageJ-Erweiterung JACoP ermittelten Koeffizienten für Pearson ($r = 0,639$), van Steensel's Kreuzkorrelation (CCF min = 0,12) und Li's Intensitätskorrelation (ICQ = 0,358) zeigten eine positive Korrelation für eine Kolokalisation von ARG1 und PC-1 (Abb. 6 und Tab. 4). Bezugnehmend auf Grenzwerte der verschiedenen statistischen Analysemethoden kann man von einer 64 - 70 %-igen Wahrscheinlichkeit ausgehen. Physiologische Funktionen sind meist an eine definierte Lokalisation in den Zellen gebunden. Kenntnisse über die Lokalisation von Proteinen ermöglichen ein besseres Verständnis biologischer Prozesse. Gerade im Bereich von Protein-Protein-Wechselwirkungen sind definierte Analysemethoden Voraussetzung für eine korrekte Interpretation der Ergebnisse. Hier nehmen optische Methoden einen immer größer werdenden Stellenwert ein. Die definierte Analyse von Bilddaten erlaubt Vorhersagen möglicher Interaktionen verschiedener Proteine [79].

Eine weitere Möglichkeit, Wechselwirkungen zwischen diesen zwei Proteinen aufzuzeigen, bietet beispielsweise die Technologie des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Diese Methode basiert auf der Übertragung von Emissionsstrahlung von einem fluoreszierenden Donor auf einen Akzeptor, welche nur stattfinden kann, wenn sich beide Proteine in einem Abstand von < 10 nm befinden [82]. Die Messung von FRET kann mit Hilfe eines konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops oder anhand der Analyse an einem FACS-Gerät erfolgen [83-84]. Jedoch gibt diese FRET-Methode ähnlich wie die Kolokalisationsanalyse keine Hinweise zu einer tatsächlichen Interaktion sondern lediglich zur Kolokalisation der Proteine.

Die Experimente zur Co-Immunpräzipitation für LNCaP-PC-1-Zellen konnten die gefundenen Ergebnisse bestätigen. Bei diesen Untersuchungen wurde eine direkte Interaktion detektiert. Für eine nähere funktionelle Charakterisierung der Interaktion zwischen Arginase-1 und PC-1 und deren Bedeutung bei der Proliferation und Tumorprogression des Prostatakarzinoms sind weitere Untersuchungen notwendig.

Charakterisierung der Expressionsprofile von Enzymen des Argininstoffwechsels in LNCaP-Zellen

Da bisherigen Literaturangaben zufolge die biochemische Rolle der Arginase im Prostatakarzinom eine wichtige Stellung des Proteins im Argininstoffwechsel belegt und Einflüsse auf die Proliferation, Immunsuppression und Makrophagenaktivierung beschrieben wurden [54-58, 60-64, 67-70], standen neben den beiden Isoformen der Arginase weitere Enzyme des Argininstoffwechsels im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit.

Wie Gen- und Proteinexpressionsanalysen und Studien an Mäusen belegten, sind die Expressionen von Arginase-2 und anderen Enzymen des Polyaminsyntheseweges durch Androgene reguliert [51, 57, 85-87]. Androgene spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Organ- und Karzinomentwicklung der Prostata. Im Falle von fortgeschrittenen oder rezidivierenden Prostatakarzinomen findet die hormonablative Therapie als häufigste Behandlungsmethode Anwendung [30, 57]. In Anlehnung an diese Behandlungsstrategie wurden die Expressionsprofile der ausgewählten Proteine des Argininstoffwechsels u.a. unter hormonablativen Kultivierungsbedingungen bestimmt.

Dabei wurden FCS-haltiges Standardmedium und hormonfreies, *charcoal-treated* FCS-Medium verwendet. Im Vergleich beider Medien konnten keine signifikanten Änderungen von ARG1, ARG2, ASSY und OTC auf Proteinebene detektiert werden. Die Expressionsprofile auf mRNA-Ebene zeigten unterschiedliche Bilder (Abb. 10 und Abb. 11). Die mRNA der Arginase-2 wurde signifikant herunterreguliert, was mit Angaben von Mumenthaler *et al.* korrespondiert [51]. Für die OAT konnten signifikante Erniedrigungen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ermittelt werden (Abb. 12). Dies belegt die bereits beschriebene Androgenabhängigkeit der Expression dieses Enzyms. Allerdings steht diese Androgenabhängigkeit im Widerspruch zu den Untersuchungen von Mumenthaler *et al.* [51]. Dort wurde ein Anstieg der OAT in CL-1-Zellen (LNCaP-Sublinie) in hormonablatiertem Medium im Vergleich zu LNCaP-Zellen in Standardmedium beschrieben. Leider wurde auf Daten von LNCaP-Zellen in CTM verzichtet, so dass tatsächliche Einschätzungen zu den Unterschieden an dieser Stelle nicht möglich sind.

Neben diesen Untersuchungen wurden ebenfalls die Wirkungen des synthetischen Androgens R1881 in CTM über verschiedene Zeiträume dokumentiert. Ähnlich der Arbeit von Gannon *et al.* von 2010 konnte ein signifikanter, Androgen-abhängiger Expressions-

anstieg der Arginase bereits nach 3 Tagen nachvollzogen werden. Allerdings unterscheiden sich die beiden experimentellen Ansätze dahingehend, dass in dieser Arbeit auf eine Vorkultivierung in CTM verzichtet wurde. Gannon *et al.* verwendeten Zellen, die insgesamt 6 Tage unter Androgen-ablatierten Bedingungen kultiviert wurden, bevor die Analyse stattfand [57].

Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurde der Betrachtungszeitraum für die Proteine in CTM erweitert. Analysen nach 3, 7 und 11 Tagen ergaben hier vergleichbare Ergebnisse zu den Arbeiten von Gannon *et al.* [57]. Während der Einfluss des Androgens auf die Arginase-1 nach längerer Kultivierung der LNCaP-Zellen auf Proteinebene signifikant größer wurde, zeigten sich keine hormonabhängigen Veränderungen der relativen mRNA-Mengen (siehe Abb. 16). Die Expression der Isoform 2 wies unabhängig von der Kultivierungsdauer einen gleichbleibenden Anstieg unter Einfluss des synthetischen Hormons auf. Diese Ergebnisse lassen eine posttranskriptionelle Regulation der Arginase-1 vermuten, ähnlich der Beschreibungen verschiedener Studien [57, 88-91]. Anhand der Resultate zu den Androgen-abhängigen Expressionen der Arginase und der Kenntnisse des proliferationsfördernden Einflusses erhöhter Arginase-Aktivität in Prostatakarzinomgewebe werden mögliche Zusammenhänge ersichtlich, die Veränderungen bei der Anwendung hormon-ablativer Therapien bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Stadium des Malignoms biochemisch begründen [51-57]. Die Fähigkeit des Tumors, im Zuge der Androgenablation seinen Stoffwechsel auf eine Eigenproduktion von Androgenen umzustellen, könnte entsprechend zu einem Anstieg der Arginase und seiner Aktivität führen. Hossain *et al.* beschreiben im Zusammenhang mit der Makrophagenaktivierung eine Erhöhung von Arginase-1 in MDS-Zellen (*myeloid derived suppressor cells*) von Patienten mit kastrations-resistentem Prostatakarzinom. Hier wird die Wirkung der Arginase-1 mit der Förderung und Erhaltung der immunsuppressiven Mikroumgebung bei Prostatakrebs korreliert [92].

Im Verlauf der weiteren Analysen zu Enzymen des Argininstoffwechsels ergaben sich Probleme bei der Bestimmung der Ornithintranscarbamylase mittels qPCR. Da die mRNA-Expression der OTC in LNCaP-Zellen zu gering bis nicht nachweisbar war, die Eignung der Primer jedoch an DNA von HepG2-Zellen verifiziert wurde (siehe Ergebnisse S. 38), konnte keine Quantifizierung erfolgen. Diese Beobachtungen stimmten mit den Beschreibungen von Hsueh *et al.* überein [72]. Bei der Durchführung und Auswertung proteinbiochemischer Methoden zur Ornithintranscarbamylase konnten für das Enzym im Western Blot zwei Banden detektiert werden, die sich zeitabhängig signifikant änderten. Die Expressionsprofile (siehe Abb. 18) zeigten dabei einen entgegengesetzten Verlauf bei den verschiedenen Kultivierungszeiträumen. Hier könnten posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung oder Phosphorylierung eine Rolle spielen. Mit der zeitlichen Abnahme der Expression bei

48 kDa und der Zunahme bei 38 kDa kann aber auch eine Proteindegradation als mögliche Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Bei den Untersuchungen der OAT (siehe Abb. 19) konnte nachgewiesen werden, dass die Expressionen auf mRNA- und Proteinebene unter Anwesenheit von R1881 zeitunabhängig gesteigert werden können. Dabei waren Unterschiede in der Steigerung zwischen beiden Spleißvarianten des Proteins ersichtlich. Da R1881 als synthetisches Androgen den Androgenrezeptor stimuliert und die Ornithinaminotransferase analog der Arginase-2 und PC-1 ein Zielgen des Androgenrezeptors ist [93], sind Änderungen nachvollziehbar. OAT ist ein bedeutendes Enzym für den Stoffwechsel von Polyaminen. Die katalysierte Reaktion stellt auch in Karzinomzellen eine essentielle Quelle für Ornithin als Ausgangsstoff der Polyaminsynthese dar [73]. Bigot *et al.* fanden heraus, dass die OAT-Expression hormonresistent erhöht ist, was zum Überleben von Prostatakarzinomzellen beiträgt [94].

Die Bestimmung des Expressionsprofils der Argininosuccinatsynthetase ergab eine Herunterregulation unter Einfluss des Steroidhormons, wobei in zeitlicher Abhängigkeit die Expression auf mRNA-Ebene bis zum Tag 11 ausgeglichen wurde. Interessanterweise nahm die Proteinmenge bis zum Tag 11 kontinuierlich ab. Für Patienten mit hepatozellulärem Karzinom sind ebenfalls erniedrigte Proteinmengen für ASSY beschrieben [95]. Die tumorale Erniedrigung des Enzyms als geschwindigkeitsbegrenzender Schritt in der Argininsynthese führt zu einer Abhängigkeit von extrazellulärem Arginin. Dies ist unter dem Begriff Arginin-Auxotrophie bekannt. Mehrere Tumoren sind aufgrund des variablen Verlustes von ASSY Arginin-auxotroph, einschließlich des hepatozellulären Karzinomes, malignen Melanomes, malignen Pleuramesothelioms, Prostata- und Nierenkrebses [96-98].

Für die Enzyme Arginindecarboxylase, Ornithindecarboxylase und Argininosuccinatlyase wurden zeitabhängige Expressionen auf mRNA-Ebene dargestellt. Während die relative mRNA-Menge der Arginindecarboxylase abnahm, zeigten sich leichte Anstiege bei der Ornithindecarboxylase und Argininosuccinatlyase durch Zugabe von R1881. Die Ornithindecarboxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Polyaminsyntheseweges. In den Beobachtungen von Mohan *et al.* wurde eine erhöhte Enzymaktivität und Proteinexpression der ODC in Karzinomgewebe im Vergleich zu gutartigem Prostatagewebe nachgewiesen [99]. Diese Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Überexpression der Ornithindecarboxylase und dem Wachstum sowie der Progression des Prostatakarzinoms hin [99-100]. Die Arginindecarboxylase gehört zur Familie der Antizyme-Inhibitoren, welche eine Rolle beim Zellwachstum und der Proliferation spielen, indem die Polyaminhomöostase beeinflusst wird. ADC stimuliert u.a. die ODC Aktivität. Das wird durch Hemmung der Antizyme OAZ1, OAZ2 und OAZ3 erreicht, indem der Antizyme-abhängige Abbau der ODC durch Bindung verhindert wird. Eine weitere Funktion ist eine Transmembrantransporteraktivität für Putrescin. Hier wirkt die Polyaminaufnahme ebenfalls in

Richtung Proliferation [101-103]. Für die Argininosuccinatlyase sind Interaktionen mit CyclinA2 bei der Modulation des Zellwachstums von Lebertumoren beschrieben [104]. Huang *et al.* interpretieren eine verminderte Tumorentwicklung bei Darmkrebs durch eine Inhibierung des Enzyms und detektieren eine erhöhte Expression in Brustkrebsproben [105-106]. Wie sich die hier gezeigten mRNA-Expressionen auf Proteinebene in LNCaP-Zellen widerspiegeln, sollte in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden.

Neben den Untersuchungen zur Quantität der Enzyme des Argininstoffwechsels unter Androgen-ablatierten Bedingungen wurde für die Charakterisierung der Arginase in LNCaP-Zellen die intrazelluläre Lokalisation beider Isoformen untersucht. Zellfraktionierungen zeigten in der immunologischen Detektion für Arginase-1 Signale sowohl in der Zytoplasma- als auch in der Kernfraktion. Signale der Arginase-2 fanden sich fast ausschließlich in der Zytoplasmafraktion (siehe Abb. 21). Anhand von konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen konnten diese Ergebnisse der Zellfraktionierung bestätigt werden (siehe Abb. 22). Zusätzlich wurden mit Hilfe konfokaler Aufnahmen die Lokalisationen der Argininosuccinatsynthetase, der Ornithintranscarbamylase und der Ornithinaminotransferase bestimmt, die mit Angaben in Gen- und Proteindatenbanken übereinstimmen.

Expressionsprofile von PC-1 in LNCaP-Zellen

Nach Betrachtung der Enzyme des Argininstoffwechsels wurden auch die Expressionsprofile des Tumorproteins 52 (Isoform 1) unter analogen Zellkulturbedingungen ermittelt. Der Vergleich zwischen Kultivierung in Standardmedium und in *charcoal-treated* Medium zeigte deutliche Veränderungen der Expressionen auf mRNA- und Proteinebene. Die PC-1-Expression war nach 3 Tagen in CTM signifikant erniedrigt (Faktor 0,03/0,15 respektive). Hier wird die fehlende Wirkung von Androgenen und somit die verringerte Stimulation des Androgenrezeptors Ursache für die verminderte Expression sein, da PC-1 zu den Zielgenen des AR gehört [93].

Wurde dem *charcoal-treated* Medium das Androgen R1881 zugesetzt, konnten signifikant erhöhte relative mRNA- und Proteinmengen nach 3 Tagen detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse sind in Vorarbeiten im Institut gefunden worden [44, 77]. Zhang *et al.* beschreiben diesen Zusammenhang auch in Bezug auf eine progressive Wirkung im Prostatakrebs [46]. Eine Zunahme von PC-1 konnte auch zeitabhängig bis zu 11 Tagen beobachtet werden. Dabei wurde auf mRNA-Ebene eine bis zu 53-fache Überexpression bzw. auf Proteinebene eine bis zu 266-fache Überexpression nachgewiesen.

Wie bereits erwähnt, war die endogene Expression von PC-1 in CTM gering. Deshalb wurden Untersuchungen zu dessen intrazellulärer Lokalisation in LNCaP-Zellen unter Standardmedienbedingungen durchgeführt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte die intrazelluläre Lokalisation von PC-1 als überwiegend zytoplasmatisch eingestuft werden.

Expressionsprofile von Arginase-1, Arginase-2 und PC-1 in LNCaP-PC-1-Zellen

Da die PC-1-Interaktionsstudien der Vorarbeiten am Institut mittels GST- und TAP-*Tag-Pulldown* in Überexpressionssystemen erfolgten, wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsprofile von PC-1 und der beiden Arginase-Isoformen in der stabil transfizierten LNCaP-PC-1-Zelllinie untersucht. Ein Doxycyclin-induzierbares System ermöglichte die Überexpression des Proteins PC-1.

Die Zugabe von R1881 in Abwesenheit von Doxycyclin führte ähnlich der bisherigen Ergebnisse zu einer Erhöhung der Expressionen von Arginase-1, Arginase-2 und PC-1. Die induzierbare Überexpression von PC-1 mittels Doxycyclin konnte in den durchgeführten Analysen für die LNCaP-PC-1-Zellen bestätigt werden (siehe Abb. 27). Dies stimmt mit den Erkenntnissen von Moritz *et al.* überein [44]. Es ergab sich jedoch kein synergistischer Effekt auf die PC-1-Expression durch die zusätzliche Verwendung von R1881. Dies ist vermutlich in der bereits extrem hohen Überexpression durch das *Tet-On*-System (+ Dox 16.500-fach) begründet.

Gesteigerte Expressionen der Arginase-Isoformen wurden bei gleichzeitiger Anwendung von R1881 und Doxycyclin-induzierter PC-1-Überexpression nachgewiesen. Allerdings korrelierte die alleinige PC-1-Überexpression nur bei ARG2 mit einer Erhöhung auf Proteinebene (Abb. 28). Anhand dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass der Expressionsanstieg von ARG1 und ARG2 hauptsächlich auf der Hormonwirkung beruht, was schon für die untransfizierten LNCaP-Zellen festgestellt wurde. Jedoch sind die Steigerungsraten bei LNCaP-PC-1-Zellen höher als in untransfizierten LNCaP-Zellen in CTM-Medium.

Wie durch Zhang D. *et al.* beschrieben, wurde eine Aktivierung von STAT3 durch PC-1 nachgewiesen [107]. Die Arginase-1 ihrerseits stellt ein Zielmolekül in der Signalkette von pSTAT3 dar [92]. Die Hypothese eines möglichen Zusammenwirkens von PC-1 und Arginase bei der Proliferation und Progression des Prostatakarzinoms kann nur mit Hilfe weiterer Untersuchungen vertieft werden.

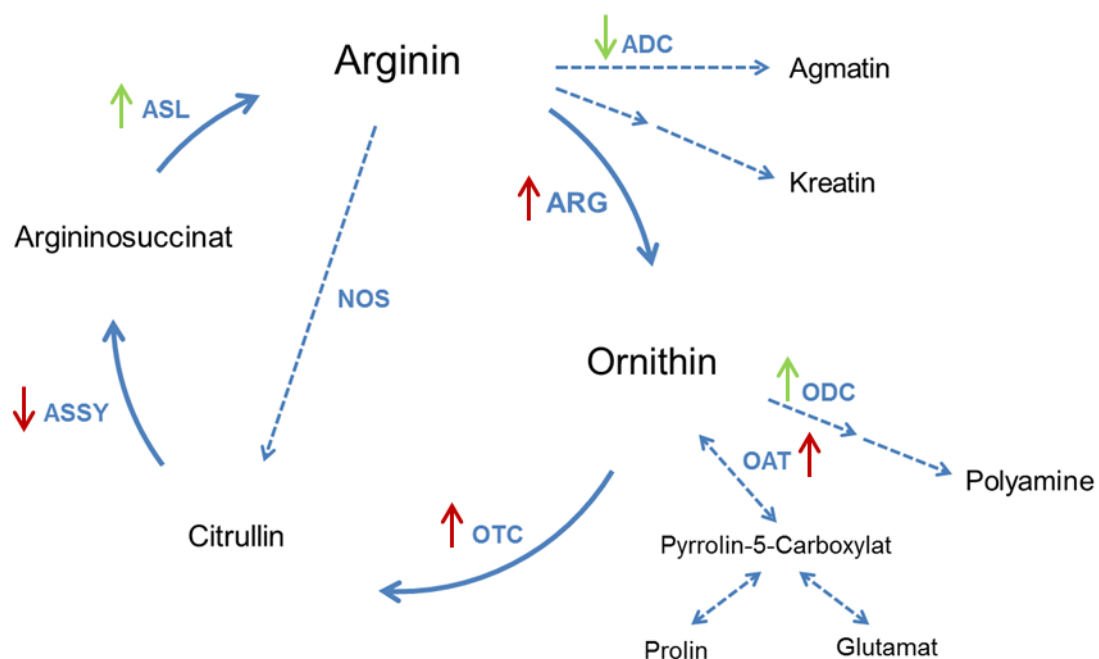
Enzymaktivität

Durch Androgenablation, Hemmung der Arginaseexpressionen oder deren katalytische Aktivität kann die Bildung notwendiger Polyamine eingeschränkt und das Tumorstadium verlangsamt werden [57, 59-61].

Da anhand der Proteinexpressionen keine Aussagen über die katalytische Aktivität getroffen werden können, wurde die Enzymaktivität der Arginase nach verschiedenen Zellkulturbedingungen analysiert. Im Vergleich zu den Proben im Standardmedium wurde in CTM ohne R1881 eine geringere relative Extinktion gemessen, da hier weniger Arginase

exprimiert wird. Unter Einfluss des Androgens R1881 in CTM konnte eine erhöhte relative Extinktion gemessen werden, was wiederum der gesteigerten Expression der Arginase entspricht. Die Werte der Arginaseaktivitätsbestimmung spiegeln insgesamt die Ergebnisse der proteinbiochemischen Untersuchungen des Western Blot wider. Es können jedoch keine Aussagen über die Aktivität der einzelnen Isoformen der Arginase getroffen werden, da keine Isolation der entsprechenden Isoformen erfolgte und das Substrat Arginin nicht isoformspezifisch ist. Die Erweiterung dieser Messungen auf Lysate aus Zellfraktionierungen könnte zusätzliche Hinweise zur Aktivität von Arginase-1 im Kern bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen ergeben.

Die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen in der Modellzelllinie LNCaP veranschaulichten die Androgen-abhängige Regulation der Expressionen von PC-1 und Enzymen des Argininstoffwechsels (Abb. 30).



**Abb. 30: Veränderungen der Enzyme des Argininstoffwechsel in LNCaP-Zellen
- Einfluss von synthetischem Androgen R1881 in hormonablatiertem Medium**

grün – mRNA-Ebene; rot - Proteinebene

ADC, Arginindecarboxylase; ARG, Arginase; ASL, Argininosuccinatlyase; ASSY, Argininosuccinatsynthetase; NOS, Stickstoffmonoxidsynthase; OAT, Ornithinaminotransferase; ODC, Ornithindecaboxylase; OTC, Ornithintranscarbamylyase

Die hier gewonnenen Erkenntnisse lassen keine einheitlichen Aussagen zur veränderten Stoffwechsellage zu. Die gesteigerte Aktivität der Arginase und der Ornithinaminotransferase

könnten als Ornithinquelle angesehen werden. Eine erhöhte Menge an Ornithin könnte durch die Ornithindecaboxylase verarbeitet werden. Dies würde den Weg zu einer gesteigerten Polyaminsynthese ebnen. Zur Untermauerung wären Analysen zum Enzym auf Proteinebene sowie quantitative Analysen der Polyamine notwendig, um gesicherte Aussagen zu treffen. Andererseits könnte ein Abfluss des Ornithins auch in Richtung Citrullin erfolgen (Anstieg der Ornithintranscarbonylase). Da durch Herunterregulation der ASSY Citrullin wohl kein Substrat für Argininrecycling darstellt, kann über den Verbleib dieser nichtproteinogenen Aminosäure nur spekuliert werden. Auch die Verwendung des Ornithins zur Synthese von Prolin ist denkbar (Anstieg der Ornithinaminotransferase). Des Weiteren konnte anhand verschiedener Methoden eine Interaktion zwischen Arginase-1 und PC-1 nachgewiesen werden, deren gemeinsame Funktion bei der Tumorentwicklung und Proliferation erst durch weitere Untersuchungen ergründet werden kann. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse könnten neue Therapieansätze für das Prostatakarzinom geschaffen werden.

5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist einer der häufigsten malignen Tumoren des Mannes, für dessen Behandlung verschiedene Therapieoptionen zu Verfügung stehen. Aufgrund steigender Inzidenzzahlen und Sterbefälle ist das Verständnis der Pathophysiologie und biochemischer Zusammenhänge dieser Erkrankung für die Entwicklung neuer Ansätze in Therapie und Prävention von entscheidender Bedeutung.

Der Einfluss von PC-1 (Isoform 1 des Tumorproteins D52) auf die Proliferation, Tumorprogression und Entwicklung eines kastrationsresistenten Karzinoms unter Androgenablativer Therapie ist bekannt, genauere Mechanismen sind jedoch bis heute nicht vollständig geklärt. Durch *Pulldown*-Experimente aus Vorarbeiten wurde die Arginase-1 als möglicher Interaktionspartner von PC-1 identifiziert. Dieses Enzym fördert durch Bildung von Polyaminvorläufern und immunsupprimierende Eigenschaften die Proliferation in verschiedenen Tumorgeweben und ist wie PC-1 auch im Prostatakarzinom überexprimiert.

Zur Charakterisierung des Enzyms Arginase-1 und dessen Rolle im Argininmetabolismus des Prostatakarzinoms wurden Expressionsprofile beider Arginase-Isoformen sowie weiterer Enzyme des Argininstoffwechsels (ASSY, OTC, OAT) in LNCaP-Zellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen nach 3, 7 und 11 Tagen bestimmt. Die Quantifizierung von mRNA und Proteinen zeigte verringerte Expressionen von Arginase-1, Arginase-2 und PC-1 unter Androgenablation sowie erhöhte Expressionen unter Einfluss des synthetischen Steroidhormons R1881. Die Werte der Enzymaktivitätsbestimmung der Arginase bestätigten diese Ergebnisse. In stabil transfizierten LNCaP-PC-1-Zellen wurde gezeigt, dass allein die Überexpression von PC-1 zu leicht erhöhten Expressionen beider Arginase-Isoformen führt.

Mit Hilfe von Zellfraktionierung und Immunfluoreszenzfärbungen konnten die intrazellulären Lokalisationen der untersuchten Proteine bestimmt werden. Die Arginase-1 wurde sowohl im Zytoplasma als auch im Kern detektiert, während PC-1 und andere Enzyme des Argininstoffwechsels vorwiegend im Zellplasma nachgewiesen werden konnten. Eine Kolokalisation zwischen Arginase-1 und PC-1 würde dementsprechend nur im Zytoplasma der Zellen erwartet werden. Mit Hilfe von Kolokalisationsanalysen anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen und der Co-Immunpräzipitation konnte eine Interaktion zwischen PC-1 und Arginase-1 verifiziert werden.

Diese Erkenntnisse zur Arginase-1 sowie weitere, notwendige Untersuchungen einer potenziellen, möglicherweise synergistischen Interaktion mit PC-1 im Zusammenhang mit Proliferation und Tumorprogression des Prostatakarzinoms könnten neue Therapieansätze ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Schiebler, T. H.; Korf, H.-W.: Anatomie; Steinkopff Verlag; 10. Auflage; 2007; S. 384, 414-415
- [2] Zilles, K.; Tillmann, B.: Anatomie; Springer Medizin Verlag; Heidelberg 2010; S. 537-539
- [3] Aumüller, G.; Aust, G.; Doll, A.; Engele, J.; Kirsch, J.; Mense, S.; Reißig, D.; Salvetter, J.; Schmidt, W.; Schmitz, F.; Schulte, E.; Spanel-Borowski, K.; Wolff, W.; Wurzinger, L. J.; Zilch, H.-G.: Duale Reihe. Anatomie; Georg Thieme Verlag KG; 2. Auflage; Stuttgart 2010; S. 589, 751-752
- [4] Drenckhahn, D.; Waschke, J.: Benninghoff Taschenbuch Anatomie. Elsevier GmbH; 1. Auflage; München 2008; S. 313-315
- [5] Schünke, M.; Schulte, E., Schumacher, U.: Prometheus. LernAtlas der Anatomie. Innere Organe; Georg Thieme Verlag KG; 3. Auflage; Stuttgart 2012; S. 329
- [6] Welsch, U.; Deller, T.: Lehrbuch Histologie; Elsevier GmbH; 3. Auflage; München 2010; S. 417-421
- [7] Lüllmann-Rauch, R.; Paulsen, F.: Taschenlehrbuch Histologie; Georg Thieme Verlag KG; 4. Auflage; Stuttgart 2012; S. 504-506
- [8] Thüroff, J. W.; Schmidt, F.: Urologische Differenzialdiagnose; Georg Thieme Verlag KG; 2. Auflage; Stuttgart 2007; S. 115-117
- [9] Hautmann, R.: Urologie; Springer Medizin Verlag; 4. Auflage; Heidelberg 2010; S. 238-250
- [10] Rübber, H.: Uroonkologie; Springer Medizin Verlag; 5. Auflage; Heidelberg 2009; S. 485-601
- [11] Baade, P. D.; Youlden, D. R.; Cramb, S. M.; Dunn, J.; Gardiner, R. A.: Epidemiology of prostate cancer in the Asia-Pacific region. Prostate International 2013; 1(2): 47-58
- [12] Brawley, O. W.: Prostate cancer epidemiology in the United States. World Journal of Urology 2012 Apr; 30(2): 195-200
- [13] Robert Koch-Institut: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 36. Prostataerkrankungen; 2007
- [14] Schmelz, H. U.; Sparwasser, C.; Weidner, W.: Facharztwissen Urologie; Springer Medizin Verlag; 2. Auflage; Heidelberg 2010; S. 312-375
- [15] Leitzmann, M. F.; Rohrmann, S.: Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. Journal of Clinical Epidemiology 2012; 4: 1-11
- [16] Bostwick, D. G.; Burke, H. B.; Djakiew, D.; Euling, S.; Ho, S. M.; Landolph, J.; Morrison, H.; Sonawane, B.; Shifflett, T.; Waters, D. J.; Timms, B.: Human Prostate Cancer Risk Factors. Cancer 2004; 101(10 Suppl): 2371-490

- [17] Dennis, L. K.; Dawson, D. V.: Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology* 2002 ; 13(1): 72-9
- [18] Hoedemaeker, R. F.; Rietbergen, J. B.; Kranse, R.; Schröder, F. H.; van der Kwast, T. H.: Histopathological prostate cancer characteristics at radical prostatectomy after population based screening. *The Journal of Urology* 2000; 164(2): 411-5
- [19] Leitlinienprogramm Onkologie: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.; Version 4.0 - Dezember 2016
- [20] Abrahamsson, P. A.: Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* 1999; 39(2): 135-48
- [21] Shannon, R. L.; Ro, J. Y.; Grignon, D. J.; Ordonez, N. G.; Johnson, D. E.; Mackay, B.; Tetu, B.; Ayala, A. G.: (1992) Sarcomatoid carcinoma of the prostate. *Cancer* 1991; 69: 2676-2682
- [22] Böcker, W.; Denk, H.; Heitz, Ph. U.; Moch, H.: *Pathologie*; Elsevier GmbH; 4. Auflage; München 2008; S. 918-924
- [23] Thomas, C.: *Histopathologie*; Schattauer GmbH; 13. Auflage; Stuttgart 2001; S. 226-229
- [24] Wu, C. P.; Gu, F. L.: The prostate in eunuchs. *Prog Clin Biol Res.* 1991; 370: 249-55
- [25] Zhu, Y. S.; Sun, G. H.: 5 α -Reductase Isozymes in the Prostate. *Journal of Medical Sciences* 2005; 25(1): 1-12
- [26] Thigpen, A. E.; Silver, R. I.; Guileyardo, J. M.; Casey, M. L.; McConnell, J. D.; Russell, D. W.: Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92(2): 903-10
- [27] Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; Elsevier GmbH; 11. Auflage; München 2013; S. 679
- [28] Löffler, G.; Petrides, P. E.; Heinrich, P. C.: *Biochemie und Pathobiochemie*; Springer Medizin Verlag; 8. Auflage; Heidelberg 2007; S. 445-447, 459-462, 763-765, 870-878
- [29] Rasso, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R.: *Duale Reihe. Biochemie*; Georg Thieme Verlag KG; 3. Auflage; Stuttgart 2012; S. 554-555, 600-602
- [30] Grossmann, M. E.; Huang, H.; Tindall, D. J.: Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2001; 93(22): 1687-97
- [31] Edwards, J.; Bartlett, J. M.: The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor. *BJU International* 2005; 95(9): 1320-6

- [32] Byrne, J. A.; Tomasetto, C.; Garnier, J. M.; Rouyer, N.; Mattei, M. G.; Bellocq, J. P.; Rio, M. C.; Basset, P.: A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence. *Cancer Research* 1995; 55(13): 2896-903
- [33] Chen, S. L.; Maroulakou, I. G.; Green, J. E.; Romano-Spica, V.; Modi, W.; Lautenberger, J.; Bhat, N. K.: Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers. *Oncogene* 1996; 12(4): 741-51
- [34] Rubin, M. A.; Varambally, S.; Beroukhi, R.; Tomlins, S. A.; Rhodes, D. R.; Paris, P. L.; Hofer, M. D.; Storz-Schweizer, M.; Kuefer, R.; Fletcher, J. A.; His, B. L.; Byrne, J. A.; Pienta, K. J.; Collins, C.; Sellers, W. R.; Chinnaiyan, A. M.: Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. *Cancer Research* 2004; 64(11): 3814-22
- [35] Wang, R.; Xu, J.; Saramäki, O.; Visakorpi, T.; Sutherland, W. M.; Zhou, J.; Sen, B.; Lim, S. D.; Majeesh, N.; Amin, M.; Dong, J. T.; Petros, J. A.; Nelson, P. S.; Marshall, F. F.; Zhou, H. E.; Chung, L. W.: PrLZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. *Cancer Research* 2004; 64(5): 1589-94
- [36] Byrne, J. A.; Balleine, R. L.; Schoenberg Fejzo, M.; Mercieca, J.; Chiew, Y. E.; Livnat, Y.; St Heaps, L.; Peters, G. B.; Byth, K.; Karlan, B. Y.; Slamon, D. J.; Harnett, P.; Defazio, A.: Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 2005; 117(6): 1049-54
- [37] Byrne, J. A.; Mattei, M. G.; Basset, P.: Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52). *Genomics* 1996; 35(3): 523-32
- [38] Byrne, J. A.; Nourse, C. R.; Basset, P.; Gunning, P.: Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system. *Oncogene* 1998; 16(7): 873-81
- [39] Proux, V.; Provot, S.; Felder-Schmittbuhl, M. P.; Laugier, D.; Calothy, G.; Marx, M.: Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(48): 30790-7
- [40] Nourse, C. R.; Mattei, M. G.; Gunning, P.; Byrne, J. A.: Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1443(1-2): 155-68
- [41] Boutros, R.; Bailey, A. M.; Wilson, S. H.; Byrne, J. A.: Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3 binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins. *Journal of Molecular Biology* 2003; 332(3): 675-87

- [42] Boutros, R.; Fanayan, S.; Shehata, M.; Byrne, J. A.: The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles. *iochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 325(4): 1115-21
- [43] Li, L.; Zhang, D.; Zhang, L.; Zhu, G.; Sun, Y.; Wu, K.; Wang, X.; He, D.: PrLZ expression is associated with the progression of prostate cancer LNCaP cells. *Molecular Carcinogenesis* 2009; 48(5): 432-40
- [44] Moritz, T.; Venz, S.; Junker, H.; Kreuz, S.; Walther, R.; Zimmermann, U.: Isoform 1 of TPD52 (PC-1) promotes neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer cells. *Tumor Biology* 2016; 37(8): 10435-46
- [45] Li, L.; Xie, H.; Liang, L.; Gao, Y.; Zhang, D.; Fang, L.; Lee, S. O.; Luo, J.; Chen, X.; Wang, X.; Chang, L. S.; Yeh, S.; Wang, Y.; He, D.; Chang, C.: Increased PrLZ-mediated androgen receptor transactivation promotes prostate cancer growth at castration-resistant stage. *Carcinogenesis* 2013; 34(2): 257-67
- [46] Zhang, H.; Wang, J.; Pang, B.; Liang, R X.; Li, S.; Huang, P. T.; Wang, R.; Chung, L. W.; Zhau, H. E.; Huang, C.; Zhou, J. G.: PC-1/PrLZ contributes to malignant progression in prostate cancer. *Cancer Research* 2007; 67(18): 8906-13
- [47] Edwards, J.; Krishna, N. S.; Witton, C. J.; Bartlett, J. M.: Gene amplifications associated with the development of hormone-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 2003; 9(14): 5271-81
- [48] Jenkinson, C. P.; Grody, W. W.; Cederbaum, S. D.: Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 1996; 114(1): 107-32
- [49] Vockley, J. G.; Jenkinson, C. P.; Shukla, H.; Kern, R. M.; Grody, W. W.; Cederbaum, S. D.: Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics* 1996; 38(2): 118-23
- [50] Cederbaum, S. D.; Yu, H.; Grody, W. W.; Kern, R. M.; Yoo, P.; Iyer, R. K.: Arginases I and II: do their functions overlap? *Molecular Genetics and Metabolism* 2004; 81 Suppl 1: 38-44
- [51] Mumenthaler, S. M.; Yu, H.; Tze, S.; Cederbaum, S. D.; Pegg, A. E.; Seligson, D. B.; Grody, W. W.: Expression of arginase II in prostate cancer. *International Journal of Oncology* 2008; 32(2): 357-65
- [52] Harris, B. E.; Pretlow, T. P.; Bradley, E. L. Jr.; Whitehurst, G. B.; Pretlow, T. G. 2nd.: Arginase activity in prostatic tissue of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Cancer Research* 1983 ; 43(6): 3008-12
- [53] Bronte, V.; Kasic, T.; Gri, G.; Gallana, K.; Borsellino, G.; Marigo, I.; Battistini, L.; Iafrate, M.; Prayer-Galetti, T.; Pagano, F.; Viola, A.: Boosting antitumor responses of T

- lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *Journal of Experimental Medicine* 2005; 201(8): 1257-68
- [54] Singh, R.; Pervin, S.; Karimi, A.; Cederbaum, S.; Chaudhuri, G.: Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Research* 2000; 60(12): 3305-12
- [55] Buga, G. M.; Wie, L. H.; Bauer, P. M.; Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J.: NG-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms. *American Journal of Physiology* 1998; 275(4 Pt 2): 1256-64
- [56] Tate, D. J. Jr.; Vonderhaar, D. J.; Caldas, Y. A.; Metoyer, T.; Patterson, J. R. 4th.; Aviles, D. H.; Zea, A. H.: Effect of arginase II on L-arginine depletion and cell growth in murine cell lines of renal cell carcinoma. *Journal of Hematology & Oncology* 2008; 1: 14
- [57] Gannon, P. O.; Godin-Ethier, J.; Hassler, M.; Delvoye, N.; Aversa, M.; Poisson, A. O.; Péant, B.; Alam Fahmy, M.; Saad, F.; Lapointe, R.; Mes-Masson, A. M.: Androgen-regulated expression of arginase 1, arginase 2 and interleukin-8 in human prostate cancer. *PLoS ONE* 2010; 5(8): e12107
- [58] Schipper, R. G.; Romijn, J. C.; Cuijpers, V. M.; Verhofstad, A. A.: Polyamines and prostatic cancer. *Biochemical Society Transactions* 2003; 31(2): 375-80
- [59] Erbaş, H.; Bal, O.; Çakır, E.: Effect of rosuvastatin on arginase enzyme activity and polyamine production in experimental breast cancer. *Balkan Medical Journal* 2015; 32(1): 89-95
- [60] Stolarczyk, M.; Piwowarski, J. P.; Granica, S.; Stefańska, J.; Naruszewicz, M.; Kiss, A. K.: Extracts from *Epilobium* sp. herbs, their components and gut microbiota metabolites of *Epilobium* ellagitannins, urolithins, inhibit hormone-dependent prostate cancer cells-(LNCaP) proliferation and PSA secretion. *Phytotherapy Research* 2013; 27(12): 1842-8
- [61] Girard-Thernier, C.; Pham, T. N.; Demougeot, C.: The Promise of Plant-Derived Substances as Inhibitors of Arginase. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2015; 15(10): 798-808
- [62] Bedoya, A. M.; Tate, D. J.; Baena, A.; Córdoba, C. M.; Borrero, M.; Pareja, R.; Rojas, F.; Patterson, J. R.; Herrero, R.; Zea, A. H.; Sanchez, G. I.: Immunosuppression in cervical cancer with special reference to arginase activity. *Gynecologic Oncology* 2014; 135(1): 74-80
- [63] Munder, M.: Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal of Pharmacology* 2009; 158(3): 638-51
- [64] Mussai, F.; Egan, S.; Hunter, S.; Webber, H.; Fisher, J.; Wheat, R.; McConville, C.; Sbirkov, Y.; Wheeler, K.; Bendle, G.; Petrie, K.; Anderson, J.; Chesler, L.; De Santo,

- C.: Neuroblastoma Arginase Activity Creates an Immunosuppressive Microenvironment That Impairs Autologous and Engineered Immunity. *Cancer Research* 2015; 75(15): 3043-53
- [65] Rotondo, R.; Barisione, G.; Mastracci, L.; Grossi, F.; Orengo, A. M.; Costa, R.; Truini, M.; Fabbi, M.; Ferrini, S.; Barbieri, O.: IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer* 2009; 125(4): 887-93
- [66] Rotondo, R.; Bertolotto, M.; Barisione, G.; Astigiano, S.; Mandruzzato, S.; Ottonello, L.; Dallegri, F.; Bronte, V.; Ferrini, S.; Barbieri, O.: Exocytosis of azurophil and arginase 1-containing granules by activated polymorphonuclear neutrophils is required to inhibit T lymphocyte proliferation. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 89(5): 721-7
- [67] Yang, Z.; Ming, X. F.: Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 533
- [68] Jablonski, K. A.; Amici, S. A.; Webb, L. M.; Ruiz-Rosado Jde, D.; Popovich, P. G.; Partida-Sanchez, S.; Guerau-de-Arellano, M.: Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE* 2015; 10(12): e0145342
- [69] Wynn, T. A.; Chawla, A.; Pollard, J. W.: Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* 2013; 496(7446): 445-55
- [70] Yu, T.; Zhao, L.; Huang, X.; Ma, C.; Wang, Y.; Zhang, J.; Xuan, D.: Enhanced Activity of the Macrophage M1/M2 Phenotypes and Phenotypic Switch to M1 in Periodontal Infection. *Journal of Periodontology* 2016: 1-21
- [71] Lind, D. S.: Arginine and Cancer. *Journal of Nutrition* 2004; 134(10 Suppl): 2837-2841
- [72] Hsueh, E. C.; Knebel, S. M.; Lo, W. H.; Leung, Y. C.; Cheng, P. N.; Hsueh, C. T.: Deprivation of arginine by recombinant human arginase in prostate cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology* 2012; 5: 17
- [73] Li, H.; Meininger, C. J.; Bazer, F. W.; Wu, G.: Intracellular sources of ornithine for polyamine synthesis in endothelial cells. *Amino Acids*. 2016; 48(10): 2401-10
- [74] Dallmann, K.; Junker, H.; Balabanov, S.; Zimmermann, U.; Giebel, J.; Walther, R.: Human arginase is diminished in the clear cell type of renal cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 2004; 108(3): 342-7
- [75] Bhatta, A.; Yao, L.; Toque, H. A.; Shatanawi, A.; Xu, Z.; Caldwell, R. B.; Caldwell, R. W.: Angiotensin II-induced arterial thickening, fibrosis and stiffening involves elevated arginase function. *PLoS ONE* 2015; 10(3): e0121727
- [76] Srivastava, S.; Ghosh, S. K.: Modulation of L-Arginine-Arginase Metabolic Pathway Enzymes: Immunocytochemistry and mRNA Expression in Peripheral Blood and

- Tissue Levels in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas in North East India. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2015; 16(16): 7031-8
- [77] Heinke, P.: Nachweis von Interaktionspartnern des prostataspezifischen Tumorproteins PrLZ unter Nutzung der Tandem Affinity Purification (TAP)-Methode; Bachelorarbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2014
- [78] Klein, M.: Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Tumorproteins D52; Diplomarbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2013
- [79] Bolte, S.; Cordelières, F. P.: A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* 2006; 224(Pt 3): 213-32
- [80] Schreiber, E.; Matthias, P.; Müller, M. M.; Schaffner, W.: Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Research* 1989; 17(15): 6419
- [81] Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-54
- [82] Margineanu, A.; Chan, J. J.; Kelly, D. J.; Warren, S. C.; Flatters, D.; Kumar, S.; Katan, M.; Dunsby, C. W.; French, P. M.: Screening for protein-protein interactions using Förster resonance energy transfer (FRET) and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Scientific Reports* 2016; 6: 28185
- [83] Chan, F. K.; Siegel, R. M.; Zacharias, D.; Swofford, R.; Holmes, K. L.; Tsien, R. Y.; Lenardo, M. J.: Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein. *Cytometry* 2001; 44(4): 361-8
- [84] Banning, C.; Votteler, J.; Hoffmann, D.; Koppensteiner, H.; Warmer, M.; Reimer, R.; Kirchhoff, F.; Schubert, U.; Hauber, J.; Schindler, M.: A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells. *PLoS ONE* 2010; 5(2): e9344
- [85] Yamanaka, H.; Kirdani, R.Y.; Saroff, J.; Murphy, G. P.; Sandberg, A. A.: Effects of testosterone and prolactin on rat prostatic weight, 5alpha-reductase, and arginase. *American Journal of Physiology* 1975; 229(4): 1102-9
- [86] Manteuffel-Cymborowska, M.; Chmurzyńska, W.; Peska, M.; Grzelakowska-Sztabert, B.: Arginine and ornithine metabolizing enzymes in testosterone-induced hypertrophic mouse kidney. *International Journal of Biochemistry* 1995; 27(3): 287-95
- [87] Levillain, O.; Diaz, J. J.; Blanchard, O.; Déchaud, H.: testosterone down-regulates ornithine aminotransferase gene and up-regulates arginase II and ornithine

- decarboxylase genes for polyamines synthesis in the murine kidney. *Endocrinology* 2005; 146(2): 950-9
- [88] Xu, Q.; Baker, B.S.; Tata, J. R.: Developmental and hormonal regulation of the *Xenopus* liver-type arginase gene. *European Journal of Biochemistry* 1993; 211(3): 891-8
- [89] Borsuk, P.; Przykorska, A.; Blachnio, K.; Koper, M.; Pawlowicz, J. M.; Pekala, M.; Weglenski, P.: L-arginine influences the structure and function of arginase mRNA in *Aspergillus nidulans*. *Biological Chemistry* 2007; 388(2): 135-44
- [90] Olszewska, A.; Król, K.; Weglenski, P.; Dzikowska, A.: Arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* is regulated by the *rrmA* gene coding for the RNA-binding protein. *Fungal Genetics and Biology* 2007; 44(12): 1285-97
- [91] Yu, H. R.; Kuo, H. C.; Huang, L. T.; Chen, C. C.; Tain, Y. L.; Sheen, J. M.; Tiao, M. M.; Huang, H. C.; Yang, K. D.; Ou, C. Y.; Hsu, T. Y.: L-Arginine modulates neonatal lymphocyte proliferation through an interleukin-2 independent pathway. *Immunology* 2014; 143(2): 184-92
- [92] Hossain, D. M.; Pal, S. K.; Moreira, D.; Duttagupta, P.; Zhang, Q.; Won, H.; Jones, J.; D'Apuzzo, M.; Forman, S.; Kortylewski, M: TLR9-Targeted STAT3 Silencing Abrogates Immunosuppressive Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells from Prostate Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 2015; 21(16): 3771-82
- [93] Jariwala, U.; Prescott, J.; Jia, L.; Barski, A.; Pregizer, S.; Cogan, J. P.; Arasheben, A.; Tilley, W. D.; Scher, H. I.; Gerald, W. L.; Buchanan, G.; Coetzee, G. A.; Frenkel, B.: Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Molecular Cancer* 2007; 6: 39
- [94] Bigot, P.; Mouzat, K.; Lebdai, S.; Bahut, M.; Benhabiles, N.; Tassin, G. C.; Azzouzi, A. R.; Cussenot, O.: Quantitative proteomic determination of diethylstilbestrol action on prostate cancer. *Asian Journal of Andrology* ; 15(3): 413-20
- [95] Wu, L.; Li, L.; Meng, S.; Qi, R.; Mao, Z.; Lin, M.: Expression of argininosuccinate synthetase in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; 28(2): 365-8
- [96] Delage, B.; Fennell, D. A.; Nicholson, L.; McNeish, I.; Lemoine, N. R.; Crook, T.; Szlosarek, P. W.: Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. *International Journal of Cancer* 2010, 126(12): 2762-72
- [97] Kim, R. H.; Bold, R. J.; Kung, H. J.: ADI, autophagy and apoptosis: metabolic stress as a therapeutic option for prostate cancer. *Autophagy* 2009; 5(4): 567-8
- [98] Dillon, B. J.; Prieto, V. G.; Curley, S. A.; Ensor, C. M.; Holtsberg, F. W.; Bomalaski, J. S.; Clark, M. A.: Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency

- in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation. *Cancer* 2004; 100(4): 826-33
- [99] Mohan, R. R.; Challa, A.; Gupta, S.; Bostwick, D. G.; Ahmad, N.; Agarwal, R.; Marengo, S. R.; Amini, S. B.; Paras, F.; MacLennan, G.T.; Resnick, M. I.; Mukhtar, H.: Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans. *Clinical Cancer Research* 1999; 5(1): 143-7
- [100] Cipolla, B. G.; Ziade, J.; Bansard, J. Y.; Moulinoux, J. P.; Staerman, F.; Quemener, V.; Lobel, B.; Guillé, F.: Pretherapeutic erythrocyte polyamine spermine levels discriminate high risk relapsing patients with M1 prostate carcinoma. *Cancer* 1996; 78(5): 1055-65
- [101] Kanerva, K.; Mäkitie, L. T.; Bäck, N.; Andersson, L. C.: Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor 2 regulates intracellular vesicle trafficking. *Experimental Cell Research* 2010; 316(11): 1896-906
- [102] Rasila, T.; Lehtonen, A.; Kanerva, K.; Mäkitie, L. T.; Haglund, C.; Andersson, L. C.: Expression of ODC Antizyme Inhibitor 2 (AZIN2) in Human Secretory Cells and Tissues. *PLoS ONE* 2016; 11(3): e0151175
- [103] Mäkitie, L. T.; Kanerva, K.; Sankila, A.; Andersson, L. C.: High expression of antizyme inhibitor 2, an activator of ornithine decarboxylase in steroidogenic cells of human gonads. *Histochemistry and Cell Biology* 2009; 132(6): 633-8
- [104] Hung, Y. H.; Huang, H. L.; Chen, W. C.; Yen, M. C.; Cho, C. Y.; Weng, T. Y.; Wang, C. Y.; Chen, Y. L.; Chen, L. T.; Lai, M. D.: Argininosuccinate lyase interacts with cyclin A2 in cytoplasm and modulates growth of liver tumor cells. *Oncology Reports* 2017; 37(2): 969-978
- [105] Huang, H. L.; Chen, W. C.; Hsu, H. P.; Cho, C. Y.; Hung, Y. H.; Wang, C. Y.; Lai, M. D.: Silencing of argininosuccinate lyase inhibits colorectal cancer formation. *Oncology Reports* 2017; 37(1): 163-170
- [106] Huang, H. L.; Chen, W. C.; Hsu, H. P.; Cho, C. Y.; Hung, Y. H.; Wang, C. Y.; Lai, M. D.: Argininosuccinate lyase is a potential therapeutic target in breast cancer. *Oncology Reports* 2015; 34(6): 3131-9
- [107] Zhang, D.; He, D.; Xue, Y.; Wang, R.; Wu, K.; Xie, H.; Zeng, J.; Wang, X.; Zhau, H. E.; Chung, L. W.; Chang, L. S.; Li, L.: PrLZ protects prostate cancer cells from apoptosis induced by androgen deprivation via the activation of Stat3/Bcl-2 pathway. *Cancer Research* 2011 ; 71(6): 2193-202

