

Identifizierung von Progesteron-regulierten Genen in einer T47D-Brustkrebszelllinie durch den Einsatz der Microarray-Technologie

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Sonja Mrusek

aus

Düren

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Dr.rer.nat. Henning M. Beier

Frau Universitätsprofessorin
Dr.med. Ruth Knüchel-Clarke

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2004

Fortschritte der Anatomie, Embryologie und Reproduktionsbiologie

Herausgeber

Professor Dr.med. Dr.rer.nat. Henning M. Beier
Direktor des Instituts für Anatomie und Reproduktionsbiologie der
RWTH Aachen

Sonja Mrusek

**Identifizierung von Progesteron-regulierten Genen
in einer T47D-Brustkrebszelllinie durch den Einsatz
der Microarray-Technologie**

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag
Aachen 2004

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2004

Copyright Shaker Verlag 2004

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-3191-9

ISSN 1436-8803

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	2
2.1 Kultivierung von T47D-Zellen	2
2.2 Immunhistochemischer Nachweis von Steroidhormon-Rezeptoren und dem Proliferationsantigen Ki67	3
2.3 Microarray-Hybridisierung	4
2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA	5
2.3.1.1 RNA wiz TM	5
2.3.1.2 Reinigung der RNA mit RNeasy Mini-Kit	6
2.3.2 Qualitätskontrolle der RNA	6
2.3.2.1 Spektrophotometrie	6
2.3.2.2 RNA-Gelelektrophorese	7
2.3.2.3 RT-PCR mit einem Intron-überspannenden Primer-Paar	8
2.3.3 Markierung der RNA-Proben in der cDNA-Synthese mit Cyanin3- oder Cyanin5-dUTP	8
2.3.4 Reinigung der markierten cDNAs mit Microcon-Säulen	9
2.3.5 Hybridisieren und Waschen des Microarrays	9
2.3.6 Bildanalyse durch den Hersteller	10
2.4 Semiquantitative RT-PCR	11
2.4.1 cDNA-Synthese mit Ready-to-Go TM You-Prime First-Strand Beads	11
2.4.2 cDNA-Gelelektrophorese	11
2.4.3 PCR-Reaktion	11
3. Ergebnisse	14
3.1 Nachweis von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren sowie des Ki 67-Antigens in hormonbehandelten T47D-Zellen	14
3.1.1 Östrogen- und Progesteron-Rezeptor	14
3.1.1.1 Immunhistochemie	14
3.1.1.2 Semiquantitative RT-PCR	14
3.1.2 Proliferationsnachweis mit dem Marker Ki 67	15

3.2 Ergebnisse der Microarray-Hybridisierung	17
3.2.1 Scatter Plot	17
3.2.2 False Color Overlay	18
3.2.3 Datenanalyse	19
3.3 Verifizierung der Array-Ergebnisse mittels semiquantitativer RT-PCR	20
3.3.1 cDNA-Synthese und RT-PCR mit Primer-Paaren der Housekeeping Gene	20
3.3.2 Hormonell regulierte Gene	23
3.3.3 Gene ohne hormonelle Regulation	26
3.3.3.1 Gene, die weder in der Array-Hybridisierung noch in der RT-PCR eine Regulation aufwiesen	26
3.3.3.2 Gene, die in der Array-Hybridisierung reguliert erschienen, aber mit der RT-PCR nicht als reguliert bestätigt werden konnten	26
4. Diskussion	28
4.1 Methodischer Teil	28
4.1.1 Die T47D-Zelllinie	28
4.1.2 Regulation der Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) mRNA-Expression und des ER- und PR-Proteins durch Estradiol und Medroxyprogesteronacetat (MPA)	28
4.1.2.1 Östrogen- und Progesteronrezeptor	28
4.1.2.2 Wirkung von Estradiol auf den Östrogen- und Progesteronrezeptor	28
4.1.2.3 Wirkung von Estradiol/MPA und MPA allein auf den Östrogen- und Progesteronrezeptor	29
4.1.2.4 Zusammenfassende Interpretation der Hormonrezeptorregulation	30
4.1.3 Die Bedeutung von Microarray-Systemen	30
4.1.4 Verifizierung der Microarray-Ergebnisse	32
4.2 Diskussion der funktionellen Aspekte der ausgewählten Gene	33
4.2.1 Hormonell regulierte Gene	33
4.2.2 Gene ohne hormonelle Regulation	39
4.2.3 Zusammenfassende Diskussion der analysierten Gene	42
5. Zusammenfassung	45

6. Literaturverzeichnis

47