

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Des Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg
Direktor: Prof. Dr. R. Hofmann

**Nachweis von Transforming growth factor (TGF) -beta2 und TGF-beta2
Rezeptor beim humanen Prostata-Karzinom**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Christina Schmitt geb. Borchers
aus Hannover

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
04.09.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Lutz Konrad

1. Korreferent: Prof. Dr. Reiner Mengel

1. Einleitung	5
1.1. Anatomie der humanen Prostata	5
1.2. Histologie der humanen Prostata	7
1.3. Das Prostata-Karzinom	8
1.4. Der Krankheitsverlauf	9
1.5. Die TNM-Klassifikation	10
1.6. Das Gleason-Grading	11
1.7. Der PSA-Wert	12
1.8. Der Transforming growth factor beta (TGF- β)	14
1.9. Die hoch-affinen Rezeptoren T β RI, T β RII und T β RIII	16
1.10. Der TGF- β -Signalweg	17
1.11. Die Rolle von TGF β beim Prostatakarzinom	19
2. Ziel und Problemstellung	22
3. Patienten, Material und Methoden	23
3.1. Die immunhistochemische Färbung des TGFβ-Rezeptors Typ II	23
3.1.1. Auswahl des Kollektivs	23
3.1.2. Anfertigung der Paraffinschnitte	23
3.1.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	24
3.1.4. Immunhistochemische Detektion mit der Polymerkonjugat-Methode	25
3.1.5. Vorbereitung der Präparate	25
3.1.6. Antikörperdemaskierung	26
3.1.7. Bestimmung des Antikörpertiters	27
3.1.8. Immunreaktion	27
3.1.9. Eindecken der gefärbten Präparate	28
3.1.10. Auswertung	29
3.2. ELISA zur Bestimmung der TGFβ2-Serumkonzentration	29
3.2.1. Auswahl des Patientenkollektivs und Vorbehandlung der Proben	29
3.2.2. Versuchsdurchführung	30
3.2.3. Auswertung	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	33
4.2. Ergebnisse der Bestimmung der TGF β -Serumspiegel mittels ELISA	48
5. Diskussion	53
5.1. Diskussion der Methode	53
5.1.1. Die immunhistochemische Anfärbung des TGF β -Rezeptors Typ II	53
5.1.2. Bestimmung der TGF β 2-Serumkonzentration mittels ELISA	55
5.2. Diskussion der Ergebnisse	56
5.2.1. Ausbreitung des Tumors	56
5.2.2. Aggressivität des Tumors	61
5.2.3. Metastasierung des Tumors	63
5.2.4. Kann die TGF β 2-Serumkonzentration als Tumormarker verwendet werden?	66
6. Zusammenfassung	67
7. Literaturverzeichnis	69
8. Anhang	79

8.1. Abkürzungen	79
8.2. Tabellen	83
8.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer	86
8.5. Danksagung	86
8.6. Ehrenwörtliche Erklärung	88

1. Einleitung

1.1. Anatomie der humanen Prostata

Die Prostata oder Vorsteherdrüse liegt hinter der Symphyse des Mannes. Nach dorsal ist die Prostata durch die zweilagige Denonvilliersche Faszie vom Rektum getrennt. Diese stellt das Serosarudiment des sich in der frühen Embryogenese bis zum Diaphragma urogenital erstreckenden Douglasschen Rezessus dar. Dorsokraniel der Prostata finden sich die Samenblasen und die Vasa deferentia (Hautmann & Huland, 2000).

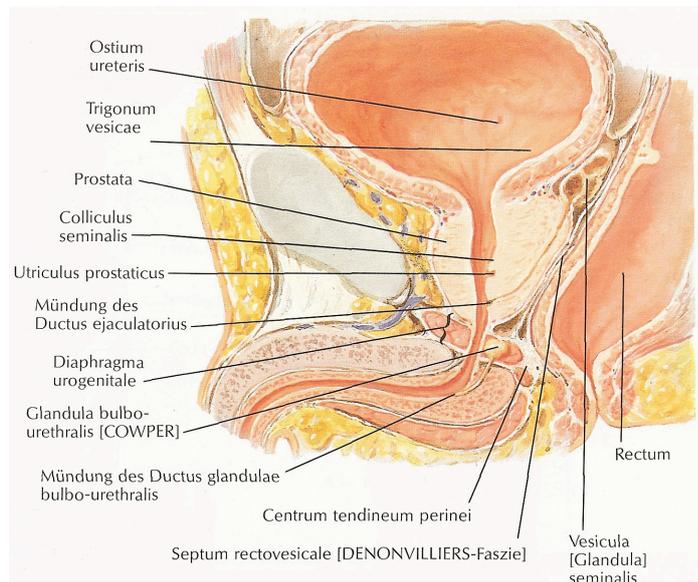


Abb. 1: Sagittalschnitt der männlichen Genitalorgane (aus Netter, 1995).

Die Prostata liegt als fibromuskuläres und drüsiges Organ kaudal der Harnblase. Die normale Prostata des Erwachsenen wiegt ca. 20 g, ist etwa so groß wie eine Kastanie und beherbergt in ihrer Längsachse die ca. 2,5 cm lange hintere Harnröhre. Ventral wird die Prostata durch die Ligamenta puboprostatica an der Dorsalfläche der Symphysis pubis fixiert, kaudal durch das Diaphragma urogenitale unterstützt. An der Prostatahinterseite perforieren die schräg verlaufenden Ductus ejaculatorii den Drüsenkörper und münden am Colliculus seminalis nur wenige Millimeter proximal des quergestreiften Sphincter externus urethrae in das Lumen der prostaticen Harnröhre (Hautmann & Huland, 2000).

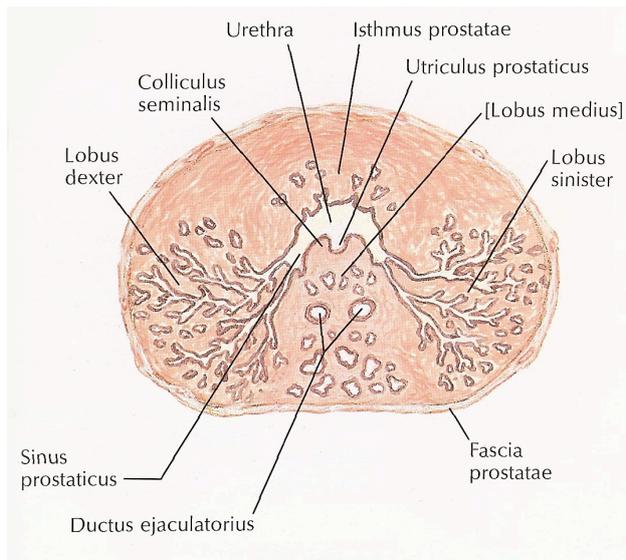


Abb. 2: Querschnitt durch die Prostata (aus Netter, 1995)

Es lassen sich bei der Prostata 5 Lappen unterscheiden: 2 Seitenlappen, 1 Vorderlappen, 1 Mittellappen und 1 Hinterlappen (Hartmann & Huland, 2000). Mc Neal (1981) teilt die Prostata in eine periphere, eine zentrale, eine Transitionalzone, ein anteriores Segment und eine präprostatistische Sphincterzone ein:

- Anteriore Zone: fibromuskuläres Gewebe ohne glanduläre Strukturen
- Zentrale Zone: 25% des Prostatavolumens, enthält die Ductus ejaculatorii, Entstehungsort von entzündlichen Prozessen
- Übergangszone: 5-10% des Prostatavolumens, bestehend aus zwei Seitenlappen, zusammen mit den periurethralen Drüsen Entstehungsort der benignen Prostatahyperplasie
- Periphere Zone: 70% des Prostatavolumens, postero-inferiorer Anteil der Prostata.

Die Tunica muscularis umschließt die Harnröhre und besitzt als kontinuierliche Fortsetzung glatter Muskelfasern der Detrusormuskulatur eine innere longitudinale Muskelschicht. Eine Vielzahl glatter Muskelfasern aus der äußeren Schicht der longitudinal orientierten glatten Muskelzellen aus dem Bereich der trigonalen Detrusormuskulatur strahlen in die Drüsenkörper der Prostata ein. Diese im präprostatistischen Teil der Harnröhre zirkulär angeordneten glatten Muskelfasern repräsentieren den sich der Willkürmotorik entziehenden glatten Sphincter internus des Mannes (Hartmann & Huland, 2000).

1.2. Histologie der humanen Prostata

Histologisch besteht die Prostata aus 30-50 verzweigten tubulo-alveolären Drüsen, die mit 15-30 Ausführungsgängen, den Ductuli prostatici, auf dem Samenhügel und seitlich davon in die Urethra münden. Die Drüsenschläuche erlangen ihre volle Ausbildung erst mit der Pubertät. Sie sind je nach dem Sekretgehalt verschieden weit und die Epithelhöhe spiegelt den Funktionszustand wieder. In gefüllten Drüsenkammern ist das Epithel häufig einschichtig und abgeplattet, sonst kubisch oder ein- bis zweireihig hochprismatisch. Es bildet Falten, ähnlich wie in den Vesiculae seminales, die ein zartes Bindegewebsstroma und Kapillarschlingen enthalten; auf den Falten ist das Epithel gewöhnlich höher als in den dazwischengelegenen Buchten. In den Epithelzellen findet man Körnchen als Vorstufen des Ausscheidungsproduktes, im Lumen nicht selten –am häufigsten bei älteren Männern- aus eingedicktem Sekret hervorgegangene, konzentrisch geschichtete, gelegentlich verkalkte Körperchen, die Prostatasteine (Bucher & Wartenberg, 1997).

Das Stroma der Prostata, das ungefähr ein Viertel bis ein Drittel des Organs einnimmt, bedingt dessen derbe Konsistenz. Es enthält Bündel glatter Muskelzellen, die sich in allen möglichen Richtungen durchflechten und bei der Ejakulation das Sekret auspressen, kollagene Bindegewebsfasern und viele elastische Netze, ferner Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenfasern, gelegentlich auch multipolare, meistens zwei- bis mehrkernige vegetative Ganglienzellen. Oberflächlich besitzt die Vorsteherdrüse eine ebenfalls aus faserigem Bindegewebe und glatter Muskulatur bestehende Kapsel, welche die einzelnen Drüsen zu einem äußerlich einheitlichen Organ zusammenfasst. In dieser Kapsel lässt sich die Prostata stumpf aus dem sie umgebenden Gewebe herauschälen (Bucher & Wartenberg, 1997).

1.3. Das Prostata-Karzinom

Das Prostatakarzinom ist nach dem 70. Lebensjahr der häufigste aller bösartigen Tumoren beim Mann. Die Sterblichkeitsrate steigt linear mit dem Alter und hängt auch davon ab, in welchem geographischen Gebiet die Männer leben und welcher ethnischen Gruppe sie angehören. Bei der weißen Bevölkerung des Westens beträgt die durchschnittliche Mortalitätsrate in allen Altersgruppen 20-45 Fälle pro 100.000 Einwohner und Jahr. Die höchste Mortalitätsrate weist die schwarze Bevölkerung der USA auf (mit 100 Fällen pro 100.000 Einwohner). Signifikant niedriger ist die Sterblichkeit in Afrika und Asien, während die Werte der osteuropäischen Länder und Südamerikas zwischen diesen Extremen liegen. Offensichtlich sind nicht nur genetische Faktoren, sondern auch unbekannte exogene Noxen für diese Unterschiede verantwortlich. So liegt z.B. die Karzinominzidenz bei den nach Amerika ausgewanderten Asiaten deutlich höher als in ihren Heimatländern. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass in den entwickelten Industrieländern aufgrund der höheren Lebenserwartung wesentlich mehr Männer das „Karzinomalter“ erreichen und dass sowohl die Diagnostik als auch die statistische Datenerfassung besser ist (Böcker et al., 2001).

Makroskopisch sind beim Prostatakarzinom derbe, graugelbe, relativ scharf begrenzte Herde zu sehen, die je nach Stadium in einem oder in beiden Lappen auftreten. Das Prostatakarzinom entsteht häufig in der peripheren, androgenabhängigen Zone und wächst erst dann in das Zentrum des Organs und/oder durchbricht die Kapsel und breitet sich im periprostatiscen Fett- und Bindegewebe aus bzw. infiltriert die anliegenden Samenblasen (TNM-Klassifikation, vgl. 1.5.; Riede et al., 2004).

Es besteht häufig eine Resistenz gegenüber wachstumsinhibierenden Faktoren und die Proliferation findet unabhängig von exogenen Wachstumsfaktoren statt. Karzinomzellen fördern die Angiogenese. Sie dringen in anderes Gewebe ein, metastasieren, entziehen sich der Apoptose und der Zerstörung durch das Immunsystem und entwickeln somit eine unlimitierte Potenz zur Vermehrung. Daraus folgt eine genetische Instabilität, da alle regulierenden Übertragungswege zerstört sind (Elliott & Blobel, 2005).

Histologisch zeigt das klassische Prostatakarzinom sehr unterschiedliche Wachstumsmuster. Folgende histologische Grundtypen sind charakteristisch:

- das hochdifferenzierte Adenokarzinom unterscheidet sich nur durch die gestörte Drüsenarchitektur vom normalen Prostatagewebe,
- das niedrigdifferenzierte Adenokarzinom bildet hingegen kleine Tubuli. Das Epithel ist polymorph mit deutlichen Nukleolen und vereinzelt Mitosen,
- das kribiforme Karzinom ist aus großen Zellkomplexen mit kleinen siebartigen Lichtungen aufgebaut (sog. Drüse-in-Drüse-Muster). Große Nukleolen und Mitosen sind regelmäßig anzutreffen.
- Das nanoplastische Karzinom zeigt sehr polymorphe, oft basophile Tumorzellen, die in Strängen oder soliden, komedoartigen Komplexen angeordnet sind (Einteilung nach Böcker et al., 2001).

Je größer das Karzinom, desto häufiger finden sich verschiedene histologische Muster nebeneinander (pluriformes Karzinom), die eine einheitliche, prognostisch orientierte Klassifizierung erschweren. Kleine Karzinome sind in der Regel uniform gebaut und hoch differenziert, große hingegen meist pluriform mit niedrig differenzierten Abschnitten (Böcker et al., 2001).

1.4. Der Krankheitsverlauf

Das Prostatakarzinom breitet sich im Allgemeinen zunächst im Organ selbst aus und infiltriert später die umliegenden Organe wie die Samenblasen, die Harnblase und das Rektum. Die Ausbreitung erfolgt oft entlang der Nerven in der Prostatakapsel (Böcker et al., 2001).

Als Indikator für eine positive oder negative Lymphknotenausbreitung werden die Lymphknoten in der Fossa obturatoria herangezogen, wobei nicht geklärt ist, ob diese die erste Station der Lymphknotenstreuung bilden. Die Fossa obturatoria ist der Raum zwischen Symphyse, Arteria und Vena iliaca externa, Arteria iliaca interna und dem Nervus obturatorius. Auch die präsaacralen und inguinalen Lymphknoten und die Lymphknoten entlang der Vasa iliaca communis und der paraaortalen Region sind häufig betroffen. Erst spät werden die mediastinalen und supraclaviculären Lymphknoten infiltriert (Schumacher et al., 2005).

Bevorzugter Ort der hämatogenen Streuung ist das Skelettsystem mit osteoblastischen Metastasen. Sie werden in 85% bei Patienten gefunden, die an ihrem Prostatakarzinom versterben. Am häufigsten sind die Lendenwirbelkörper, der proximale Femur, das Becken, die thorakalen Wirbelkörper, die Rippen, das Sternum, der Schädel und der Humerus betroffen. Zunächst zeigen die zentralen,

später die peripheren Skelettabschnitte Tumorabsiedlungen. Selten sind viszerale Organe betroffen, wie die Lunge, die Leber und die Nebenniere. Im Allgemeinen erfolgt zunächst die lymphogene und dann die hämatogene Aussaat (Hautmann & Huland, 2000).

1.5. Die TNM-Klassifikation

Obwohl das TNM-System der UICC seit 2002 geändert wurde, erfolgt die Stadieneinteilung für diese Arbeit noch nach dem System der UICC von 1997, da viele der Prostataresektionen und somit Probengewinnungen vor 2002 stattfanden. Die Abkürzungen stehen im Einzelnen für: T für den Primärtumor, N für die Lymphknoten und M für die Fernmetastasen. Während die Dokumentation der N- und M-Kategorie allgemeinen Richtlinien folgt, orientiert sich das Maß der Ausbreitung des Tumors zum Teil an der Art der Diagnosestellung (Tabelle 1).

Das Stadium T1 stellt eine Besonderheit dar, da der Tumor nicht palpiert werden kann. Hierbei handelt es sich um die Gruppe der so genannten inzidentiellen Karzinome. Ein Tumor des Stadiums T1a oder T1b wird zufällig bei der histologischen Aufarbeitung des Präparates nach transurethraler Resektion einer benignen Hyperplasie festgestellt, das Karzinom ist somit ein Zufallsbefund. Einteilungskriterium für die Zuordnung in Stadien T1a beziehungsweise T1b ist der Anteil des Tumorgewebes am gesamten Resektat. Diese Einteilung ist prognostisch von Bedeutung.

Tumoren im Stadium T1c werden bei Biopsie wegen erhöhter PSA-Werte bei palpatorisch unauffälliger Prostata festgestellt. Eingeführt wurde dieses Stadium wegen des zunehmenden Einsatzes des Tumormarkers PSA (Prostata-spezifisches Antigen), da bei Serumwerten über dem altersspezifischen Limit (im Mittel 4 ng/ml) generell die Sextantenbiopsie empfohlen wird. Die Bedeutung dieser Stadien zeigt sich auch daran, dass die Rate an noch heilbaren, organbegrenzten Karzinomen in dieser Gruppe größer ist (50%) als in der Gruppe der palpatorisch erkannten (35%) organbegrenzten Karzinome (Epstein et al., 1994). Palpable Prostatakarzinome sind definitionsgemäß mindestens T2-Karzinome (Hiddemann et al., 2004).

Tab.1: pTNM-Klassifikation (1997) der Prostatakarzinome.

Primärtumor	
pT1	weder tastbar noch sichtbar
	pT1a ≤ 5%
	pT1b >5%
	pT1c Nadelbiopsie
pT2	begrenzt auf Prostata
	T2a ein Lappen
	T2b beide Lappen
pT3	Kapseldurchbruch
	T3a unilateral, bilateral
	T3b Samenblase(n)
pT4	fixiert/andere Nachbarstrukturen als Samenblasen (Blasenhals/Sphincter externus/Rektum/Levator- muskel/fixiert an Beckenwand)
Lymphknotenmetastasen	
pN1	regionär
Fernmetastasen	
pM1a	nichtregionäre(r) Lymphknoten
pM1b	Knochen
pM1c	andere Lokalisation(en)

1.6. Das Gleason-Grading

Das Grading nach Gleason (1966) hat die verschiedenen Wachstumsmuster des Prostatakarzinoms zur Grundlage. Der Verlust der histologischen Architektur repräsentiert die zunehmende Entdifferenzierung des Karzinoms und damit den Malignitätsgrad. Da in Prostatakarzinomen häufig mehrere verschiedene Wachstumsmuster vorliegen, bezieht das Gradingssystem ein vorherrschendes primäres und ein weiteres sekundäres Muster ein (Abb. 3), wobei dem primären Muster ein Punkt zwischen 1-5 und dem sekundären Muster ein Punkt zwischen 1-5 gegeben wird. Aus den 5 primären und 5 sekundären Grundmustern wird über ein

Punktesystem 1+1 bzw. 5 + 5 der niedrigste und der höchste Malignitätsgrad abgeleitet (Helpap & Rübgen; 1998).

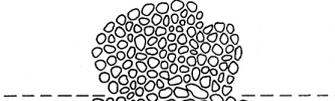
Muster	Drüsenform	Drüsengröße	Drüsenabstand	Herdgrenze	Stroma-invasion	
	1	Einzel, rund	Mittel	Dicht gepackt	Scharf	Minimal
	2	Einzel, gerundet, variabler als in Muster 1	Mittel	Bis zu 1 Drüsendurchmesser voneinander entfernt	Weniger scharf	Mild
	3	Einzel, unregelmäßig oder papilläres oder kribriformes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

Abb. 3: Histologische Kriterien des Gradings nach Gleason (1966, 1992) und ihre Definition (aus Helpap und Rübgen, 1998)

1.7. Der PSA-Wert

Unter den Tumormarkern des Prostatakarzinoms hat das PSA (Prostata-spezifisches Antigen) die größte klinische Bedeutung. Das PSA ist eine Glykoprotein-Serin-Protease mit einem Molekulargewicht von 30.000 Dalton. Es wird im Zytoplasma von epithelialen Zellen der Prostata innerhalb der endoplasmatischen Vesiculae und Vakuolen nachgewiesen (Helpap & Rübgen, 1998).

PSA wird in den Drüsenzellen der Prostata gebildet und dient der Verflüssigung des Samens, der ohne PSA koagulieren würde. Im Serum kann das PSA mit dem Radio- oder Enzymimmunoassay (ELISA) nachgewiesen werden und ist bei benigner Prostatahyperplasie (BPH) wie auch bei Vorliegen eines Karzinoms erhöht. Ein Karzinom erhöht den PSA-Wert um den Faktor 10 mehr als eine benigne Prostatahyperplasie entsprechender Größe (1g BPH erhöht den Serum-PSA-Wert um ca. 0,3 ng/ml; 1g Prostatakarzinom um ca. 3 ng/ml).

Die Serum-PSA-Bestimmung im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen in Deutschland ergibt folgende Prävalenzen: unabhängig vom rektalen Palpationsbefund haben 2% aller Männer über 50 Jahren eine deutliche PSA-Erhöhung über 10 ng/ml, 60% dieser Gruppe haben ein behandlungsbedürftiges Prostatakarzinom (Hartmann & Huland, 2000).

8% der Männer über 50 Jahren haben eine leichte PSA-Erhöhung mit Werten zwischen 4 und 10 ng/ml. Jeder vierte von diesen hat ein behandlungsbedürftiges Prostatakarzinom. Auf der anderen Seite haben 20% aller entdeckten Prostatakarzinome einen normalen PSA-Wert (Hartmann & Huland, 2000).

Insofern ist ein erhöhter PSA-Wert ein wichtiger Hinweis, dass ein Prostatakarzinom vorliegen kann. PSA-Werte >4 ng/ml erfordern unbedingt weitere Untersuchungen und als Erstes die Bestimmung zusätzlicher PSA-Parameter, um über die Wahrscheinlichkeit eines Prostatakarzinoms urteilen zu können. Die wichtigsten Faktoren hierbei sind der PSA-Quotient, also das Verhältnis von freiem PSA zu Gesamt-PSA und die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit. Bei einem PSA-Quotienten >0,15 bzw. 15% ist die Wahrscheinlichkeit eines Prostatakarzinoms erhöht und ist umso höher, je näher sich der PSA-Quotient dem Wert 0,1 bzw. 10% nähert (Franke et al., 2001). Carter et al. konnten 1992 signifikante Unterschiede hinsichtlich der PSA-Anstiegsrate (PSAV) zwischen BPH und Prostatakarzinom nachweisen. Bei einer Steigerung über 0,75 ng/ml/Jahr sollte ein Prostata-Karzinom vermutet werden. Voraussetzung dafür sind aber mindestens 3 aufeinander folgende PSA-Bestimmungen innerhalb von 2 Jahren mit mindestens sechsmonatigen Intervallen vom gleichen Labor. Die Formel hierfür lautet: $PSA = 1/2 * ((PSA2 - PSA1) / \text{Zeit in Jahren} + (PSA1 - PSA2) / \text{Zeit in Jahren})$. Obwohl ein konstanter Anstieg des Serum-PSA immer den Verdacht auf ein Prostata-Karzinom weckt, ist die PSA-Anstiegsrate als Parameter mit einem einheitlich definierten Grenzwert nicht etabliert (Djavan et al., 1999).

1.8. Der Transforming growth factor beta (TGF- β)

Es sind über 30 humane Zytokine der TGF- β -Superfamilie bekannt. TGF- β -Zytokine bestimmen das Zellschicksal durch vielfältige, teilweise sehr unterschiedliche Funktionen. Sie sind Regulatoren von Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Zelltod (Roberts & Sporn, 1993; Zhang et al., 2005).

Basierend auf Sequenzhomologien wird die TGF- β -Superfamilie in fünf Subfamilien gegliedert: Bone morphogenetic protein (BMP), Growth differentiation factor (GDF), Anti-Müllerian hormone (AMH), Aktivin, Nodal und TGF- β . Die TGF- β -Superfamilie inhibiert die Proliferation epithelialer Zellen, induziert die Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) und unterdrückt das Immunsystem. Die Angiogenese und die epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung werden ebenfalls beeinflusst. Fehlt TGF- β 1, kommt es zu Autoimmunkrankheiten, chronischen Entzündungen, der Disposition zu Parasitosen, neurodegenerativen Prozessen und Karzinogenesen (Böttlinger et al., 1997).

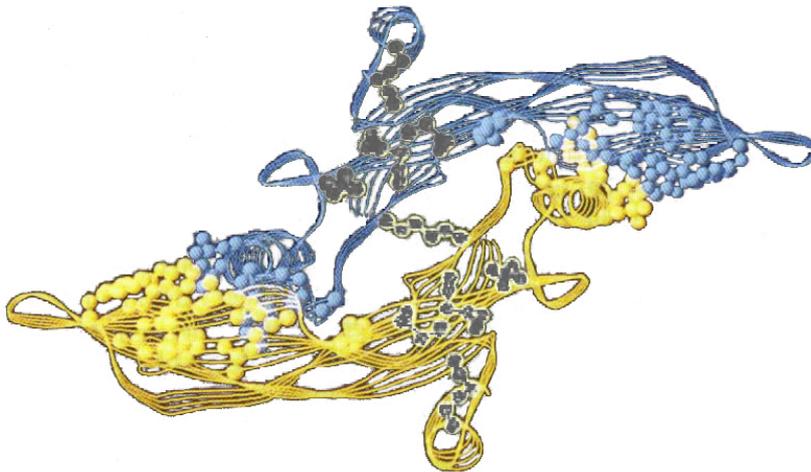


Abb. 4: Struktur des reifen TGF β -Dimers; ein auf Röntgenstrukturanalysen basierendes Bändermodell (aus Daopin et al., 1992).

Es gibt 3 Isoformen des Wachstumsfaktors TGF- β (β 1/ β 2/ β 3). Bei einer TGF- β 1-Inaktivierung bei Mäusen, wurde eine autoimmunähnliche Entzündung festgestellt (Shull et al., 1992; Kulkarni & Karlsson, 1993; Diebold et al., 1995). Wurde dagegen TGF- β 2 inaktiviert, stieg die perinatale Sterblichkeit und es häuften sich Entwicklungsstörungen (Sanford et al., 1997). Bei Inaktivierung des Wachstumsfaktors TGF- β 3 traten Gaumenspalten und Defekte der Lungenentwicklung auf (Kaartinen et al., 1995; Proetzel et al., 1995).

In der Prostata hemmt TGF- β 1 das Wachstum, fördert die Apoptose und die Differenzierung der Basalzellen zu Luminalzellen. Laut Elliott & Blobe (2005) erfolgt der wachstumshemmende Effekt erstens über eine Induktion der Expression von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (p15^{INK4b}, p21^{CIP/WAF1}) während des Zellzyklus, wodurch diese kein Retinoblastomprotein phosphorylieren können. Zweitens findet eine Wachstumshemmung über den Smad-Signalweg durch Inhibition von Smad4-Zellen statt. Drittens gelingt die Wachstumshemmung über den MAPK-Signalweg und die Inhibition der p70S6-Kinase via Protein Phosphatase 2A (PP2A).

Der Name der Smad-Proteine leitet sich von den sie kodierenden Genen ab, die in genetischen Studien an *Drosophila* und *C.elegans* erstmals identifiziert wurden. Das *Drosophila*-Gen wird als MAD (Mother against decapentaplegic), das Gen in *C.elegans* als Sma (Small body size) bezeichnet. Die Kombination dieser beiden Bezeichnungen führte zu dem Namen „Smad“. Strukturell und funktionell unterscheidet man drei Unterfamilien (Rezeptorregulierte Smads = Smad1-3,5,8, Co-Smads = Smad4 und inhibitorische Smads = Smad6,7), denen allen eine ähnliche, stark konservierte Grundsequenz zu Eigen ist (Massague & Chen, 2000). Die Smad-Proteine fungieren als Signaltransduktion und Smad2,3,4, außer einer Spleissvariante von Smad2, die die DNA-Bindung blockiert, binden direkt an die DNA und regulieren somit die Genexpression.

TGF- β 1 induziert unter anderem die Apoptose. Androgene können die TGF β 1-Synthese supprimieren. Das heißt, dass ohne Androgene vermehrt und vorzeitig Epithelzellen absterben. (Danielpour, 2005). Der Signalweg des Androgenrezeptors überschneidet sich mit dem TGF β -Signalweg an einigen Stellen. Der deutlichste Effekt wurde bei Androgenentfernung in der Rattenprostata gezeigt, was zu einem Anstieg von TGF β 1 mRNA und somit zu verstärktem Zelltod in diesem Gewebe führt (Kyprianou & Isaacs, 1988a). Die Aktivierung der TGF β -Signale durch Androgenentfernung führt schließlich auch zur gesteigerten Expression von TGF β 2 und TGF β 3 und der TGF- β -Rezeptoren, was wiederum eine Aktivierung von Smad2 und Smad3 zur Folge hat (Brodin et al., 1999). Dies zeigt die wichtige Rolle von TGF- β -Apoptose-Signalen im normalen Prostataepithel als Folge von Androgen-Entzug.

Andersherum konnte bei Mäuseversuchen mit Prostatagewebe mit einem dominant-negativen TGF β -Rezeptor RII (DN-RII) die maligne Transformation durch Verlust des Zelltodes und gesteigerte Proliferation des Prostataepithels getriggert werden (Kundu et al., 2000).

Die Rolle von TGF β in Stromazellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, könnte aber in der Beeinflussung der Epithel-Stroma-Interaktion liegen. T β RII wurde von Bhowmick et al. (2004) selektiv in Fibroblasten ausgeschaltet, was zu intraepithelialen Neoplasien in der Prostata führte. Anscheinend gibt es eine indirekte Negativ-Kontrolle des epithelialen Wachstums durch angrenzende Fibroblasten.

In einer anderen Studie mit der preneoplastischen Zelllinie NRP-152 konnte gezeigt werden, dass Androgene die Produktion von TGF- β 1/2/3 unter serumfreien Bedingungen unterdrücken können (Lucia et al., 1998).

1.9. Die hoch-affinen Rezeptoren T β RI, T β RII und T β RIII

Mit radioaktivem Iod markierte TGF- β -Moleküle lassen sich nach ihrer Bindung auf der Zelloberfläche quervernetzen. Auf diese Weise identifizierte man mindestens drei hochaffine Rezeptoren und bezeichnete sie als TGF- β -Rezeptoren des Typs I, II und III. Die Rezeptoren des Typs I und II sind Transmembranproteine mit intrinsischer Serin/Threonin-Kinase-Aktivität. Sie sind die Untereinheiten des eigentlichen TGF- β -Rezeptors. Der TGF- β -Rezeptor ist ein heterooligomerer Rezeptor, der aus den beiden Rezeptortypen I und II nach Bindung eines Liganden gebildet wird (Song et al., 2006). Die Wachstumsfaktoren TGF β 1 und TGF β 3 binden an den Rezeptortyp II. Bei dem TGF β -Rezeptor Typ III handelt es sich um Betaglycan, einem membranverankerten Proteoglycan, das TGF β 2 mit einer höheren Affinität bindet als TGF β 1 und TGF β 3. Die Bindung des Transforming growth factor β findet an zwei Stellen des Rezeptors statt. Zum einen am N-terminalen Ende, einer endoglinverwandten Region, und zum andere am C-terminalen Ende, einer uromodulinverwandten Region. Jedoch nur die Bindung an die endoglinverwandte Region steigert die Bindung von TGF β 2 an den Rezeptor Typ II, die sogenannte „TGF β -Präsentation“ des Rezeptors Typ III. Endoglin ist ebenfalls ein TGF β -Rezeptor Typ III. Er befindet sich jedoch ausschließlich auf Endothelzellen und bindet nur TGF β 1 und TGF β 3 (Esparza-Lopez et al., 2001).

1.10. Der TGF- β -Signalweg

Besonders TGF β 1 und TGF β 3 binden an den Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor des Typs II an der Oberfläche der Zellmembran, wohingegen TGF β 2 hauptsächlich erst an den Rezeptor Typ III (Co-Rezeptor) bindet. Diese hoch-affine Bindung an den Rezeptor Typ III steigert die Bindung von TGF β 2 an den Rezeptor Typ II. Bei der sequentiellen Ligandenbindung wird das TGF- β -Zytokin zunächst an den Typ II-Rezeptor (T β RII) gebunden, der dann den Typ I-Rezeptor (T β RI) rekrutiert und diesen an seiner Glycin-Serin-reichen Domäne transphosphoryliert. Es wurde jedoch auch eine Bindung an beide Rezeptoren gleichzeitig durch eine kooperative Ligandenbindung beschrieben (Böttinger et al., 1997).

In der Zelllinie L6 aus Myoblastenzellen von Ratten, in denen der TGF β -Rezeptor Typ III nicht vorhanden ist, gab es jedoch auch eine geringe Reaktion von T β RII mit TGF β 2. Dies zeigt, dass TGF β 2 auch niedrig-affin an T β RII binden kann (Rotzer et al., 2001).

Rotzer et al. (2001) erzeugten eine Spleissvariante T β RIIB indem sie ein zusätzliches Exon einklonierten, wodurch sich die Aminosäure V32 veränderte. Dieser Rezeptor Typ IIB reagierte direkt mit TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3, interagierte und aktivierte den Smad-Übertragungsweg in Anwesenheit aller TGF β -Rezeptoren, ohne den TGF β -Rezeptor Typ III (T β RIII) für die Reaktion zu benötigen.

Durch Bindung des extrazellulären Liganden TGF β 2 an den Rezeptor T β RII dimerisieren die Untereinheiten T β RI und T β RII. Anschließend werden durch T β RII die Serin- und Threonin-Reste von T β RI phosphoryliert, woraufhin die Kinaseaktivität der Typ I-Untereinheit aktiviert wird. Dieser aktivierte TGF β -Rezeptor Typ I phosphoryliert die rezeptorassoziierten Smad2 und Smad3 (R-Smads) (Song et al., 2006). Die phosphorylierten R-Smads (Smad2 und Smad3) binden an das nicht-phosphorylierte Co-Smad (Smad4) und translozieren in den Zellkern. Im Zellkern beeinflussen die Smad-Komplexe durch direkte DNA-Bindung und/oder durch Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen. Das inhibitorische Smad7 (I-Smad) hemmt die Phosphorylierung von R-Smads und die Interaktion der R-Smads mit den Co-Smads (Abb.5). Das inhibitorische Smad6 hemmt die Expression der BMPs. Die Expression der I-Smads wird durch TGF- β und durch BMP gesteigert, so dass sie als Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus verstanden werden (Shi & Massague, 2003).

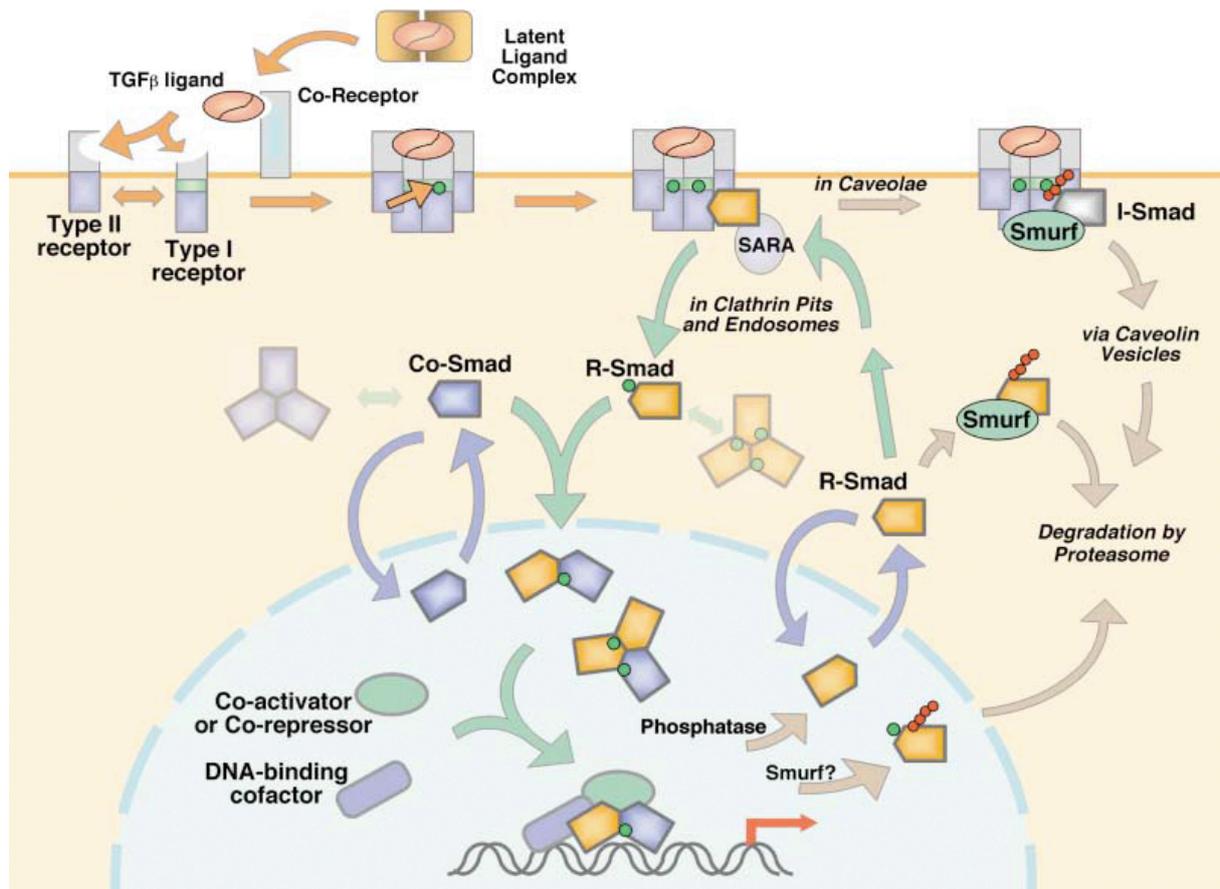


Abb. 5: Darstellung des TGFβ-Signalwegs. TGFβ bindet an den Rezeptor Typ II, dieser dimerisiert mit dem Rezeptor Typ I und aktiviert dadurch den Signalübertragungsweg mit Hilfe der Smads (aus Shi & Massague, 2003).

1.11. Die Rolle von TGF β beim Prostatakarzinom

Am Anfang der Tumorgenese ist TGF β 2 auch beim Prostatakarzinom noch wachstumsinhibierend. Diese Unterdrückung der Proliferation geschieht über einen autokrinen wachstumsunterdrückenden Signalweg. Doch während der Tumorentwicklung wird das Zytokin zu einem Tumorpromotor (Dallas et al., 2005).

Dallas et al. (2005) wiesen nach, dass PSA, das häufig klinisch zum Tumornachweis gemessen wird, den Wachstumsfaktor TGF β 2 aktivieren kann. Da der PSA-Wert bei Vorliegen eines Karzinoms ansteigt, steigt auch die Möglichkeit der TGF β 2-Aktivierung an. Perry et al. (1997a) wiesen in ihren Untersuchungen von Prostatakarzinompatienten einen TGF β 2-Konzentrationsanstieg im Plasma bei organbegrenzten Tumoren nach.

Während der Tumorentwicklung werden Prostatakarzinomzellen oft resistent gegenüber dem antiproliferativen Effekt von TGF β , während sie andere TGF β -Effekte, wie z.B. die TGF β -vermittelte Zellbeweglichkeit noch aufzeigen (Elliott & Blobe, 2005). Diese Resistenz geschieht meist ohne Mutation oder Ausschaltung von Mitgliedern des klassischen Smad-Signalwegs. Nach einer Theorie von Elliott & Blobe (2005) durchlaufen Zellen während der Karzinogenese eine Umwandlung von Epithelzellen zu Mesenchymalzellen. Während dieser Umwandlung, genannt „epithelial to mesenchymal transition“ (EMT), verändert sich auch die Rolle des TGF β . Anfangs fungiert TGF β als Tumorsuppressor, indem es die Proliferation inhibiert und die Differenzierung und Apoptose stimuliert. Während die Karzinomzellen resistent gegenüber den Tumorsuppressoreffekten von TGF β werden, jedoch sensibel gegenüber den Tumorpromotoreffekten von TGF β bleiben, schreitet die Karzinogenese voran. Zu diesen Promotoreffekten gehören gesteigerte Zellbeweglichkeit, Migration und Invasion. Diese von TGF β avancierten Eigenschaften entsprechen denen von mesenchymalen Zellen (\rightarrow EMT): reduzierter Zell-Zell-Kontakt, gesteigerte Motilität und Invasion in umliegendes Gewebe (Elliott & Blobe, 2005).

Indem TGF β zum Beispiel die Expression von E-Cadherinen herabsetzt, reguliert es negativ die adhäsiven Eigenschaften und erhöht die Motilität der Zellen.

Normalerweise stimuliert TGF β die Produktion der extrazellulären Matrixproteine, wie Kollagen und Fibronectin, und senkt die Produktion der Enzyme, die die extrazelluläre Matrix abbauen, wie Kollagenasen, Heparinasen und Stromelysin.

Außerdem steigert es die Produktion von Proteinen, die die abbauenden Enzyme inhibieren. Während der Karzinogenese erhöht TGF β die proteolytische Aktivität der Krebszellen durch eine Aktivierung der Synthese und Sekretion der matrixabbauenden Enzyme. Durch Senkung der Zelladhäsion, verstärkte Motilität und proteolytischen Aktivität, steigert TGF β die Anzahl der invasiven Krebszellen (Elliott & Blobe, 2005).

Wie schon unter 1.3. erwähnt, sind auch die vermehrte Angiogenese und die Umgehung der Immunabwehr Kennzeichen von Karzinomzellen. TGF β steigert beim Prostatakarzinom die Angiogenese, indem es die Expression von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren fördert. Die Umgehung der Immunabwehr erfolgt durch Immunsuppression. TGF β 1 blockiert die Produktion von Interleukin2 (IL-2) und inhibiert somit die IL-2-abhängige Proliferation von T-Zellen. Außerdem inhibiert es die Differenzierung von T-Zellen, besitzt einen potenten inhibierenden Effekt auf Antigen-präsentierende Zellen und inhibiert die Gewebeaktivierung der Makrophagen (Elliott & Blobe, 2005).

Das Prostatakarzinom zeigt vor allem eine verstärkte Resistenz gegenüber Apoptose (Denmeade & Isaacs, 2004). Da TGF β normalerweise den Zelltod im Prostataepithel induziert, muss von einer gestörten Funktion dieses Mechanismus ausgegangen werden.

Kim et al. (1996), Williams et al. (1996), Wikström et al. (1999) und Shariat et al. (2004a) haben alle eine geringere Anzahl an TGF β -Rezeptoren Typ I und Typ II bei größeren Prostatakarzinomen gemessen, so dass sie eine verringerte Expression dieses Rezeptors während der Karzinogenese vermuteten. Dies war begleitet von einer verstärkten Angiogenese und einer erhöhten Metastasierungsrate, die zu einer verminderten Überlebensrate führte (Wikström et al., 1998). Im Gegensatz dazu haben Royela et al. (1998) einen Anstieg der TGF β -Rezeptoren Typ I und Typ II in Adenokarzinomen gemessen und damit die Hypothese eines inkompletten Rezeptors als Grund für die „Nicht-Responsivität“ der Zellen auf die tumorsupprimierenden Effekte aufgestellt.

Neuere Daten weisen auf eine Inaktivierung der Rezeptoren Typ I und Typ II durch Methylierung hin. Zhang et al. (2005) untersuchten die Insensitivität von LNCaP-Zellen auf TGF β bei gleich bleibender Expression der Rezeptoren Typ I und Typ II. Da die Rezeptoren in ihrer 5'-Region keine TATA- bzw. CAAT-Box besitzen, sind Bindungsmöglichkeiten von SP-1, Aktivator-Protein AP-1 und AP-2 in dieser Region

für die Signalübertragung wichtig. Methylierungen in dieser Region setzen das Transkriptionspotential erheblich runter. LNCaP-Zellen weisen bei beiden Rezeptoren an einigen dieser Stellen Methylierungen auf (Zhang et al., 2005).

Außerdem wird der Apoptose-induzierte Effekt im Prostatakarzinom auch durch eine Aktivierung des Rezeptors von Insulin-like growth factor-I (IGF-I) blockiert. IGF-I fördert das Wachstum und Überleben von Epithelzellen und fungiert somit als Apoptosesuppressor. Eine Deregulierung der IGF-I-Balance steht im Zusammenhang mit der Kontrolle der Karzinogenese. Einige Studien haben gezeigt, dass ein hoher Serum-IGF-I-Wert mit einem Prostatakarzinom in Zusammenhang stehen kann. IGF-I aktiviert über die PI3-Kinase Aktinin (Proteinkinase B). Dieser aktininabhängige Mechanismus, der durch Rapamycin wieder aufgehoben werden kann, unterdrückt die Smad3-Aktivierung durch TGF β -Rezeptoren, wodurch die TGF β -induzierte Apoptose blockiert wird (Danielpour, 2005).

Wie schon in Kapitel 1.8. beschrieben, ist die Rolle von TGF β in Stromazellen noch nicht vollständig aufgeklärt, könnte aber in der Beeinflussung der Epithel-Stroma-Interaktion liegen. Bhowmick et al. (2004) schalteten selektiv den TGF β -Rezeptor Typ II in Fibroblasten aus und beobachteten daraufhin intraepitheliale Neoplasien in der Prostata. Anscheinend gibt es eine indirekte Negativ-Kontrolle des epithelialen Wachstums durch angrenzende Fibroblasten. TGF β könnte diesen Einfluss auf Stromazellen über die Unterdrückung Androgen-induzierter Wachstumsfaktoren am Androgenrezeptor der Fibroblasten ausüben. Welches TGF β dies verursacht, ist bisher nicht geklärt (Danielpour, 2005).

2. Ziel und Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten als eine wichtige mögliche Einflussgröße auf die TGF β 2-Wirkung im Prostatagewebe die Stärke der TGF β -Rezeptor-Typ II-Expression im Prostatakarzinomgewebe und die Serumkonzentration von TGF β 2 vor radikalen Prostatakarzinomoperationen bestimmt werden. Hierzu wurde jeweils ein Kollektiv von Prostatakarzinompatienten untersucht.

Durch Aktivierung des Smad-Signalwegs supprimiert TGF β 2 die Proliferation zu Beginn der Tumorentstehung, unterstützt aber bei weiter fortgeschrittenen Tumorstadien zum Beispiel die Metastasierung und Immunsuppression. Da an diesem TGF β 2-Signalweg immer der TGF β -Rezeptor Typ II beteiligt ist, liegt es nahe, dass man hier die veränderte Signalübertragung vermuten kann.

In dieser Studie unterteilen wir die Prostatakarzinomschnitte nach verschiedenen Tumorparametern wie Tumorgröße, Aggressivität und Metastasierung und weisen den TGF β -Rezeptor Typ II immunhistochemisch nach. Mit dieser Anfärbung soll die Stärke der Expression dieses Rezeptors in Abhängigkeit von den oben aufgeführten Tumorparametern gemessen werden. So kann untersucht werden, ob die veränderte Responsivität der Karzinomzellen mit einer verminderten Expression des TGF β -Rezeptors Typ II zusammenhängt oder andere Ursachen hat.

Mittels eines ELISAs soll die Serumkonzentration von TGF β 2 in Abhängigkeit von verschiedenen Tumorparametern wie Tumorgröße, Aggressivität und Metastasierung gemessen werden. Damit sollte untersucht werden, ob sich die TGF β 2-Serumkonzentration bei diesen Tumorparametern verändert. Ferner sollte analysiert werden, wie exakt die Messergebnisse des TGF β 2-ELISAs ausfallen.

Ziel der Arbeit ist es, herauszufinden, ob zwischen der Serumkonzentration von TGF β 2 und der Tumorausbreitung eine ausreichend enge Korrelation besteht, welche den Einsatz der TGF β 2-Bestimmung als Tumormarker bei der Verlaufsbeurteilung des Prostatakarzinoms aussichtsreich erscheinen lässt.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. Die immunhistochemische Färbung des TGF β -Rezeptors Typ II

3.1.1. Auswahl des Kollektivs

Es wurden alle in der Zeit von 1989 bis 2000 in der Universitätsklinik Marburg operierten und therapierten Prostatakarzinompatienten in diese Studie einbezogen. Davon waren 58 Patienten ausreichend dokumentiert und ihre Gewebeproben archiviert. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Prostatakarzinompatienten mindestens 5 Jahre oder länger nach der Operation tumorfrei waren. Andere Allgemeinerkrankungen der Patienten wurden erfasst, aber nur Patienten mit einer weiteren Tumorerkrankung von der Analyse ausgeschlossen. Die Paraffineinbettung der resizierten Gewebeproben erfolgte direkt nach der Operation in der pathologischen Abteilung. Hier wurde das eingebettete Gewebe pathologisch untersucht und der Tumor klassifiziert, so dass die Tumorparameter für diese Studie bereits vorhanden waren. Auch einige HE-Schnitte waren bereits vorhanden. Anhand der HE-Schnitte wurde durch Frau Dr. Roeßler, Pathologie Marburg, das Karzinomareal markiert, das in dieser Studie immunhistologisch angefärbt werden sollte. Genaue Beschreibungen der Tumorparameter sind im Ergebnisteil zu finden.

3.1.2. Anfertigung der Paraffinschnitte

Mit dem Rotationsmikrotom (Leitz, Wetzlar) wurden ca. 5 μ m dicke Schnitte angefertigt. Dabei wurden Wechselklingen der Firma Reichert-Jung verwendet. Die Schnitte wurden mit einem feinen Pinsel vom Messerrücken aufgenommen und in einem Wasserbad bei Raumtemperatur zum Strecken aufgefangen.

Danach wurden die Schnitte auf einen Objektträger gezogen und in ein Wasserbad mit 40-45°C (Tissue Flotation Bath medite) überführt. Nachdem sich die Schnitte gestreckt hatten, erfolgte das Aufziehen auf die beschichteten SuperFrost-Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig). Die Objektträgerbeschichtung verbessert die Haftung der Gewebeschnitte.

Anschließend wurden die Präparate über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank, mit Alufolie abgedeckt, getrocknet.

Es wurden pro Patient 6 Paraffinschnitte angefertigt (2 Verdünnungen und 1 Negativkontrolle; 3 Schnitte als Reserve). Falls noch keine HE-Färbung des Paraffinblocks erfolgt war, wurde auch dafür ein Schnitt angefertigt, der aber nicht auf Superfrost-Objektträger aufgezogen wurde, sondern auf Objektträger der Firma Menzel (geputzt, gebrauchsfertig).

3.1.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der am Paraffinblock angeschnittenen Ebene, zur Kontrolle der Gewebserhaltung und zur histologischen Beurteilung des Karzinomareals wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) an Probeschnitten vorgenommen.

Nach Entparaffinierung der Präparate (vgl. 3.1.5.) wurden die Schnitte für eine Minute in gefiltertes Mayers saures Hämalan getaucht und anschließend 30 Minuten lang in Leitungswasser gespült, das nach jeder Spülung gewechselt wurde. Danach wurden die Präparate für eine Minute in destilliertem Wasser gespült und für drei Minuten in ein Eosin Y-Phloxin Standardgemisch nach Romeis (1989) gestellt. Nach Entwässerung und Entalkoholisierung erfolgte das Eindecken der Präparate mit Entellan (vgl. 3.1.9.).

Mayers saures Hämalan nach Romeis (1989):

- 1 g Hämatoxylin
 - 0,2 g Natriumjodat
 - 50 g Kalialan (Kaliumsulfat)
 - 50 g Chloralhydrat
 - 1 g Citrat
- ad 1000 ml Aqua dest.

Eosin y-Phloxin Standardgemisch:

- 100 ml 1% Eosin Y
- 10 ml 1% Phloxin B
- 780 ml 96% Ethanol
- 4 ml Eisessig

3.1.4. Immunhistochemische Detektion mit der Polymerkonjugat-Methode

Diese Technologie basiert auf dem Einsatz eines sowohl enzym- als auch antikörpermarkierten Polymerkonjugats, dessen „Rückrat“ aus einem inerten Dextranmolekül (Polysaccharid) besteht. Neben durchschnittlich 70 Enzymmolekülen können daran 10 Antikörpermoleküle gebunden werden.

Beim Envision™-System (Dako, Hamburg) ist der Sekundärantikörper an das Dextran-Trägermolekül konjugiert, so dass die Färbung prinzipiell aus 2 Schritten besteht.

Neben seiner schnellen und einfachen Anwendung und hohen Sensitivität besteht ein weiterer Vorteil des Envision™-Systems darin, dass es nicht auf der Wechselwirkung zwischen (Strept)Avidin und Biotin basiert, so dass unspezifische Färbungen als Folge endogenen Biotins ausgeschlossen sind (Noll et al., 2000).

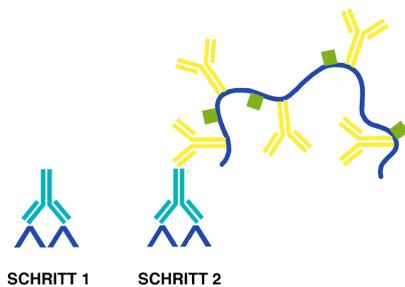


Abb.6: Bei der 2-Schritt EnVision™-Methode folgt dem Primärantikörper ein Dextranpolymer, das durchschnittlich 10 Moleküle Sekundärantikörper und 70 Enzymmoleküle aufweist (aus Boenisch, 2003).

3.1.5. Vorbereitung der Präparate

Vor Beginn der Immunfärbung muss der Paraffinschnitt vollständig entparaffiniert und rehydriert werden. Eine unvollständige Entfernung des Einbettmediums ist unbedingt zu vermeiden, da dies zu unspezifischen Hintergrundfärbungen führt. Alle Xylol und Alkoholbäder wurden regelmäßig gewechselt, da sich ansonsten die Lösungen mit Paraffin sättigen und die entparaffinierende Wirkung verloren geht.

Die Entparaffinierung erfolgte in 2 Xylol-Bädern (Merck, Darmstadt) für jeweils 10 Minuten und die anschließende Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe.

Dazu wurden die Präparate 2 mal 5 Minuten in 100% Ethanol (Fischer, Saarbrücken) und anschließend jeweils 3 Minuten in 96%, 70% und 50% Ethanol gespült. Zuletzt wurden die Schnitte durch jeweils 5-minütiges Spülen in Aqua dest. und 1xPBS (Roche, Mannheim) entalkoholisiert.

Anschließend wurden sie zur Unterdrückung endogener Peroxidaseaktivität (z.B. in Erythrozyten oder Leukozyten) und damit zur Vermeidung falsch positiver Befunde 15-20 Minuten in eine 3%ige Wasserstoffperoxidlösung (30%ige Lösung; Merck, Darmstadt) in PBS gebracht. Nach dreimaliger Spülung der Präparate in PBS-Puffer 1:10 für jeweils 5 Minuten schloss sich die Antikörperdemaskierung an.

3.1.6. Antikörperdemaskierung

Verantwortlich für die Veränderung vieler Epitop-Strukturen ist die formalininduzierte Bildung chemischer Quervernetzungen, sowohl innerhalb desselben Proteins (intramolekulare Quervernetzungen) als auch zwischen verschiedenen Proteinen (intermolekulare Quervernetzungen). Das Ergebnis kann ein partieller oder vollständiger Verlust der Immunreaktivität sein.

Daher wurden die Objektträger nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte in einem wässrigen Medium (Retrieval-Lösung) Hitze ausgesetzt. In diesem Fall handelte es sich bei dem wässrigen Medium um die „Target Retrieval Solution“ (DAKO; 1:1 verdünnt mit aqua dest.; pH 6,1).

Die Target Solution wurde auf 94°C im Dampfgarer (Multi-Gourmet, Braun, Kronberg) erhitzt und die Gewebeschnitte wurden dieser Hitze 30 Minuten ausgesetzt. Die Abkühlung erfolgte langsam für weitere 20 Minuten. Anschließend wurden alle Schnitte 3 mal 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen.

Zur Verringerung der Hintergrundfärbung durch elektrostatische Wechselwirkungen wurden alle Schnitte 20 Minuten in frisch angesetzter 2%iger Magermilch gelegt (2g „Skim Milk Powder“ von Fluka Biochemika auf 100 ml PBS 1:10). Danach dürfen die Schnitte nicht austrocknen und nicht gewaschen werden, da sonst der Schritt wiederholt werden muss.

3.1.7. Bestimmung des Antikörpertiters

In der Immunhistochemie wird der optimale Antikörpertiter als die höchste Verdünnung eines Antikörpers definiert, mit der unter spezifischen Testbedingungen eine maximale Anfärbung bei geringstem Hintergrund erzielt wird.

Zur Austestung der optimalen Antikörperkonzentration wurden zunächst Verdünnungsreihen des Primärantikörpers (1:50 bis 1:500), des Sekundärantikörpers (1:100 bis 1:1000) und unterschiedliche DAB⁺-Einwirkzeiten getestet. Es zeigte sich, dass das beste Färbeergebnis bei einer Konzentration des Primärantikörpers von 1:100, einer Konzentration des Sekundärantikörpers von 1:500 (geringste Hintergrundfärbung) und einer DAB⁺-Einwirkzeit von 15 Minuten zu erzielen war. Beide Antikörper wurden mit „Antibody Diluent with Background Reducing Components“ (Dako, Hamburg) verdünnt, da TBS als Verdünnungsmedium einen zu starken unspezifischen Hintergrund ergibt.

3.1.8. Immunreaktion

Da das Eintrocknen von Reagenz auf den Gewebeproben eine wichtige Ursache für Hintergrundfärbung darstellt, wurden die Objektträger während den folgenden Inkubationen in eine mit befeuchtetem Filterpapier ausgelegte Inkubationskammer, in der die Objektträger auf Stegen ruhen, gelegt. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass die Inkubationsmedien den Schnitt jeweils vollständig bedeckten (ca. 80 µl Lösung pro Schnitt).

Nach der Vorbereitung der Schnitte wurde das Gewebe für 30 Minuten mit dem Primärantikörper Anti-human TGF-β RII von R&D Systems bedeckt. Jeweils eine Probe mit der Verdünnung 1:100 und eine Probe mit der Verdünnung 1:200. Die Negativkontrolle wurde mit reinem „Antibody Diluent“ bedeckt, zur Verhinderung der Austrocknung. Der Primärantikörper wurde lyophilisiert geliefert und musste in 1 ml sterilem PBS aufgelöst werden, um eine Konzentration von 250 µg/ml zu erreichen, d.h., dass die Verdünnung 1:100 einer Antikörperkonzentration von 2,5 µg/ml entspricht.

Nach der 30minütigen Inkubation wurden die Schnitte dreimal jeweils fünf Minuten in 1xTBS gewaschen.

10xTBS:

- 53 g NaCl (Sigma, München)
- 12 g Tris ultrapure (AppliChem, Darmstadt)
- ad 1000 ml aqua dest.

auf pH 7,4 einstellen und zum Gebrauch 1:10 verdünnen

Der Sekundärantikörper Rabbit Anti-Goat Immunglobulins (IgG Z0228, Dako, Hamburg) mit der Verdünnung 1:500 musste ebenfalls 30 Minuten auf allen Schnitten, einschließlich der Negativkontrolle, in der feuchten Kammer inkubieren und anschließend drei mal jeweils fünf Minuten mit 1xTBS heruntergewaschen werden.

Danach folgte für 30 Minuten auf allen Schnitten das „Envision Labelled Polymer“ (Anti-Rabbit, Dako, Hamburg) mit anschließendem dreimal fünfminütigen Waschen in 1xTBS.

Die farbliche Darstellung erfolgte mit dem hoch sensitiven Substrat-chromogen-System DAB (Liquid DAB⁺, DAKO, Hamburg). Das Chromogen-3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid wird zu einem braunen, wasserunlöslichen Farbstoff oxidiert und führt somit zur Darstellung des vom ersten Antikörper erkannten Antigens.

Direkt vor dem Auftragen auf die Schnitte wurden 20 µl DAB mit 1 ml DAB-Puffer gemischt und auf alle Schnitte aufgetragen. Dies inkubierte in der feuchten Kammer im Dunkeln für 15 Minuten. Mit Aqua dest. wurde die Reaktion gestoppt.

Die Gegenfärbung erfolgte für ein bis zwei Minuten mit Hämalaun, das anschließend in Leitungswasser gebläut wurde (Hämalaun s. 3.1.3).

3.1.9. Eindecken der gefärbten Präparate

Die Präparate wurden im Anschluss an die Färbungen zunächst durch 70% und 96% Ethanol gezogen und danach zweimal fünf Minuten in 100% Ethanol entwässert. Durch dreimaliges Spülen für jeweils fünf Minuten in Xylol (Merck, Darmstadt) wurden sie dann entalkoholisiert und geklärt. Anschließend wurde zum Eindecken der Präparate ein Tropfen Entellan (Microscopy Entellan neu, Merck, Darmstadt) vorsichtig auf ein Deckgläschen gegeben und dieses unter Ausschluss von Luftblasen behutsam dem Objekt aufgelegt.

Zur Untersuchung und Fotodokumentation der Präparate wurde das Lichtmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen) mit angeschlossener Digitalkamera (Zeiss) benutzt. Die Bilder wurden mit dem Programm AxioVision (Zeiss) gespeichert und von der Firma Kodak entwickelt.

3.1.10. Auswertung

Bei der Betrachtung unter dem Lichtmikroskop wurde die Intensität der Färbung beurteilt. Es gab vier Kategorien: -= gar nicht angefärbt, += leicht, kaum erkennbar angefärbt, ++= angefärbt, +++= stark angefärbt.

Für die statistische Auswertung wurden diese vier Kategorien aufgrund der geringen Fallzahl und der ungleichmäßigen Verteilung in zwei Kategorien zusammengefasst. Dabei beinhaltet „wenig angefärbt“ die Kategorien - und + und die Kategorie „viel angefärbt“ beinhaltet die Kategorien ++ und +++.

Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe des Fisher`s exact test mit dem Programm InStat von Graph pad Software inc. (Version 3.0) ausgewertet. Der Fisher`s exact test ist ein Signifikanztest, welcher auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Er wurde in dieser Studie angewendet, da ein oder mehrere Häufigkeiten unter fünf lagen. Als statistisch signifikant gilt ein Wert von $p < 0,05$.

3.2. ELISA zur Bestimmung der TGF β 2-Serumkonzentration

3.2.1. Auswahl des Patientenkollektivs und Vorbehandlung der Proben

Die Patienten wurden von 2002 bis 2003 in der Universitätsklinik Marburg operiert und therapiert. 76 der Patienten wurden in der Klinik weiterbehandelt, beobachtet und dokumentiert, so dass sie für diese Studie in Frage kamen. Ausschlusskriterien waren eine weitere Tumorerkrankung und eine vorherige Anti-Androgen-Behandlung und/oder Bestrahlung beziehungsweise Brachytherapie der Prostata. Das pathologische Ergebnis der resizierten Gewebeproben wurde nach der Operation bestimmt.

Alle ausgewählten Prostatakarzinompatienten bekamen präoperativ Blut abgenommen. Das Blut wurde 30 Minuten stehengelassen und anschließend bei 1000xg 10 Minuten lang zentrifugiert, um das Blutserum zu gewinnen. Die Proben wurden aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2. Versuchsdurchführung

Der Immunoassay wurde zur quantitativen Bestimmung der TGFβ₂-Serumkonzentration durchgeführt. Grundlage des Verfahrens ist auch hier die Antigen-Antikörper-Reaktion, das heißt die spezifische Bindung des zu bestimmenden Moleküls durch den Antikörper.

Bevor der Elisa-Test (R&D Systems, Wiesbaden) durchgeführt wird, muss jede Serum-Probe vorbereitet werden. Dafür werden zu 125 µl Probe 25 µl 1N Salzsäure gegeben (Merck, Darmstadt; 1N HCL bekommt man durch Mischen von 91,67 ml dest. Wasser mit 8,33 ml 12N HCL). Die Lösung muss 10 Minuten inkubieren, bevor 25 µl 1,2N NaOH/ 0,5M HEPES hinzugefügt werden [zu 75 ml Aqua dest. werden langsam 12 ml 10N Natronlauge (Riedel-de Haen, Seelze) gegeben; dieses gut vermischt und anschließend mit 11,9 g Hepes (Sigma, München) gemischt und auf 100 ml mit dest. Wasser aufgefüllt]. Nach Zugabe von 800 µl „Calibrator Diluent RD5I“ sind die Proben für die Versuchsdurchführung vorbereitet und müssen innerhalb von zwei Stunden verarbeitet werden. Die Standardlösungen werden nicht aktiviert.

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 µl „Assay Diluent RD1-17“ pipettiert. Anschließend wurden in die Vertiefungen 100 µl der Proben bzw. der Standardlösungen gegeben, die Mikrotiterplatte mit einem im Kit beiliegenden Klebestreifen verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Da an der Wand der Mikrotiterplatte Antikörper gebunden sind, wird der in der Serumprobe enthaltene Ligand TGFβ₂ an diese gebunden. Nach Aspiration der Proben wurden alle Vertiefungen mit jeweils 400 µl Waschpuffer mit einer Multikanalpipette dreimal gewaschen. Alle Vertiefungen müssen vollständig befreit vom Waschpuffer sein. Dafür können die Waschpufferreste aspiriert oder ausgeschüttet und danach die Mikrotiterplatte auf sauberen Papierhandtüchern trockengeklopft werden.

Nun wurden in die Vertiefungen jeweils 200 µl des TGFβ2-Konjugates pipettiert, die Platte wieder mit einem Klebestreifen verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das TGFβ2-Konjugat enthält einen weiteren polyklonalen Antikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist und sich an den Liganden TGFβ2 bindet. Danach wird der Aspirations- und Waschgang wiederholt.

In die Vertiefungen wurden jeweils 200 µl Substrat-Lösung (Mischung aus den im Kit enthaltenen Lösungen Colour A und Colour B) pipettiert. Diese Substrat-Lösung enthält ein Chromogen für das Enzym, so dass eine Indikator-Reaktion ausgelöst wird. Während der 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur muss die Mikrotiterplatte vor Licht geschützt werden (z.B. im Schrank oder in der Schublade lagern).

Mit der Zugabe der 50 µl Stop-Lösung wurde diese Indikator-Reaktion gestoppt. Die Schwefelsäure (Stop-Lösung) bewirkt abhängig von der TGFβ2-Konzentration im Serum einen unterschiedlich starken Farbumschwung zu gelb. Bei 450 nm kann innerhalb der nächsten 30 Minuten die Farbintensität und somit die TGFβ2-Konzentration gemessen werden (Elisa-Reader, BioRad, München). Die quantitative Auswertung wird durch parallel laufende Eichungen mit den Standards möglich.

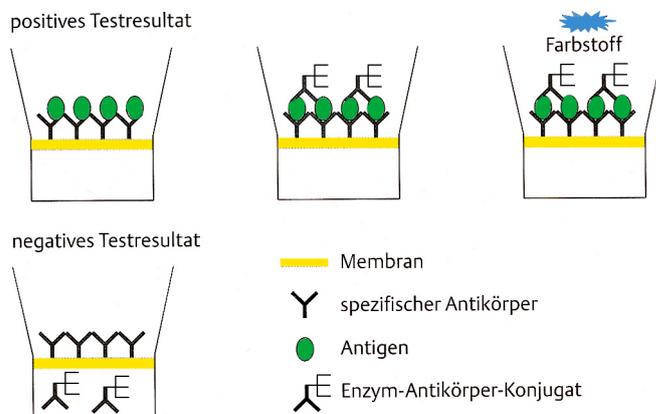


Abb. 7: Darstellung eines Immunoassays. Die spezifischen Antikörper sind an der Membran gebunden. Die Probe wird zugegeben, spezifische Antigene binden an den Antikörper. Nach Zugabe eines weiteren spezifischen Antikörpers, der mit einem Enzym konjugiert wurde, kann das System mit einem Substrat „entwickelt“ werden, das nach enzymatischer Spaltung einen charakteristischen Farbstoff freisetzt (aus Müller, 2001).

3.2.3. Auswertung

Die Aufzeichnung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel für Windows. Für den Vergleich der TGF β 2-Serumkonzentration bei zwei unterschiedlichen Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, ein nichtparametrischer Rangtest für unabhängige Stichproben. Als Signifikanzniveau ist $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Der Wachstumsfaktor TGF- β gehört zur großen Familie der Zytokine, bestehend aus über 30 Proteinen, die eine Vielfalt biologischer Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Zelltod steuern (Roberts & Sporn, 1993).

Während der Tumorentwicklung des Prostatakarzinoms werden die Karzinomzellen resistent gegenüber dem antiproliferativen Effekt von TGF β , während sie andere TGF β -Effekte, wie z.B. erhöhte Motilität, Invasion in umgebendes Gewebe und Immunsuppression, noch aufzeigen (Elliott & Blobe, 2005). Noch nicht ganz geklärt ist, wie diese „nicht-Responsivität“ zustande kommt. Der TGF β -Rezeptor Typ II, der den Rezeptor Typ I phosphoryliert und damit den Smad-Signalweg aktiviert, könnte entweder weniger gebildet werden oder in der gleichen Menge, jedoch mutiert exprimiert werden. Die immunhistochemischen Untersuchungen zur Expression des TGF β -Rezeptors Typ II ergaben bei Wikström et al. (1998) divergierende Ergebnisse zu den Untersuchungen von Royela et al. (1998). Daher sollte dies an einem eigenen Kollektiv überprüft werden. Auch die TGF β 2-Konzentration im Serum in Abhängigkeit von verschiedenen Tumorparametern sollte in diese Studie untersucht werden. Perry et al. (1997a) untersuchten in ihrer Studie 74 Patienten und stellten eine Konzentrationserhöhung bei Prostatakarzinompatienten fest. Dies sollte in dieser Studie anhand eines weiteren Kollektivs überprüft werden.

Durch die Intensität der immunohistochemischen Anfärbung kann auf eine erhöhte bzw. erniedrigte Expression des Rezeptors geschlossen werden. Mit Hilfe der ELISAs wurde die Serumkonzentration des Liganden TGF β 2 gemessen.

Untersucht wurde die Expression des Rezeptors T β RII in Abhängigkeit von der Tumorgröße, Tumoraggressivität und Tumorausbreitung bei 58 Patienten.

Von den 58 Patienten hatten 9 Patienten die Tumorklassifikation pT2a/b, 45 Patienten pT3a/b und 4 Patienten pT4 (Abb. 8).

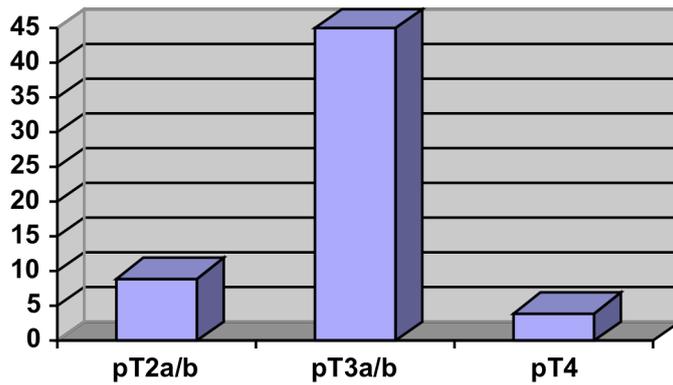


Abb. 8: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit von der Tumorausbreitung

Die Untersuchung der Patienten ergab weiterhin, dass bei 19 der 58 Patienten noduläre Metastasen vorhanden waren (Abb. 9).

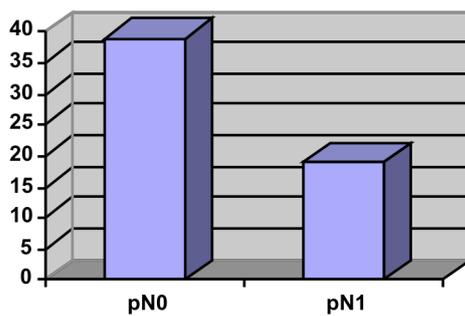


Abb. 9: Anzahl der Patienten ohne (N0) und mit Lymphknotenbefall (N1)

23 Patienten hatten einen Gleasonwert kleiner/gleich 6 und 35 Patienten einen Gleasonwert größer/gleich 7 (Abb. 10).

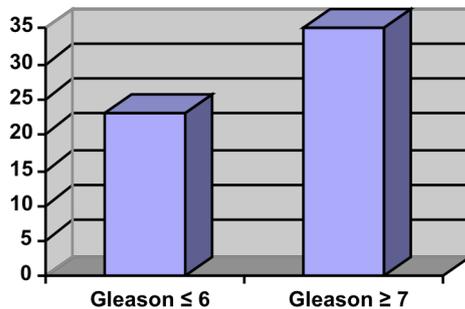


Abb. 10: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit vom Gleason-Grading

Bei 27 Patienten war außerdem die urethrale Resektionskante tumurös verändert (URK +), bei 31 Patienten hingegen war das pathologische Untersuchungsergebnis der urethralen Resektionskante negativ (URK -) (Abb. 11).

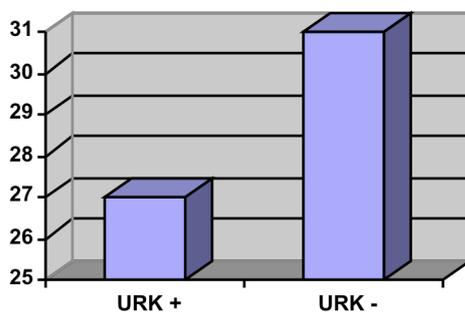


Abb. 11: Anzahl der Patienten ohne (URK-) und mit Befall (URK+) der urethralen Resektionskante

Untersucht wurde die Korrelation zwischen der Intensität der Färbung (unterteilt in wenig und viel) und den verschiedenen, in den Tabellen unter 8.2. aufgeführten Charakteristika. Bei der in dieser Studie durchgeführten immunhistochemischen Färbung ließ sich der TGF β -Rezeptor Typ II vor allem im Epithel des Prostatakarzinomgewebes anfärben. Das Stroma färbte sich, wie man den Abbildungen 12 bis 17 entnehmen kann, nur leicht an. Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe des Fisher's exact test ausgewertet.

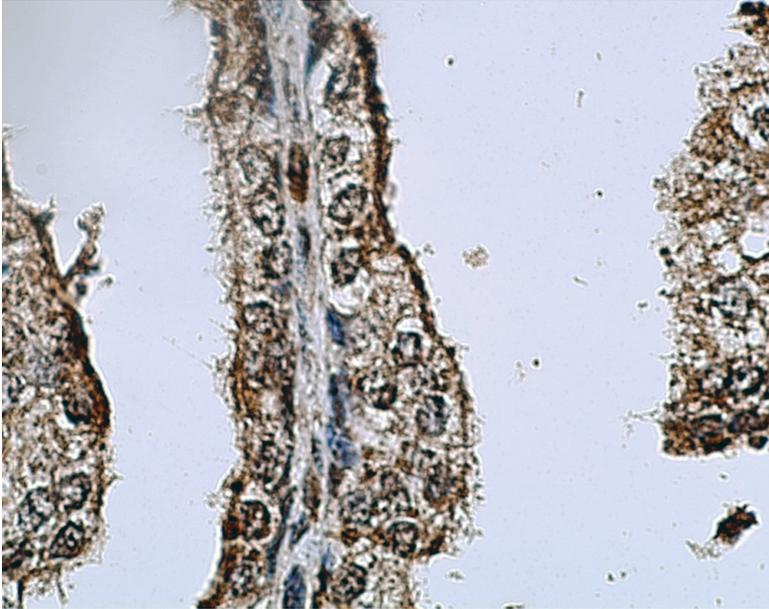


Abb. 12: pT3a, pN0, GI \leq 6, URK-; die pathologische Untersuchung ergab keine noduläre Metastasierung oder Infiltration der urethralen Resektionskante, der Gleasonwert war kleiner als 7, die Färbung war „wenig“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Primärvergrößerung x200.

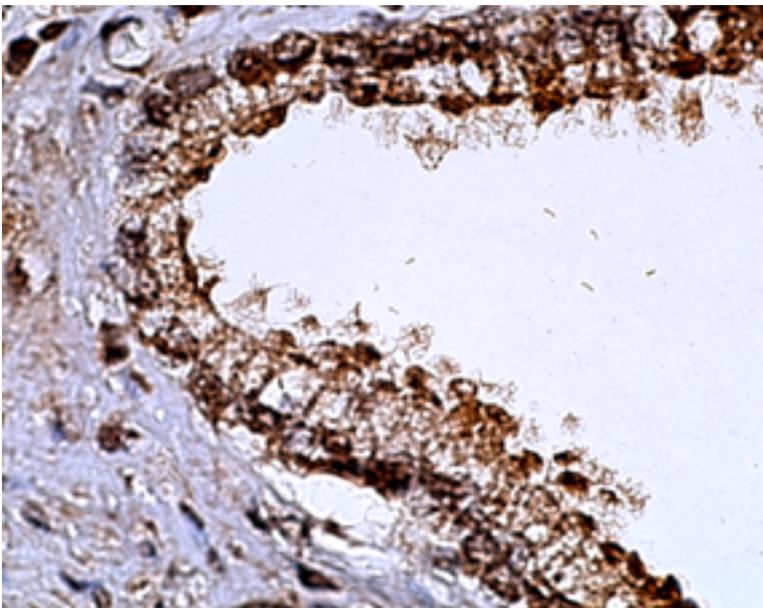


Abb. 13: pT3a, pN0, GI \leq 6, URK +; die pathologische Untersuchung ergab eine Tumorgöße von pT3a, die Färbung war „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Primärvergrößerung x200.

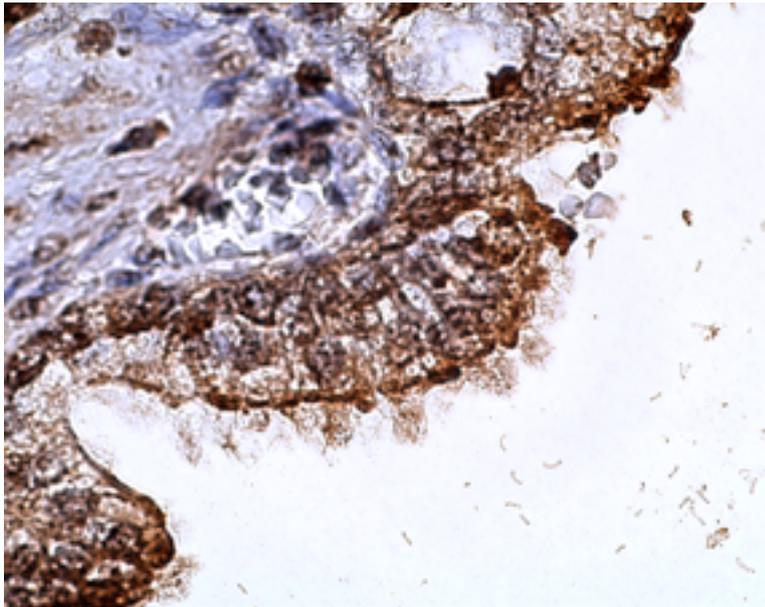


Abb. 14: pT3a, pN0, GI \leq 6, URK +; die pathologische Untersuchung ergab eine TumorgroÙe von pT3a, die Färbung war „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Primärvergrößerung x200.

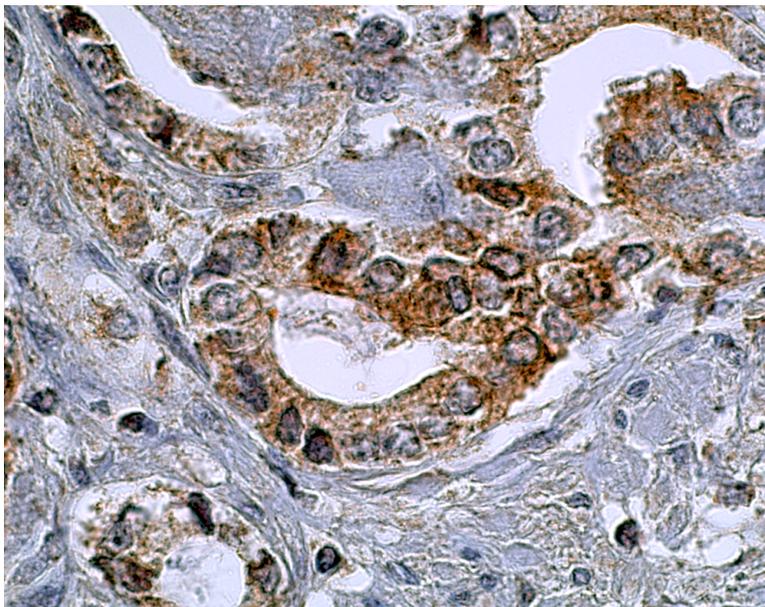


Abb. 15: pT2b, pN0, GI \leq 6, URK +; die pathologische Untersuchung ergab eine Infiltration der urethralen Resektionskante, die Färbung war „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Primärvergrößerung x200.

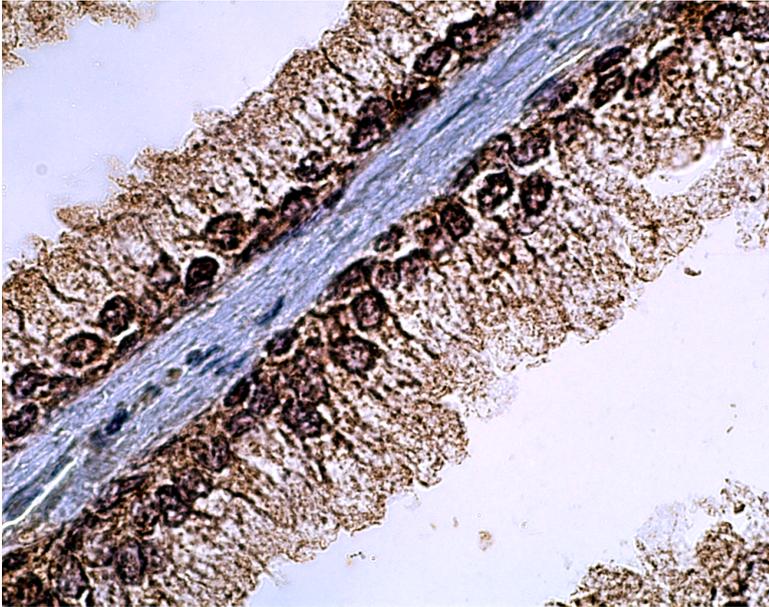


Abb. 16: pT2b, pN0, GI \leq 6, URK -; die pathologische Untersuchung ergab eine kleine TumorgroÙe von pT2b, einen Gleasonwert unter 7 und keine Metastasierung oder Organüberschreitung, die Färbung war entgegen dem Trend „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Primärvergrößerung x200.

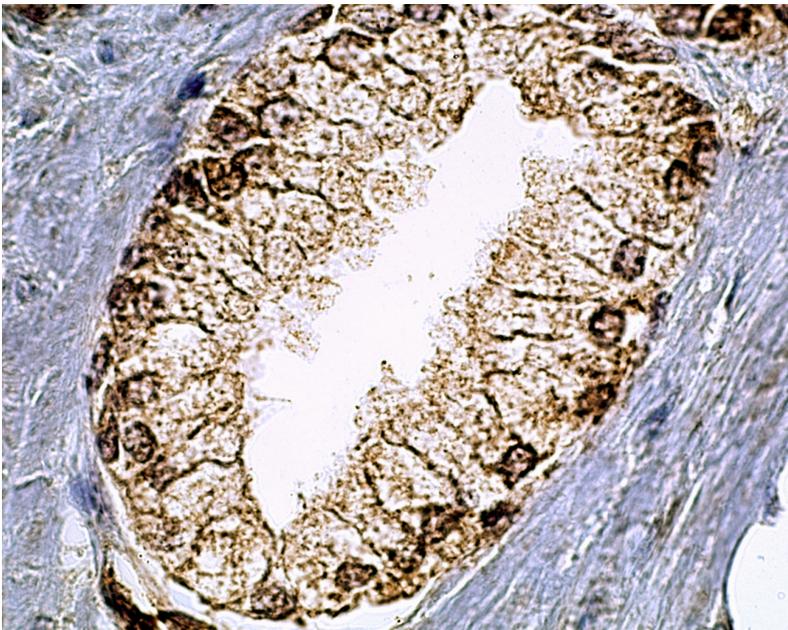


Abb. 17: pT2b, pN0, GI \leq 6, URK -; die pathologische Untersuchung ergab eine kleine TumorgroÙe von pT2b, einen Gleasonwert unter 7 und keine Metastasierung oder Organüberschreitung, die Färbung war entgegen dem Trend „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Primärvergrößerung x200.

War die pathologische Untersuchung der urethralen Resektionskante negativ, so färbten sich 17 Präparate „wenig“ (s. Abb. 18 und 19) und 14 Präparate „viel“ an. Bei positivem pathologischen Ergebnis der urethralen Resektionskante färbten sich 6 Präparate „wenig“ und 21 Präparate „viel“ an. Auch auf der Abbildung 19A im Vergleich zu Abbildung 19B und der Abbildung 20A im Vergleich zur Abbildung 20B erkennt man die starke Färbung. Dies zeigt, dass eine hohe T β -RII-Expression assoziiert ist mit dem Befall der urethralen Resektionskante. Die signifikante Korrelation wurde nachgewiesen mit dem Wert $p=0,0158$.

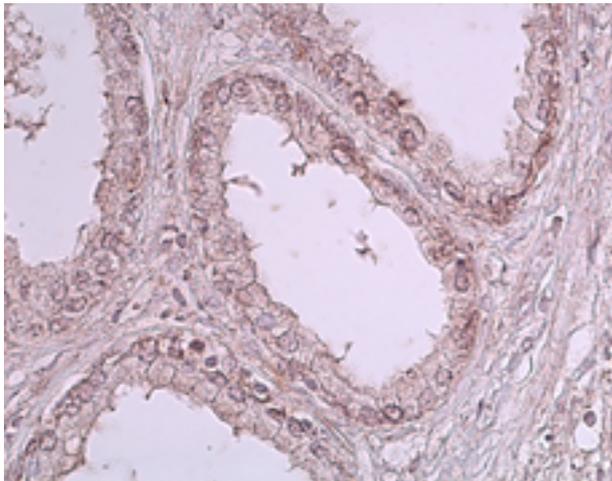


Abb. 18A: pT3b, pN0, GI \leq 6, URK -; die pathologische Untersuchung der Resektionskante war negativ, die immunohistochemische Färbung war wenig. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100.

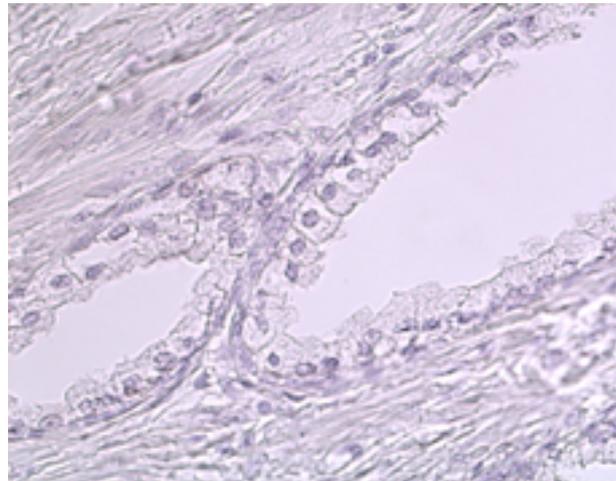


Abb. 18B: Negativkontrolle mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100

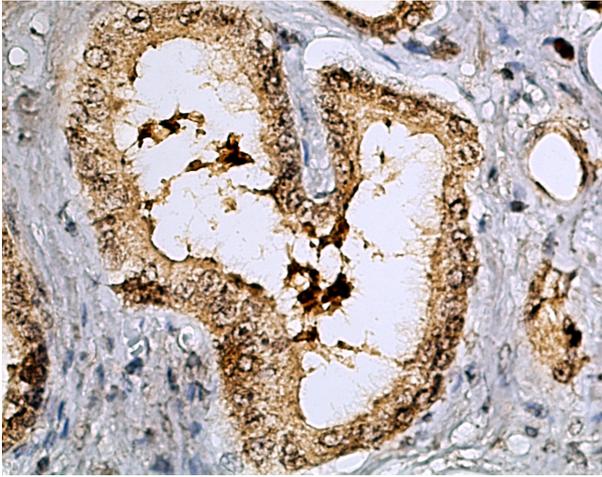


Abb. 19A: pT3b, pN0, G1 \geq 7, URK +; die pathologische Untersuchung der Resektionskante war positiv, die immunohistochemische Färbung war „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100.

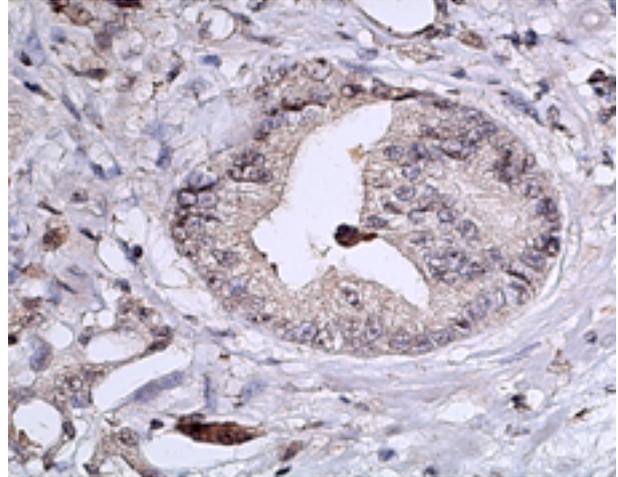


Abb. 19B: Negativkontrolle mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100

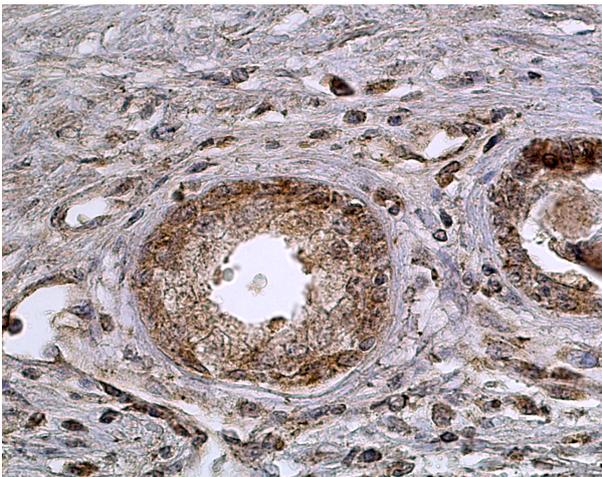


Abb. 20A: pT3b, N1, G1 \geq 7, URK +; die pathologische Untersuchung der Resektionskante war positiv, die immunohistochemische Färbung war „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100.

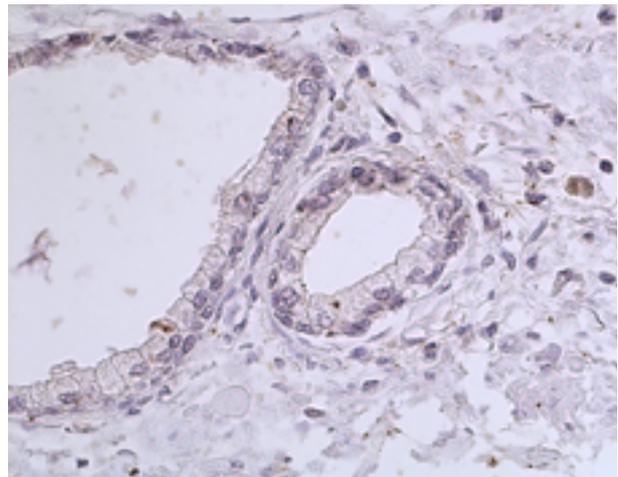


Abb. 20B: Negativkontrolle mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100

Tab. 2: Korrelation der immunhistochemischen T β RII- Färbung mit dem Befall der urethralen Resektionskante (Gesamtkollektiv, n=58)

	WENIG	VIEL	P-Wert
Urethrale Resektionskante negativ	17	14	P= 0,0158*
Urethrale Resektionskante positiv	6	21	

* = signifikant

Außerdem wurden drei weitere Trends festgestellt. Bei der Gegenüberstellung pN0 versus pN1 färbten sich 18 der pN0-Präparate „wenig“ (s. Abb. 21A im Vergleich zur Abb. 21B) und 21 Präparate „viel“ an. 5 der pN1-Präparate färbten sich „wenig“ und 14 Präparate färbten sich „viel“ an. Auch die stärkere Anfärbung der N1-Präparate kann man in Abb. 22A im Vergleich zu den Abb. 22B und Abb. 21A sehen. Dies zeigt einen Trend zur verstärkten Expression von T β RII bei positivem Lymphknotenbefall mit einem Wert von $p=0,1671$ (Tab. 3).

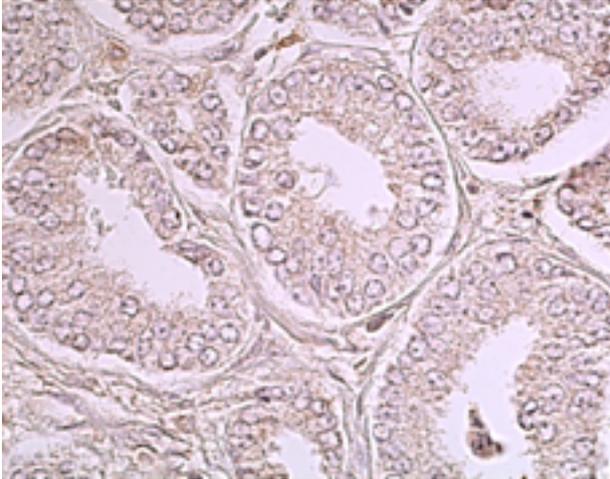


Abb. 21A: pT3b, pN0, GI \leq 6, URK -; die pathologische Untersuchung der Lymphknoten war negativ, die immunhistochemische Färbung war „wenig“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100.

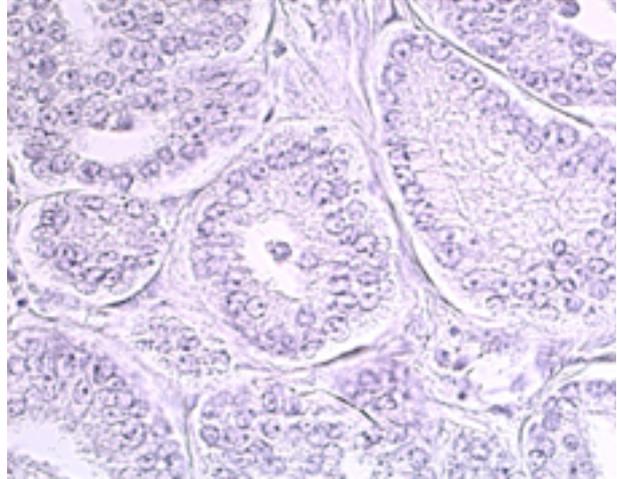


Abb. 21B: Negativkontrolle mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100

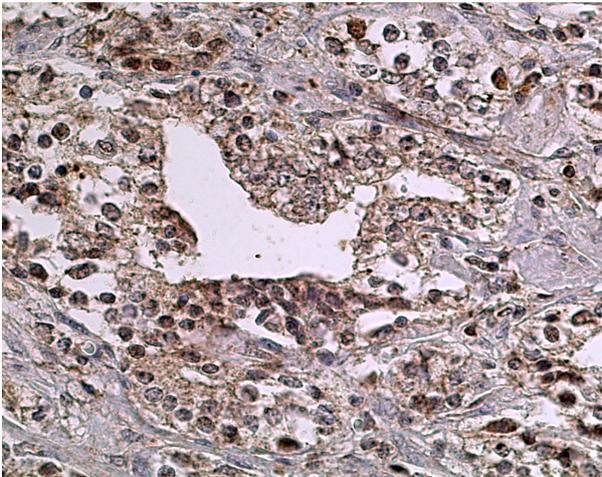


Abb. 22A: pT4, pN1, GI \geq 7, URK -; die pathologische Untersuchung der Lymphknoten war positiv, die immunhistochemische Färbung war „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100.

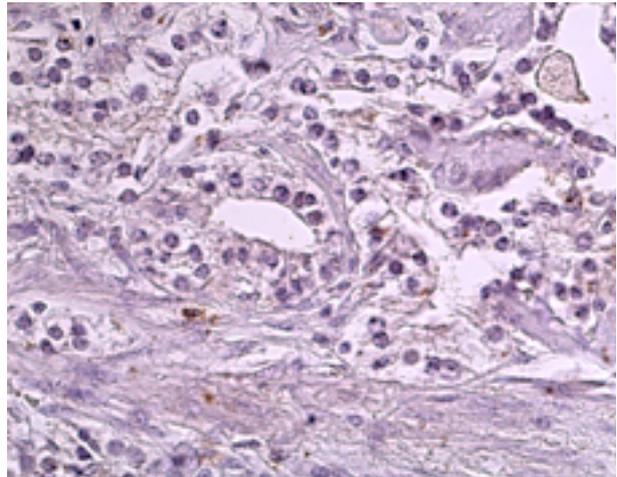


Abb. 22B: Negativkontrolle mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100

Von den Präparaten bei einem Gleason-Score kleiner gleich 6 färbten sich 11 Präparate „wenig“ (s. Abb. 23A und Abb. 23B) und 12 Präparate „viel“ an, wohingegen 11 Präparate bei einem Gleason-Score von größer gleich 7 sich „wenig“ und 24 Präparate sich „viel“ anfärben ließen. Die stärkere Anfärbung ist auch auf Abb. 24A zu sehen. Dies zeigt einen Trend zur gesteigerten T β RII-Expression bei einem Gleason-Score von über 7 mit einem Wert $p=0,2716$ (Tab. 3).

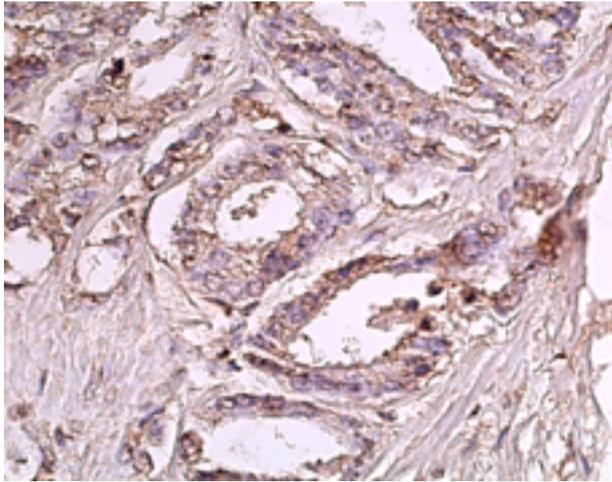


Abb. 23A: pT3a, pN0, GI \leq 6, URK -; die pathologische Untersuchung des Gleason-Scores war kleiner gleich 6, die immunohistochemische Färbung war „wenig“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100.

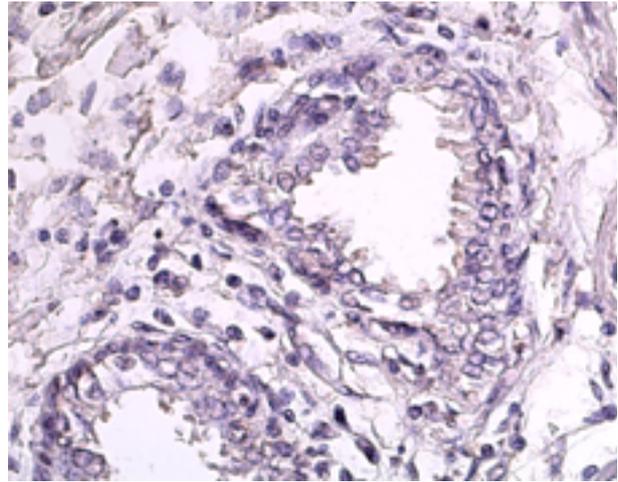


Abb. 23B: Negativkontrolle mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100

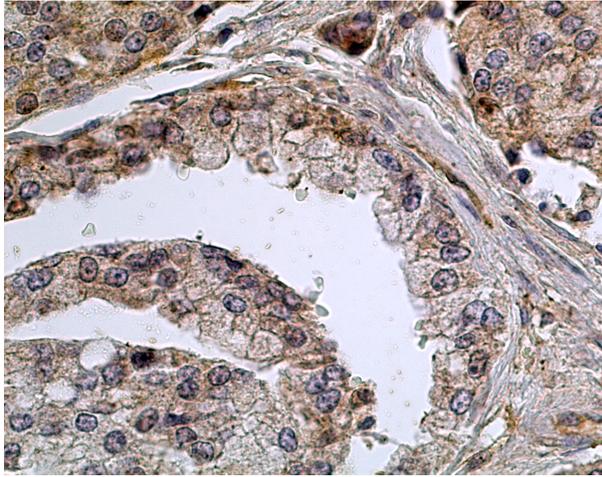


Abb. 24A: pT3b, pN0, GI \geq 7, URK +; die pathologische Untersuchung des Gleason-Scores war größer als 6, die immunhistochemische Färbung war „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100.

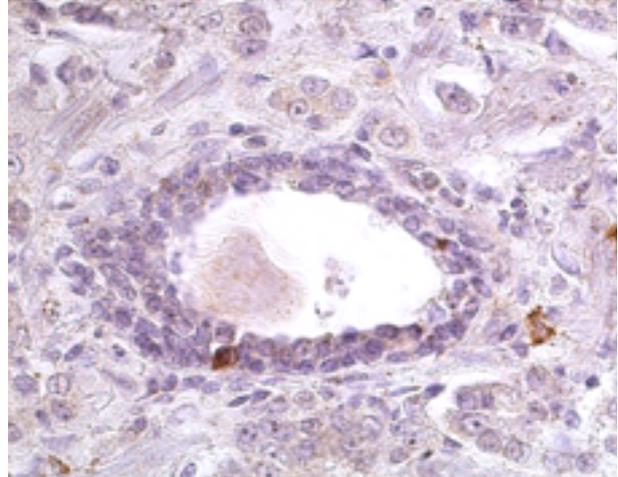


Abb. 24B: Negativkontrolle mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100

Ein weiterer Trend zu einer gesteigerten T β RII-Expression wird sichtbar bei der Gegenüberstellung des einseitigen versus beidseitigen Befalls der Prostata mit einem Wert von $p=0,4601$. Hier ließen sich 5 Präparate bei einseitigem Befall „wenig“ und 4 Präparate „viel“ anfärben. 18 Präparate bei beidseitigem Befall ließen sich „wenig“ und 31 Präparate sich „viel“ anfärben (Tab. 3). Die stärkere Anfärbung der Präparate mit beidseitigem Befall ist auf Abb. 25A zu sehen.

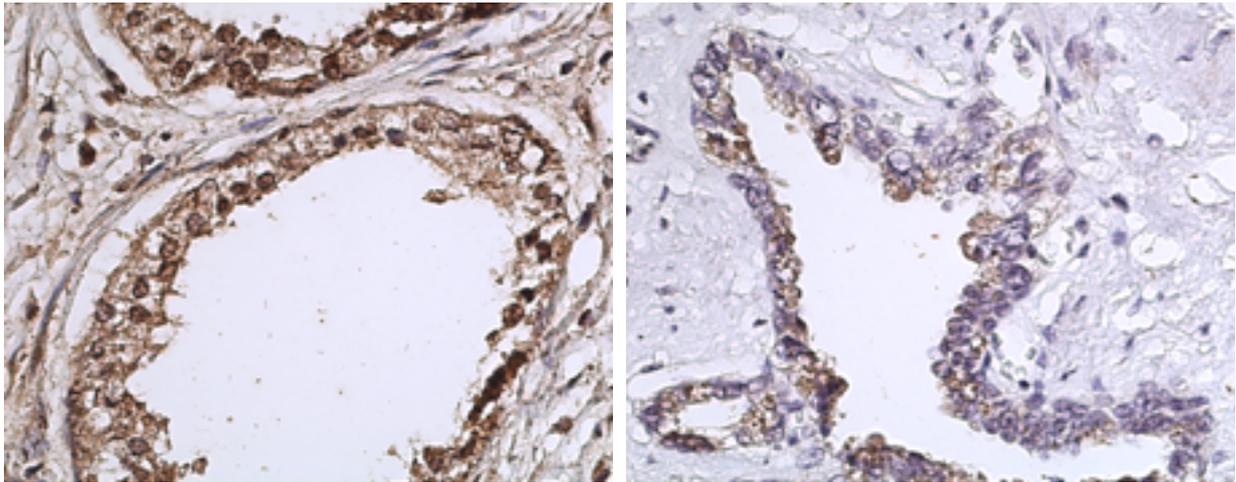


Abb. 25A: pT3b, pN0, GI \geq 7, URK +; die pathologische Untersuchung ergab einen beidseitigen Befall, die immunhistochemische Färbung war „viel“. Immunfärbung zur Darstellung des TGF β -Rezeptors Typ II, mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100.

Abb. 25B: Negativkontrolle mit Hämatoxylin gegengefärbtes Präparat, Vergrößerung x100

Tab. 3: Korrelation der immunhistochemischen T β RII-Färbung mit den Tumorparametern

	WENIG	VIEL	P-Werte
N0	18	21	
N1	5	14	0,1671
Gleason \leq 6	11	12	
Gleason \geq 7	11	24	0,2716
Befall eins.	5	4	
Befall beids.	18	31	0,4601

wenig=wenig Färbeintensität; viel=viel Färbeintensität; eins.=einseitig;
beids.=beidseitig

Die folgenden Untersuchungen ergaben keine Signifikanz. 7 Präparate der Patienten, die einen PSA-Wert unter 10 hatten, färbten sich „wenig“ und 7 Präparate „viel“, 16 Präparate der Patienten, die einen PSA-Wert über 10 hatten, färbten sich „wenig“ und 28 Präparate färbten sich „viel“. Dies ergab einen Wert von $p= 0,5315$ (Tab. 4).

War die pathologische Untersuchung des Samenblasenbefalls negativ, so färbten sich 10 Präparate „wenig“ und 17 „viel“. Bei positivem Ergebnis der Untersuchung des Samenblasenbefalls färbten sich 13 Präparate „wenig“ und 18 Präparate „viel“. Dies ergab mit Hilfe des Fisher`s exact test einen Wert von $p= 0,7909$ (Tab. 4).

Die pathologische Untersuchung der perineuralen Nervenscheiden war bei 33 der 58 Patienten negativ. Hier färbten sich 12 Präparate „wenig“ und 21 Präparate „viel“. 11 der 25 positiv befundenen Präparate färbten sich „wenig“ und 14 „viel“. Bei der Berechnung mit dem Fisher`s exact test ergab dies einen p-Wert von 0,597 (Tab. 4).

War die Untersuchung der blasenwärtigen Absetzungsänder positiv, so färbten sich 4 Präparate „wenig“ und 9 „viel“. Bei negativem Untersuchungsergebnis färbten sich 19 Präparate „wenig“ und 26 „viel“, woraus der Wert $p= 0,5339$ mit dem Fisher`s exact test resultiert (Tab. 4).

Ergab die pathologische Untersuchung des periprostatichen Fett- und Weichteilgewebes ein positives Ergebnis, so färbten sich 7 Präparate „viel“ und 7 „wenig“. Bei negativem Untersuchungsergebnis färbten sich 16 „wenig“ und 28 „viel“. Dies ergab bei der Berechnung mit dem Fisher`s exact test einen p-Wert von 0,5315 (Tab. 4).

Ergab die spätere klinische Untersuchung des Patienten ein Rezidiv, so ließen sich 3 Präparate „wenig“ und 7 „viel“ anfärben, wohingegen 20 Präparate der Patienten ohne Rezidiv sich „wenig“ und 28 Präparate „viel“ anfärben ließen. Daraus resultiert ein Wert von $p= 0,7245$ (Tab. 4).

Bei der immunhistochemischen Anfärbung der 6 Präparate von Patienten, die nur einen befallenen Lymphknoten hatten, färbte sich ein Präparat „wenig“ und 5 Präparate „viel“ an. 4 Präparate, der Patienten, die mehr als einen Lymphknoten befallen hatten, färbten sich „wenig“ und 9 färbten sich „viel“. Bei der Berechnung mit dem Fisher`s exact test lässt sich mit einem Wert von $p= 1,0$ keine Korrelation feststellen.

Tab. 4: Korrelation der immunhistochemischen T β RII-Färbung mit weiteren Tumorparametern (Gesamtkollektiv, n=58)

	WENIG	VIEL	p-Wert
PSA über 10	7	7	
PSA kleiner gleich 10	16	28	0,5315
Samenblasenbefall neg.	10	17	
Samenblasenbefall pos.	13	18	0,7909
Perineural neg.	12	21	
Perineural pos.	11	14	0,5970
Blasenwärtig neg.	19	26	
Blasenwärtig pos.	4	9	0,5339
Fett neg.	16	28	
Fett pos.	7	7	0,5315
LK's 1	1	5	
LK's über 1	4	9	1,0
kein Rezidiv	20	28	
Rezidiv	3	7	0,7245

wenig=wenig Färbeintensität; viel=viel Färbeintensität; neg.=negativ; pos.=positiv;
LK=Lymphknoten

Auch bei der Untersuchung der Korrelation mit dem Alter der Patienten war kein Trend feststellbar.

4.2. Ergebnisse der Bestimmung der TGF β -Serumspiegel mittels ELISA

Auch der Nachweis des Liganden TGF β 2 im Serum mittels eines Elisa-Tests zeigte nur einige Trends und keine Korrelationen. Die Berechnung der Werte erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test.

Von den 76 Patienten bekamen 62 Patienten im Gegensatz zu den restlichen 14 keine Chemotherapie. Von den 62 Patienten ohne Chemotherapie hatte ein Patient ein ossäres Rezidiv, ein Patient wurde antiandrogen behandelt und ein Patient hatte laut MRT einen Verdacht auf Metastasen.

Von den 17 chemotherapeutisch behandelten Patienten hatten drei Patienten lymphogene Metastasen und 11 Patienten ossäre Metastasen.

Die Gegenüberstellung der 37 pN0- und 23 pN1-Patienten ergab bei den pN0-Proben einen Mittelwert von 50,43 ng/ml mit einer Standardabweichung von 9,31 ng/ml bei einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 147 ng/ml, wohingegen der Mittelwert der pN1-Proben 64,66 ng/ml mit einer Standardabweichung von 25,89 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 51,8 ng/ml betrug. Daraus ergab sich ein Trend mit dem Wert $p=0,177$ (Tab. 5). Bei positivem Lymphknotenbefall waren also die Serumwerte von TGF β 2 zwar tendenziell, aber nicht signifikant erhöht.

Tab. 5: Korrelation der TGF β 2-Serumkonzentration mit dem Lymphknotenbefall

	N0	N1	p-Wert
Mittelwert	50,43	64,66	
Standardabweichung	9,31	25,89	0,177
Patienten (n)	37	23	
Minimum	0	0	
Maximum	147,42	51,8	
Medium	26,21	0	

Bei der Untersuchung der organbegrenzten Tumoren (pT2a-2b) versus nicht organbegrenzter Tumoren (pT3a und größer) ließ sich ein Trend-Wert von $p=0,19$ errechnen. Der Elisa-Test der 27 Proben organbegrenzter Tumoren ergab einen

Mittelwert von 50,206 ng/ml mit einer Standardabweichung von 10,731 ng/ml. Das Minimum war wieder 0 ng/ml und das Maximum 147,42 ng/ml. Der Mittelwert der 33 nicht organbegrenzten Tumorproben lag bei 60,53 ng/ml mit einer Standardabweichung von 18,85 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 51,8 ng/ml (Tab. 6). Auch hier zeigte sich bei weiter fortgeschrittenen Tumorstadien eine erhöhte, jedoch nicht signifikant erhöhte, Serumkonzentration an TGF β 2.

Tab. 6: Korrelation der TGF β 2-Serumkonzentration mit der Organbegrenzung

	pT2a-2b	pT3a-pT4	p-Wert
Mittelwert	50,206	60,53	
Standardabweichung	10,731	18,85	0,19
Patienten (n)	27	33	
Minimum	0	0	
Maximum	147,42	51,8	
Medium	26,21	0	

Die Untersuchung der Serumkonzentration bei Gegenüberstellung der Proben von Patienten mit Befall der urethralen Resektionskante (URK +) versus Nichtbefall der urethralen Resektionskante (URK -) ergab folgende Werte: bei den 27 Proben mit nicht befallener Resektionskante war ein Mittelwert von 53,96 ng/ml mit einer Standardabweichung von 9,79 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 25 ng/ml festzustellen. Die 13 Proben mit Befall der urethralen Resektionskante hatten einen Mittelwert von 62,8 ng/ml mit einer Standardabweichung von 40 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 518 ng/ml. Daraus ergab sich ein Trend-Wert von $p=0,147$ (Tab. 7). Auch hier sieht man eine erhöhte, aber nicht signifikant erhöhte Konzentration an TGF β 2 bei weiter fortgeschrittenen Tumoren.

Tab. 7: Korrelation der TGF β 2-Serummenge mit dem Befall der urethralen Resektionskante

	URK-	URK+	p-Wert
Mittelwert	53,96	62,8	
Standardabweichung	9,79	40	0,147
Patienten (n)	27	13	
Minimum	0	0	
Maximum	250	518	
Medium	26	0	

URK = urethrale Resektionskante; -=negativ; +=positiv

Der Vergleich von metastasierenden und nichtmetastasierenden Tumoren ergab ebenfalls einen Trend.

Bei den 59 nichtmetastasierten Tumoren ergab sich ein Mittelwert von 56,83 ng/ml mit einer Standardabweichung von 11,52 ng/ml, einem Maximum von 51 ng/ml und einem Minimum von 0 ng/ml. Die Untersuchung der 24 metastasierten Tumore ergab einem Mittelwert von 19,46 ng/ml mit einer Standardabweichung von 7,094 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 97,8 ng/ml. Daraus folgt der Trendwert von $p=0,144$ (Tab. 8).

Tab. 8: Korrelation der TGF β 2-Serumkonzentration mit der Metastasierung

	M0	M1	p-Wert
Mittelwert	56,83	19,46	
Standardabweichung	11,52	7,094	0,144
Patienten (n)	59	24	
Minimum	0	0	
Maximum	518	97,8	
Medium	20,6	7,8	

Aus der Gegenüberstellung aller anderen zu untersuchenden Parametern ließen sich keine Signifikanz und kein Trend erkennen.

Die 30 Proben mit einem PSA-Wert kleiner oder gleich 9,99 hatten einen Mittelwert von 58,94 ng/ml mit einer Standardabweichung von 19,29 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 518 ng/ml. Wohingegen die 30 Proben mit einem PSA-Wert von mehr als 9,99 einen Mittelwert von 52,83 ng/ml mit einer Standardabweichung von 12,38 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 228 ng/ml hatten. Dies ergab einen Wert von $p=0,774$ (Tab. 9).

Die Gegenüberstellung der 26 Proben mit einem Gleasonwert kleiner gleich 6 versus der 34 Proben mit einem Gleasonwert über 6 ergab einen Wert von $p= 0,51$. Wobei der Mittelwert der ersten Gruppe 41,75 ng/ml mit einer Standardabweichung von 11,85 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 256 ng/ml betrug. Der Mittelwert der zweiten Gruppe war 66,7 ng/ml mit einer Standardabweichung von 17,84 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 518 ng/ml (Tab. 9).

Die Untersuchung der 10 Proben mit einseitigem Befall ergab einen Mittelwert von 35,1 ng/ml mit einer Standardabweichung von 14,46 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 165 ng/ml, wohingegen die Untersuchung der 50 Patienten mit beidseitigem Befall einen Mittelwert von 60,04 ng/ml mit einer Standardabweichung von 13,17 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 518 ng/ml ergab. Daraus lässt sich der Wert $p= 0,438$ errechnen (Tab. 9).

War das umliegende Fettgewebe nicht befallen, führte die Untersuchung der 46 Proben zu einem Mittelwert von 60,64 ng/ml, einer Standardabweichung von 14,11 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 518 ng/ml. Dies wurde den Ergebnissen der 14 Proben, in denen das Fettgewebe befallen war, mit dem Mittelwert 40,25 ng/ml, der Standardabweichung 14,98 ng/ml, dem Minimum 0 ng/ml und dem Maximum 165 ng/ml gegenübergestellt. Daraus ließ sich mittels des Mann-Whitney-Tests der Wert $p=0,4$ errechnen (Tab. 9).

Auch wurde der zusätzliche Befall der Samenblase dem Nicht-Befall der Samenblase gegenübergestellt. Bei Nicht-Befall ergab sich aus den 42 Proben ein Mittelwert von 42,61 ng/ml mit einer Standardabweichung von 8,45 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 197 ng/ml. Die 18 Proben mit noch zusätzlich befallener Samenblase ergaben einen Mittelwert von 86,87 ng/ml mit einer Standardabweichung von 31,83 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 518 ng/ml. Daraus lässt sich der Wert $p= 0,86$ errechnen (Tab. 9).

Die pathologische Untersuchung der perineuralen Nervenscheiden war bei 31 Patienten negativ. Hier ergab der Elisa-Test des Serums einen Mittelwert von 54,76 ng/ml mit einer Standardabweichung von 17,45 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 518 ng/ml. Bei 29 Patienten ergab die pathologische Untersuchung einen positiven Befund. Hier ließ sich ein Mittelwert von 57,1 ng/ml mit einer Standardabweichung von 14,65 ng/ml, einem Minimum von 0 ng/ml und einem Maximum von 25 ng/ml messen. Daraus errechnet sich der Wert $p=0,78$ (Tab. 9).

Tab. 9: Korrelation der TGF β 2-Serummenge mit weiteren Tumorparametern

	MW	SEM	Menge	Min	Max	Med	P-Wert
PSA \leq 9	58,94	19,29	30	0	518	30,59	
PSA \geq 10	52,83	12,38	30	0	228	18,91	0,774
Gleason \leq 6	41,74	11,85	26	0	250	19,23	
Gleason $>$ 6	66,7	17,84	34	0	518	23,09	0,51
Befall eins.	35,1	14,46	10	0	165	10,3	
Befall beids.	60,04	13,17	50	0	518	20,28	0,438
Fett -	60,64	14,11	46	0	518	23,4	
Fett +	40,26	14,98	14	0	165	6,123	0,4
Samenblase -	42,61	8,45	42	0	197	20,28	
Samenblase +	86,87	31,83	18	0	518	21,45	0,86
Perineural -	54,76	17,45	31	0	518	26	
Perineural +	57,1	14,46	29	0	25	19,97	0,78

MW=Mittelwert; SEM=Standardabweichung (Standard error of the mean);
 Min=Minimalwert; Max=Maximalwert; Med=Medium (Mittelwert); eins.=einseitig;
 beids.=beidseitig; -=negativ; +=positiv

5. Diskussion

In dieser Studie wurde der TGF β -Rezeptor Typ II in Prostatakarzinomschnitten immunhistochemisch nachgewiesen. Vor allem die Drüsenzellen, aber auch die Stromazellen einiger Prostatagewebeprouben färbten sich stark, während sich die Zellen der Prostatagewebeprouben anderer Patienten nur sehr wenig anfärbten. In der statistischen Auswertung zeigte sich, dass die Stärke der Anfärbung mit verschiedenen Karzinomparametern korrelierte. Je weiter ausgebreitet der Tumor war, desto stärker war die immunhistochemische Färbung. Auch bei steigender Aggressivität des Prostatakarzinoms gab es eine Korrelation mit der stärkeren Anfärbung der Tumoreale. Man kann also zusammenfassend sagen: je weiter ausgebreitet und organüberschreitender der Tumor ist, desto stärker ist tendenziell die immunhistochemische Anfärbung.

5.1. Diskussion der Methode

5.1.1. Die immunhistochemische Anfärbung des TGF β -Rezeptors Typ II

Limitiert wurden die hier beschriebenen Untersuchungen durch die relativ geringe Fallzahl (Prostatagewebeschnitte von 58 Patienten). So war keine statistische Auswertung der Zusammenhänge zwischen Tumorgröße, Tumoraggressivität und Metastasierung im 4-stufigen Anfärbungsscore möglich. Nach Dichotomisierung war eine statistische Auswertung der Korrelationen der oben genannten Faktoren durchführbar, da bei den so entstandenen 2x2-Kreuztabellen der Fisher-Test anwendbar war. Dennoch bleibt anzumerken, dass bei einem so begrenzten Untersuchungsgut nicht unbedingt von einer Repräsentativität der Fälle ausgegangen werden kann. Zwar können auch bei Studien mit größeren Fallzahlen Verzerrungen auftreten; generell ist aber mit zunehmenden Fallzahlen auch eine größere Repräsentativität zu erwarten.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie hängen im Besonderen vom Fixierungsprozess, von den verwendeten Antikörpern und der Definition von der Intensität der Anfärbung ab. Letzteres lässt eher eine subjektive Bewertung als eine quantitative Aussage zu. Darüber hinaus ist die Qualität immunhistochemischer Färbungen von Paraffinschnitten von möglichen Konformitätsveränderungen der Epitope (Antigen-Maskierung) durch die Formalinfixierung abhängig. In

verschiedenen Studien wurden bereits der TGF β -Rezeptor Typ II mittels Immunhistochemie mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Gerdes et al. (1998) und Wikström et al. (1998) arbeiteten ebenfalls mit in Paraffin eingebettetem Prostatakarzinomgewebe und verwendeten die monoklonalen Antikörper von R&D Systems. Williams et al. (1996) und Royela et al. (1998) verwendeten in ihren Studien die Antikörper allerdings von der Firma Santa Cruz.

Zur Verstärkung der Anfärbung wurde in der vorliegenden Arbeit die Polymermethode angewendet. Der Vorteil liegt darin, dass kein Biotin mehr verwendet werden muss wie bei der so genannten ABC-Methode (Avidin-Biotin-Chromogen), die von Kim et al. (1996), Williams et al. (1996) und Wikström et al. (1999) durchgeführt wurde. Das dabei verwendete Biotin führte häufig zu Hintergrundfärbungen. Daher ist die hier verwendete Polymermethode sensitiver als alle früheren Methoden mit einem geringeren Hintergrund. Der Nachteil liegt in der Größe der Dextranmoleküle, die ins Gewebe eingebracht werden müssen und dort zu sterischen Behinderungen am Bindungsort führen können.

Da die Polymermethode nur mit dem Anti-Rabbit „Envision Labelled Polymer“ der Firma DAKO möglich war, musste ein Sekundärantikörper gefunden werden, der eine optimale Verbindung zwischen dem primären Goat-Antikörper und dem Anti-Rabbit-Polymer herstellt. Nach verschiedenen Versuchen hat sich in dieser Studie der Sekundärantikörper Rabbit Anti-Goat Immunglobulin G (IgG) der Firma DAKO bewährt. Kritiker könnten hier nun eine schlechtere immunhistochemische Reaktion aufgrund der Verwendung von Antikörpern verschiedener Firmen vermuten, doch hat sich in dieser Studie eher eine stärkere Färbung im Vergleich zu anderen Studien gezeigt (Williams et al., 1996, Wikström et al., 1998).

Die immunhistochemische Methode als Nachweisform der Rezeptoren hat jedoch ihre methodischen Grenzen. Mittels der Antikörper werden Proteine nachgewiesen, die typisch sind für bestimmte Strukturen. Der Nachweis der Proteine eines Rezeptors lässt Rückschlüsse auf dessen Vorhandensein zu, sagt aber nichts über die Aktivität oder Veränderungen durch Mutationen des Rezeptors aus. Die genaue Quantifizierung kann nur durch eine Mikrodisektion der Tumoreale und nachfolgender quantitativer Analyse durch zum Beispiel Real-Time PCR erfolgen.

5.1.2. Bestimmung der TGF β 2-Serumkonzentration mittels ELISA

Das am häufigsten angewandte Verfahren zum quantitativen Nachweis von Zytokinen stellt sowohl im klinischen als auch im experimentellen Bereich der Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) dar. Neben dem kostengünstigen Aspekt dieses Verfahrens zeichnet sich der ELISA als schnelle und einfache Nachweismethode aus, da auf Trennmethoden zur Separierung freier und gebundener Antigene verzichtet werden kann (Engvall et al., 1971). Die ELISA-Technik hat insbesondere für die Untersuchung von Serum den Vorteil, mehrere verschiedene Antigene oder Antikörper nachweisen zu können. Deshalb bietet sich diese Nachweisform für Screening-Untersuchungen auch im Rahmen der Karzinomdetektion an. Außerdem ist der ELISA durch die photometrische Bestimmung nicht von der Subjektivität der Beurteilung des Betrachters abhängig und lässt somit quantitative Aussagen zu.

In diese Studie wurden alle Patienten aufgenommen, die zwischen 2002 und 2003 im Klinikum der Philipps-Universität Marburg an einem Prostatakarzinom operiert und deren Daten auch anschließend ausreichend dokumentiert wurden. Bei der statistischen Auswertung zeigten sich einige Trends, aber keine Korrelationen zu den untersuchten Tumorparametern. Vielleicht würden sich signifikantere Werte bei einer höheren Patientenzahl ergeben. Außerdem stellte sich bei der ELISA-Untersuchung heraus, dass die TGF β 2-Serumkonzentrationen bei allen Patienten sehr niedrig waren, so dass selbst der ELISA mit der Darstellung der Ergebnisse an seine Grenzen stieß.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Ausbreitung des Tumors

Mit dem TGF β 2-ELISA konnte in dieser Studie ein Trend zu einem Anstieg der Serumkonzentration dieses Liganden bei größeren Tumoren gezeigt werden. Auch Perry et al. (1997a) haben in ihren Studien einen TGF β 2-Anstieg im Plasma bei beginnenden Tumoren nachgewiesen. Ebenfalls konnten sie in einer anderen Studie einen Anstieg des TGF β 2-Levels im malignen Prostataepithel aufzeigen (Perry et al., 1997b). Das nah am malignen Epithel liegende Stroma zeigte ebenfalls einen TGF β 2-Anstieg, was Perry et al. (1997a,b) auf eine parakrine Produktion des Wachstumsfaktors durch das maligne Epithel zurückführten. TGF β 2 hemmt in der gesunden Prostata das Zellwachstum und die Proliferation des Epithels und fördert die Apoptose (Danielpour, 2005). In wie weit allerdings die TGF β 2-Konzentration im Serum einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten in Karzinomen hat, ist noch ungeklärt.

Als sezerniertes Molekül wird TGF β 2 meist lokal an LTBP (latent TGF β binding proteins) gebunden. TGF β wird bei Vorhandensein von LTBP in gesundem Gewebe vermehrt gebildet (Miyazono et al., 1991). Eklöv et al. (1993) haben in ihren Studien jedoch nachgewiesen, dass TGF β in Karzinomen unabhängig vom LTBP-Level gebildet wird. Wird jedoch das TGF β 2 nicht durch eine Bindung an andere Proteine geschützt, wird es bei Abgabe an das Blut schnell abgebaut. O'Connor-McCourt et al. (1987) identifizierten α_2 -Makroglobulin (α_2 M) als signifikanten Carrier im Serum für TGF β 1 und Webb et al. (1998) diesen auch für TGF β 2. Außerdem zeigten sie, dass der an α_2 M reversibel gebundene Wachstumsfaktor TGF β 2 inaktiv ist. Auf diese Weise puffert α_2 M das umgebende Gewebe gegen zu schnelle Wechsel der TGF β 1- und TGF β 2-Konzentration ab. Man sollte allerdings ebenfalls bedenken, dass dieser inaktive Zustand der Wachstumsfaktoren auch zu falsch-negativen Tests in Studien führen kann (Webb et al., 1998).

Wie schon bereits erwähnt, ist der Einfluss der TGF β 2-Serumkonzentration auf ein Karzinom noch nicht geklärt, man kann jedoch umgekehrt von einem TGF β 2-Anstieg im Serum auf einen TGF β 2-Anstieg im Gewebe zurückschließen. Steigt also die Konzentration von TGF β 2 im Gewebe, könnte TGF β 2 antiproliferativ auf die Tumore wirken. Andererseits haben Leitlein et al. (2001) in ihrer Studie gezeigt, dass TGF β 2

an der immunen Dysfunktion bei Patienten mit Gliomen beteiligt ist. TGF β 2 ist ein Regulator für das Wachstum und die Funktion von Lymphknoten und Makrophagen und inhibiert die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Durch diese Immunsuppression bekämpft das Immunsystem die Tumore schlechter und die Gliome sind „ungestört“ in ihrem Wachstum (Leitlein et al., 2001). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Tumore in irgendeiner Weise „resistent“ gegenüber dem oben erwähnten antiproliferativen TGF β -Effekt sein müssen. Auch Tang et al. (1999) wiesen nach, dass bei Ausschalten von TGF β 2 in einer epithelialen Prostatazelllinie von Ratten das Wachstum nicht mehr inhibiert und auch die Apoptose nicht mehr induziert wird und somit die Karzinogenese voranschreitet. TGF β 2 hat also in der gesunden Prostata die Aufgabe, eine Karzinomentstehung zu verhindern, bei Prostatakarzinomen scheint diese Aufgabe aber „verloren zu gehen“. In dieser Studie wurde aber auch bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen eine erhöhte TGF β 2-Konzentration festgestellt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Teile des TGF β -Signalwegs oder der Rezeptoren blockiert sein könnten, so dass der Signalweg unterbrochen ist.

Hahn et al. (1996) konnten bei etwa der Hälfte der von ihnen untersuchten Pankreaskarzinomen eine Mutation von Smad4 nachweisen. Bei dem Smad-Signalweg binden die phosphorylierten rezeptorassoziierten Smads an das nichtphosphorylierte Co-Smad (Smad4) und translozieren in den Zellkern. Liegt eine Mutation von Smad4 vor, können die rezeptorassoziierten Smads nicht mehr daran binden und der Smad-Signalweg ist unterbrochen. Dadurch fände keine Informationsübertragung der TGF β 2-Effekte in den Zellkern statt. MacGrogan et al. (1997) haben allerdings festgestellt, dass diese Mutation nur in etwa 10% der untersuchten Prostatakarzinomen vorkommt.

Lu et al. (2004) untersuchten die Apoptose-Resistenz in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 auf der Ebene des Nuclear-factor- κ B (NF- κ B)-Signalwegs. Dieser Signalweg wird ebenfalls durch TGF β 2 aktiviert und bewirkt eine Apoptose-Resistenz und somit eine höhere Überlebensrate der Karzinomzellen. Hier hat sich also gezeigt, dass TGF β 2 auch einen wachstumsfördernden Effekt besitzt. Das aktivierte NF- κ B hilft den Tumorzellen bei ihrer Resistenz gegenüber dem Tumornekrosefaktor TNF. Lu et al. (2004) schließen aus ihren Untersuchungen, dass es für Tumorzellen nützlich sei, die Wachstumsunterdrückung durch den Smad-Signalweg „loszuwerden“, aber die Apoptoseunterdrückung über den NF- κ B-Signalweg zu erhalten. Dies gelingt den

Zellen entweder über eine Mutation der Rezeptoren („Silencing durch Methylierung“) oder der Smads. Auch die fehlende Wachstumsunterdrückung bei erhöhter Rezeptorexpression könnte durch eine Mutation der Rezeptoren oder der Smads erklärt werden. Würde diese Hypothese auch auf die in dieser Studie untersuchten Patientenproben zutreffen, wäre es eine Erklärung für die zunehmende Tumorausbreitung trotz eines TGF β 2-Konzentrationsanstieg im Gewebe.

Kim et al. (1996) haben genau entgegen den Ergebnissen dieser Studie gezeigt, dass in Karzinomzellen die Rezeptoren Typ I und Typ II weniger vorhanden sind und haben daraus geschlossen, dass die TGF β -Rezeptor-Typ-II-Expression bei höheren Tumorgraden sinkt. Auch Williams et al. (1996) haben eine abnehmende bis gar keine immunhistochemische Anfärbung des Rezeptors Typ II in Karzinomzellen zeigen können. Wikström et al. (1999) haben die Expression des Rezeptors Typ I, Typ II und von TGF β 1 gemessen. In ihren Studien stieg die Konzentration von TGF β 1 und, entgegen den Ergebnissen dieser Studie, sank die Rezeptormenge bei sinkender Überlebensrate und steigendem Tumorgrad. Allerdings wurden die Karzinompatienten nur vier Jahre lang beobachtet, was beim Prostatakarzinom zu kurz sein kann. Auch verwendeten Wikström et al. (1999) zwar den gleichen Primärantikörper wie in dieser Studie, jedoch den Sekundärantikörper einer ganz anderen Firma, so dass es hier zu einer schlechteren Bindung zwischen Primär- und Sekundärantikörper und somit zu falsch-negativen Ergebnissen gekommen sein könnte. Ebenso untersuchten Kim et al. (1996), Williams et al. (1996) und Wikström et al. (1999) ihre Proben mit der nach heutigen Maßstäben ungenaueren ABC-Methode, die häufig zu starken Hintergrundfärbungen und somit zu ungenaueren Ergebnissen geführt haben könnte. Ihre Tumorparameter wurden unterteilt in Tumorgröße, Metastasen, Vaskularisation, Tumorüberlebensrate und Serum-PSA. Alle drei Studien gehen davon aus, dass die „TGF β -Resistenz“ der Tumorzellen oder „TGF β -nicht-Responsivität“ durch eine sinkende TGF β -Rezeptor-Typ-II-Expression zustande kommt. Fehlt der Rezeptor Typ II, so kann TGF β nicht den Signalübertragungsweg in den Zellkern initiieren.

Shariat et al. (2001, 2004a, b) untersuchten die TGF β 1-Plasmaspiegel und die Rezeptor Typ I- und Rezeptor Typ II-Expression bei Prostatakarzinomen. Dabei stellten sie fest, dass ein erhöhter TGF β 1-Plasmaspiegel assoziiert ist mit einem höheren PSA-Wert, Samenblasenbefall und Lymphknotenbefall. In ihrer Studie zeigten sie auch, dass die Rezeptorexpression bei weiter ausgebreiteten Tumoren

sinkt. Da vor allem die verminderte Expression des Rezeptors Typ I mit dem Gleasonwert, dem Samenblasenbefall und der schlechteren 4-Jahres-Überlebensrate korrelierte, schlossen sie, dass der Rezeptor Typ I eine wichtigere Rolle bei der Prostatakarzinomprogression spielt als der Rezeptor Typ II. Royela et al. (1998) färbten die Rezeptoren Typ I und Typ II immunhistochemisch in Adenokarzinomen an und stellten entsprechend den Ergebnissen dieser Studie fest, dass die Rezeptorexpression ansteigt. Der Rezeptor Typ I zeigte nur in Epithelzellen eine stärkere Anfärbung. Bei der Färbung des Rezeptors Typ II waren die Epithelzellen stark angefärbt und das Stroma zeigte eine schwache Färbung. Royela et al. (1998) stellten die Hypothese auf, dass ein inkompletter Rezeptor die „nicht-Responsivität“ der Tumorzellen bedingt. Zhang et al. (2005) untersuchten diese „nicht-Responsivität“ von Prostatakarzinomzellen gegenüber TGF β 1 in der LNCaP-Zelllinie. Sie stellten fest, dass diese Insensitivität von LNCaP-Zellen auf TGF β 1 auch bei gleich bleibender Expression der Rezeptoren Typ I und Typ II auftritt. Da laut ihren Untersuchungen die Rezeptoren in ihrer 5'-Region keine TATA beziehungsweise CAAT-Box besitzen, sind Bindungsmöglichkeiten an SP-1, Aktivator-Protein AP-1 und AP-2 in dieser Region für die Signalübertragung wichtig. Methylierungen in dieser Region setzen das Transkriptionspotential erheblich herunter. LNCaP-Zellen wiesen bei beiden Rezeptoren an einigen dieser Stellen Methylierungen auf, was die Hypothese einer Herunterregulierung der Aktivität des Rezeptors im Prostatakarzinom bestätigen könnte (Zhang et al., 2005).

Auch in der vorliegenden Studie färbten sich bei der immunhistochemischen Rezeptoranfärbung das Epithel stark und das Stroma leicht an. Je weiter ausgebreitet die Tumore waren, desto stärker zeigte sich die Färbung, so dass auf eine höhere Rezeptorexpression bei weiter ausgebreiteten Tumoren geschlossen wurde. Wie schon unter 1.11. beschrieben, ist TGF β 2 am Anfang der Prostataatumorgenese noch wachstumsinhibierend. Diese Unterdrückung geschieht über einen autokrinen wachstumsunterdrückenden Signalweg. Doch während der Tumorentwicklung wird das Zytokin zu einem Tumorpromotor. Laut Elliott & Blobel (2005) kann die plötzlich fehlende Signalübertragung auch noch andere Ursachen haben als eine verminderte Rezeptorexpression. Zum Beispiel kann eine erhöhte Produktion des inhibitorischen Smad7 zu einer weitgehenden Signalunterdrückung führen. Edlund et al. (2005) haben herausgefunden, dass in Prostataatumoren das inhibitorische Smad7 vermehrt vorkommt. So kann einerseits die Signalübertragung

über den Smad-Signalweg unterdrückt werden. Andererseits haben sie auch gezeigt, dass Smad7 erforderlich ist für eine TGF β -induzierte Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs, der wiederum die Apoptose der Zellen inhibiert (Edlund et al., 2005). Außerdem ist TGF β dazu fähig, die Produktion anderer Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) und TGF α (transforming growth factor alpha) ansteigen zu lassen (Elliot & Blobe, 2005). Durch Steigerung verschiedener Wachstumsfaktoren oder Aktivierung von Signalwegen, wie zum Beispiel Ras/Raf/MAPK, die oft proliferative Signale von Wachstumsfaktoren übermitteln, ist TGF β in der Lage, wachstumsfördernd zu wirken (Hocevar et al., 1999; Hanafusa et al., 1999). Zudem kann TGF β 2 Smad-unabhängige Signalwege aktivieren (Elliot & Blobe, 2005). So kann TGF β bei „Ausschalten“ des Smad-Signalwegs seine wachstumshemmende Wirkung verlieren und sogar wachstumsfördernd wirken.

5.2.2. Aggressivität des Tumors

Auch bei der Tumoraggressivität hat diese Studie eine Tendenz zur verstärkten Expression des TGF β -Rezeptors Typ II gezeigt. Ist ein Tumor organüberschreitend und / oder die urethrale Resektionskante infiltriert, so zeigte sich eine stärkere immunhistochemische Färbung. Williams et al. (1996) stellten im Gegensatz dazu fest, dass die Expression des TGF β -Rezeptors Typ II mit histologisch fortschreitender Aggressivität des Karzinoms abnahm. In ihren Experimenten zeigte sich eine starke Anfärbung des Rezeptors im gesunden Epithel, wohingegen die Färbung im Karzinomgewebe schwach bis gar nicht vorhanden war.

In dieser vorliegenden Studie verhalten sich die Ergebnisse der Anfärbung und des TGF β 2-ELISAs genau gegensätzlich zu den Untersuchungen von Williams et al. (1996). Es konnte ein Trend zu einer erhöhten TGF β 2-Serumkonzentration bei stärkerer Tumorausbreitung nachgewiesen werden, sowohl bei organüberschreitenden Tumoren als auch bei Befall der urethralen Resektionskante. Da aber die TGF β 2-Serumkonzentrationen bei allen Patienten sehr niedrig waren, war es nicht möglich, bei dem ELISA eine Korrelation der Konzentration mit den Tumorparametern festzustellen. Lediglich kleinere Differenzen der Konzentrationen konnten gemessen werden, so dass sich lediglich einige Trends aufzeigten. Andererseits wurden nur in 76 Proben die TGF β 2-Serumkonzentration bestimmt. Vielleicht würden sich einige Korrelationen aus den oben genannten Trends bei einer höheren Patientenzahl oder einer sensitiveren Methode, wie zum Beispiel einer Immuno-PCR, zeigen.

Zur Infiltration umliegender Gewebe durch Krebszellen sind einige Faktoren nötig. Der Zell-Zell-Kontakt, also die Zelladhäsion, muss abnehmen, wohingegen die Motilität der Krebszellen steigen muss. Desruisseau et al. (1996) konnten zeigen, dass TGF β 1 mittels Herabsetzen der Expression von E-Cadherinen die Invasivität und Metastasierung von Prostatakarzinomzellen fördert. Die Expression von E-Cadherinen bewirkt nicht nur eine starke Zell-Zell-Adhäsion, sondern induziert auch Veränderungen im Zellverhalten, wie zum Beispiel eine reduzierte Zellwanderung, Wachstumsinhibition und die Modulation des Zytoskeletts (Miettinen et al., 1994).

Laut Shariat et al. (2004b) ist die TGF β 1-Konzentration im Plasma bei aggressiveren Prostatakarzinomen erhöht. Giannelli et al. (2002) fanden heraus, dass TGF β 1 bei Leberzelltumoren die Invasivität und Metastasierung triggert, indem es die

Produktion von $\alpha 3\beta 1$ -Integrin steigert. $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ist in die Produktion und/oder Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) involviert. Deren proteolytische Aktivität ermöglicht den Leberzelltumor-Zellen die Penetration in das umliegende Gewebe. Sie erklären damit die hohe TGF β 1-Serumkonzentration bei metastasierenden und organüberschreitenden Tumoren (Giannelli et al., 2002). In wie weit die Invasivität von Prostatumoren dadurch beeinflusst wird, ist noch nicht geklärt.

Indem TGF β 1 die Synthese integrinbindender Proteine wie Fibulin-5 erhöht, hat es auch hier einen positiven Effekt auf die Zellproliferation, Motilität und Invasion (Elliott & Blobel, 2005). Außerdem steigert TGF β 1 die proteolytische Aktivität der Krebszellen, indem es die Produktion der matrixabbauenden Enzyme fördert (Elliott & Blobel, 2005). Ist also die TGF β 1-Konzentration erhöht, so ergibt sich eine verringerte Zelladhäsion, Steigerung der Motilität und proteolytischen Aktivität der Krebszellen. Der Tumor wird aggressiver und breitet sich stärker aus.

Die Aggressivität bei den meisten Tumoren steht also eher mit der TGF β 1-Konzentration in Zusammenhang als mit der TGF β 2-Konzentration, wobei Dallas et al. (2005) nachgewiesen haben, dass im Prostatakarzinom TGF β 2 der vorherrschende Wachstumsfaktor ist. In dieser Studie haben wir ebenfalls einen Anstieg der TGF β 2-Serumkonzentration bei aggressiveren Tumoren nachgewiesen. Verhalten sich die Prostatakarzinomzellen im Patientengewebe ähnlich wie die Karzinomzellen in der von Lu et al. (2004) untersuchten Zelllinie PC3, so könnten sie ebenfalls eine Apoptose-Resistenz über den NF- κ B-Signalweg aufzeigen. Diese Apoptose-Resistenz fördert natürlich die Aggressivität eines Karzinoms. Weisen dann die Zellen noch eine Rezeptorinaktivierung durch Methylierung wie die von Zhang et al. (2005) untersuchten LNCaP-Zellen auf, ist auch der wachstumshemmende Effekt von TGF β 2 ausgeschaltet, der der Tumoraggressivität dann nicht mehr im Wege steht.

5.2.3. Metastasierung des Tumors

Tumore mit einer Metastasierung zeigten eine höhere Expression des TGF β -Rezeptors Typ II. Auch der ELISA ergab eine Tendenz zum TGF β 2-Serumkonzentrationsanstieg bei stärkerer Metastasierung der Tumore. Metastasen sind, genauso wie eine Organüberschreitung des Tumors, von verschiedenen Zelleigenschaften abhängig. Nachdem der Zell-Zell- beziehungsweise der Zell-Matrix-Kontakt gestört ist, müssen die Zellmotilität und die Invasivität ansteigen (Elliott & Blobel, 2005). Wie bereits unter 5.2.2. beschrieben, bewirkt die Expression von E-Cadherinen eine starke Zell-Zelladhäsion, reduzierte Zellwanderungen, Zytoskelettmodulation und Wachstumsinhibition. TGF β 1 setzt die Expression von E-Cadherinen herab und vermindert somit die Zelladhäsion (Miettinen et al., 1994). Außerdem haben Zicha et al. (1999) eine direkte, Zellzyklus-abhängige Steigerung der Motilität von Lungenepithelzellen unter Zugabe von TGF β 1 festgestellt. Somit erhöht TGF β 1 die Invasivität der Krebszellen durch Senkung der Zelladhäsion, Steigerung der Motilität und proteolytischen Aktivität (Elliott & Blobel, 2005).

Auch Wikström et al. (1999) haben einen TGF β 1-Anstieg und eine verringerte T β RII-Rezeptorexpression im Gewebe von Patienten mit Metastasen und schlechter 4-Jahres-Prognose gemessen. Dies wurde ebenfalls von Williams et al. (1996) beschrieben. Wikström (1998) und Williams (1996) vermuten, dass die Expression des hochaffinen Rezeptors T β R Typ II sinkt und somit der Smad-Signalweg weniger aktiviert wird. Im Gegensatz dazu stellten Royela et al. (1998) die Hypothese auf, dass ein „veränderter“ Rezeptor die „nicht-Responsivität“ der Krebszellen bewirkt, da in ihren Studien, wie auch in der vorliegenden Studie, die Anzahl der Rezeptoren Typ I und Typ II bei aggressiveren Tumoren ansteigt. Neuere Studien von Zhang et al. (2005) stützen diese Hypothese. Sie wiesen eine Inaktivierung des Rezeptors Typ II durch Methylierung in LNCaP-Zellen nach.

Eine Invasion in umliegendes Gewebe ist über verschiedene Faktoren möglich. Indem TGF β 1 die Produktion von α 3 β 1-Integrinen steigert, wird den Tumorzellen während der Karzinogenese eine Penetration in das umliegende Gewebe ermöglicht (Giannelli et al., 2002). Mittels einer Inaktivierung des Smad3-interagierenden Proteins Menin oder einer Blockierung der TGF β -Rezeptoren durch Disabled-2 kommt es zu einer Unterdrückung des Smad-Signalwegs und somit zu einer fehlenden Wachstumsinhibition (Hocevar et al., 2001; Kaji et al., 2001). Auch

verschiedene Onkoproteine, wie p53, Myc, E1A, Ras, Ski/SnoN und Evi unterdrücken den TGF β -Signalweg (Alexandrow et al., 1995; Ewen et al., 1995; Datto et al., 1997; Kurokawa et al., 1998; Kretzschmar et al., 1999; Stroschein et al., 1999; Sun et al., 1999). Meist geschieht diese Wachstumsunterdrückung über eine Interaktion mit Smad3, wodurch der Smad-Signalweg gestört ist, aber die Smad-unabhängigen Signalwege weiterhin funktionieren (Kurokawa et al., 1998; Sun et al., 1999). Dies wiederum entspricht, wie schon unter 5.2.1. beschrieben, auch der Hypothese von Lu et al. (2004) die feststellten, dass es für den Tumor „nützlich“ ist, einige TGF β 2-Effekte zu unterdrücken, aber andere zum eigenen Vorteil zu erhalten. Reduzierter Zell-Zell-Kontakt, gesteigerte Zellbeweglichkeit, Invasion von umliegendem Gewebe und Resistenz gegenüber Tumorsuppressoreffekten, wie Apoptose, erhöhen die Möglichkeit der Metastasierung von Prostatakarzinomen (Elliott & Blobel, 2005).

Yin et al. (1999) stellten fest, dass während der Metastasierung von Brustkrebs in das Skelett TGF β 1 und die TGF β -Rezeptoren Typ I und Typ II eine entscheidende Rolle spielen. Nach der „seed and soil“-These von Paget, 1889, metastasieren Tumore an Orte des Körpers, an denen sie die besten Wachstumsbedingungen vorfinden. Diese guten „Umwelt“-Bedingungen finden Prostatakarzinomzellen vor allem am Ende der langen Knochen und an den Wirbeln, an denen eine größere Umbaurate als an kortikalem Knochen vorherrscht. Diese metabolische Aktivität wird durch eine hohe Osteoklastentätigkeit hervorgerufen, die wiederum durch TGF β 2 positiv beeinflusst wird. Die Osteoklasten bereiten also den von Paget benannten „Boden“, hier den metabolisch aktiven Knochen, durch ihre Knochenresorption vor und setzen dabei Cytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine frei, die den Knochen attraktiv für die Prostatakarzinomzellen machen (Roodman, 2004; Bussard et al., 2008;). Kostenuik et al. (1996) fanden heraus, dass TGF β die Adhäsion von Prostatazellen an die extrazelluläre Matrix von Knochen stimuliert. Diese Anheftung scheint durch die Co-Expression von TGF β und Kollagen Typ I den Karzinomzellen erleichtert zu werden, so dass ihr Vorkommen mit dem Anstieg dieser beiden Faktoren im Skellet zunimmt. Anscheinend unterstützt das durch osteoklastische Aktivität an der Knochenmatrix freigesetzte TGF β 2 das Wachstum der Metastasen (Yin et al., 1999). Während Knochenmetastasen vom Brustkrebs hauptsächlich assoziiert sind mit verstärkter Knochenresorption, herrscht bei Knochenmetastasen vom Prostatakarzinom die Knochenneubildung vor. Der Hauptunterschied zwischen

diesen Metastasen ist die Fähigkeit der Prostatakarzinomzellen am Knochen PSA zu bilden, welches nur TGF β 2, jedoch nicht TGF β 1 oder TGF β 3, aktivieren kann (Dallas et al., 2005). Centrella et al. (1994) wiesen nach, dass TGF β 2 in Fernmetastasen im Knochen die Differenzierung der Osteoprogenitorzellen zu Osteoklasten inhibiert, so dass das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenneubildung gestört ist. In wie weit dieses freigesetzte TGF β 2 auch in das Blut freigesetzt wird und somit eine Veränderung der TGF β 2-Serumkonzentration herbeiführt, ist noch nicht geklärt. In dieser Studie sank bei Patienten mit Fernmetastasen die Serumkonzentration von TGF β 2. Was führte nun zu diesem plötzlichen Absinken der TGF β 2-Serumkonzentration? Alle bisher aufgeführten Trends und Korrelationen waren tumorabhängig. Der Trend zum TGF β 2-Anstieg im Serum hing von bestimmten Tumorparametern ab. Je weiter ausgebreitet und organüberschreitender der Tumor war, desto höher war die TGF β 2-Serumkonzentration. Der Abfall des TGF β 2-Wertes im Serum bei Fernmetastasen könnte zusätzlich auch vom Allgemeinzustand des Patienten abhängig sein. Je schlechter der Zustand des Patienten wird, was bei Fernmetastasen der Fall ist, desto schlechter werden auch alle seine Serumwerte, unter die dann auch TGF β 2 fällt. Somit wäre dieser Trend der TGF β 2-Serumkonzentration vielleicht durch eine „Zustandsabhängigkeit“ zu erklären.

5.2.4. Kann die TGF β 2-Serumkonzentration als Tumormarker verwendet werden?

In dieser Studie sollte auch getestet werden, in wie weit sich TGF β 2 als Serummarker eignet. PSA ist ein gut erforschter Serummarker zur Feststellung eines Prostatakarzinoms. Da festgestellt wurde, dass sich auch die TGF β 2-Serumkonzentration bei Prostatakarzinomen verändert, sollte in dieser Studie die Eignung als Marker getestet werden. Wie schon im Ergebnisteil beschrieben, hat die TGF β 2-Serumkonzentration unter verschiedenen Tumorparametern eine Tendenz zum Anstieg gezeigt. So wurde eine vermehrte Konzentration des Liganden bei einem größeren Primärtumor, Organüberschreitung des Tumors und Infiltration der urethralen Resektionskante gemessen. Bei der statistischen Auswertung der Werte ergab sich ein Anstieg der Konzentration, der jedoch nur Trends, aber keine Korrelationen aufzeigte. Die Konzentration des Liganden im Serum war allgemein sehr niedrig. Zwar ist der ELISA sehr genau in seinen Messwerten, doch ist es bei diesen niedrigen Konzentrationen schwierig, kleine Schwankungen zu erfassen. Außerdem wurden nur 76 Patientenproben untersucht. Vielleicht würden sich bei Erfassen von mehr Proben einige Korrelationen ergeben. In dieser Studie wurde auch versucht, den ELISA mit Blutplasma durchzuführen in der Hoffnung, dort stärkere Konzentrationen nachweisen zu können, doch die Versuchsdurchführung war aufgrund der Koagulation der Proben nicht möglich. Daraus folgt, dass TGF β 2 zurzeit nicht als standardisierter Tumormarker im Serum, ermittelt mit einem ELISA, verwendet werden kann. Bei so geringen Werten der Serumkonzentration kann man keine gesicherte Aussage über den Krankheitsverlauf oder Tumorzustand machen. Vielleicht würde eine sensitivere Methode, wie zum Beispiel die Immuno-PCR, eine genauere Messung der niedrigen Serumwerte und somit eine gesicherte Aussage über den Tumorzustand ermöglichen. Wie bereits unter 5.1.2. gesagt, zeichnet sich der ELISA als schnelle, einfache und kostengünstige Nachweismethode aus und bietet sich daher für Screening-Untersuchungen an. In wie weit die Immuno-PCR oder andere sensitivere Messverfahren diese Standards erfüllen, wäre Aufgabe einer weiteren Untersuchung.

6. Zusammenfassung

TGF β 2 ist ein Zytokin, das an den Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor Typ II entweder niedrig-affin direkt oder hoch-affin mittels Präsentation durch den TGF β -Rezeptor Typ III bindet. Durch diese Bindung aktiviert und rekrutiert der TGF β -Rezeptor Typ II den TGF β -Rezeptor Typ I und transphosphoryliert diesen, was wiederum zur Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Smads führt. So aktiviert also TGF β 2 den Smad-Signalweg und fördert im Zellkern die Expression von Zielgenen. In der humanen Prostata hemmt TGF β 2 das Zellwachstum, die Proliferation des Epithels und fördert oder hemmt die Apoptose. Da TGF β 2 jedoch normalerweise hauptsächlich tumorsupprimierende Effekte besitzt, ist es fraglich, wie es unter Einwirkung dieses Liganden zu einer Karzinogenese kommen kann. Da der TGF β -Rezeptor Typ II essentiell für die Signalübertragung ist, liegt die Vermutung nahe, dass an dieser Stelle das Signal unterbrochen ist. Zum Beispiel könnte eine verminderte Expression oder eine Mutation des Rezeptors zu dieser „nicht-Responsivität“ der Prostatakarzinomzellen führen.

In dieser Studie wurden der TGF β -Rezeptor Typ II immunhistochemisch an Prostatakarzinomschnitten angefärbt und die Intensität der Anfärbung unter Berücksichtigung verschiedener Tumorparameter ausgewertet. Außerdem wurde mit Hilfe eines ELISAs die Serumkonzentration von TGF β 2 bei Prostatakarzinom-Patienten gemessen. Auch diese Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung verschiedener Tumorparameter ausgewertet.

Die ELISAs und Anfärbungen ergaben einige Trends beziehungsweise Korrelationen. So stiegen die TGF β 2-Serumkonzentration und die Protein-Expression des TGF β -Rezeptors Typ II bei weiter ausgebreiteten, organüberschreitenden Tumoren und Infiltration der urethralen Resektionskante an. Bei metastasierten Tumoren stieg ebenfalls die Expression des Rezeptors an, bei Fernmetastasen jedoch sank die TGF β 2-Serumkonzentration. Das wachstumsinhibierende Signal von TGF β 2 wird also nicht durch eine sinkende Expression des TGF β -Rezeptors Typ II blockiert. Der fehlende TGF β 2-Effekt kann jedoch auch andere Ursachen haben. Zum Beispiel könnte die Signalübertragung mittels des Smad-Signalwegs unterbrochen sein. Es könnten entweder Proteine mit Smad2 oder Smad 3 reagieren, so dass diese nicht mehr in der Lage sind, das Signal weiterzugeben,

oder eine erhöhte Produktion des inhibitorischen Smad7 könnte zu einer weitgehenden Inhibition der Signalübertragung führen. Durch Aktivierung anderer Signalwege und Umgehung des Smad-Signalweges ist TGF β 2 sogar in der Lage, wachstumsfördernd zu wirken. Der Anstieg der TGF β 2-Serumkonzentration bei gleichzeitiger Zunahme der Ausbreitung des Tumors könnte also eine mögliche Ursache für die Zunahme der Tumorausbreitung durch Steigerung der Proliferation und Senkung der Apoptose sein. Da ein weiterer TGF β 2-Effekt die Herabsetzung der Zelladhäsion und Steigerung der Zellbeweglichkeit ist, könnte es somit die Aggressivität und Invasivität der Prostatakarzinome fördern. Fraglich ist nur, warum die TGF β 2-Serumkonzentration bei Fernmetastasen sinkt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Trends zum Anstieg der Konzentration von TGF β 2 im Serum bei aggressiveren und organüberschreitenden Karzinomen tumorabhängig sind und der Trend zum Abfall bei Prostatakarzinomen mit Fernmetastasen vielleicht dem Allgemeinzustand des Patienten zuzuschreiben ist. Je schlechter der Allgemeinzustand des Patienten wurde, desto mehr sanken alle seine Serumwerte. Die Frage, ob man die mittels ELISA gemessene TGF β 2-Serumkonzentration als Tumormarker neben dem PSA verwenden kann, wurde verneint. Da die Konzentrationen sich nur in sehr geringen Werten unterscheiden, würde die Verwendung von TGF β 2 als Tumormarker zu viele Diagnosefehler erwarten lassen. In dieser Studie ergaben sich zwar keine Korrelationen, jedoch einige Trends, die vielleicht mit sensitiveren Methoden zur Bestimmung von TGF β 2 im Serum, wie zum Beispiel einer Immuno-PCR, und einer größeren Anzahl von Proben verifiziert werden und somit TGF β 2 doch noch als Tumormarker etablieren könnten.

7. Literaturverzeichnis

Alexandrow MG, Kawabata M, Aakre M (1995) Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of the transforming growth factor beta 1. Proc Natl Acad Sci USA 92: 3239-3243.

Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D (2004) TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. Science 2004, 303: 848-851.

Böcker W, Denk H, Heitz U (Hrsg) (2001) Das Prostatakarzinom. Pathologie, 2: 836-838. Urban und Fischer, München Jena.

Boenisch T (Hrsg), Farmile AJ, Stead RH, Key M, Welcher R, Harvey R, Atwood KN (2003) Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. DakoCytomation GmbH, Hamburg.

Böttinger EP, Letterio JJ, Roberts AB (1997) Biology of TGF β in knockout and transgenic mouse models. Kidney Int, 51: 1355-1360.

Bucher O, Wartenberg H (Hrsg) (1997) Die Prostata. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 12: 362. Verlag Hans Huber.

Brodin G, ten Dijke P, Funa K (1999) Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. Cancer Res, 59: 2731-2738.

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ (1992) Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. JAMA 267: 2215-2220.

Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL (1994) Transforming growth factor- β gene family members and bone. Endocr Rev 15: 27-39.

Dallas SL, Zhao S, Cramer SD, Chen Z, Peehl DM, Bonewald LF (2005) Preferential production of latent transforming growth factor β -2 by primary prostatic epithelial cells and its activation by prostate-specific antigen. *J Cell Physiol* , 202: 361-370.

Danielpour D (2005) Functions and regulation of transforming growth factor beta in the prostate. *Eur J Cancer*, 41: 846-857.

Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR (1992) Crystal structure of transforming growth factor- β 2: an unusual fold for the superfamily. *Science*, 257: 369-373.

Datto MB, Hu PP, Kowalik TF (1997) The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* 17: 2030-2037.

Denmeade SR, Isaacs JT (2004) The role of prostate-specific antigen in the clinical evaluation of prostatic disease. *BJU Int* 93: 10-15.

Desruisseau S, Ghazarossian-Ragni E, Chinot O, Martin PM (1996) Divergent effect of TGFbeta 1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. *Int J Cancer*, 66: 796-801.

Diebold RJ, Eis MJ, Yin M, Ormsby I, Boivin GP, Darrow BJ, Saffitz JE, Doetschman T (1995) Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor β 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 92: 12215-12219.

DiGiovanni J, Kiguchi K, Frijhoff A (2000) Deregulated expression of insulin-like growth 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3455-3460.

Djavan B, Zlotta A, Kratzig C, Remzi M, Seitz C, Schulman CC, Marberger M (1999) PSA, PSA density, PSA density of transition zone, free/total PSA ratio, and PSA velocity for early detection of prostate cancer in men with serum PSA 2.5 to 4.0 ng/mL. *Urology* 54: 517-522.

Edlund S, Lee SY, Grimsby S, Zhang S, Aspenström P, Heldin CH, Landström M (2005) Interaction between Smad7 and beta-catenin: importance for transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 25: 1475-1488.

Eklöv S, Funa K, Nordgren H, Olofsson A, Kanzaki T, Miyazono K, Nilsson S (1993) Lack of latent transforming growth factor β binding protein in malignant, but not benign prostatic tissue. *Cancer Res*, 53: 3193-3197.

Elliot RL, Blobe GC (2005) Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol*, 23: 2078-2093.

Engvall E, Jonsson K, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated assay. *Biochim Biophys Acta* 251: 427-434.

Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB (1994) Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA* 271: 368-374.

Esparza-Lopez J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, Lopez-Casillas F (2001) Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem*, 276:14588-96.

Ewen ME, Oliver CJ, Sluss HK (1995) p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. *Genes Dev* 9: 204-217.

Franke M, Kreutzig T (Hrsg) (2001) PSA- Prostata spezifisches Antigen: ein Leitfaden zur Interpretation. Dr Thomas Kreutzig Verlag, Schallstadt.

Gerdes MJ, Larsen M, McBride L, Dang TD, Lu B, Rowley DR (1998) Localization of transforming growth factor β 1 and type II receptor in developing normal human prostate and carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem*, 46: 379-388.

Giannelli G, Fransvea E, Marinosci F, Bergamini C, Colucci S, Schiraldi O, Antonaci S (2002) Transforming growth factor β 1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via α 3 β 1 integrin. *Am J Pathol*, 161: 183-193.

Gleason DF (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother*, 50: 125-130.

Gleason DF (1992) Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*, 23: 273-279.

Hahn SA, Schutte M, Hoque AT (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353.

Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 274: 27161-27167.

Hautmann R, Huland H (Hrsg) (2000) Prostatakarzinom. *Urologie*, 2: 237-254. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Helpap B, Rübber H (Hrsg) (1998) Das Prostatakarzinom, 2: 3-155. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Hiddemann W (Hrsg), Huber H, Bartram CR (2004) Die Onkologie Teil 2: 1239-1241. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Hocevar BA, Brown TL, Howe PH (1999) TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* 18: 1345-1356.

Hocevar BA, Smine A, Xu XX (2001) The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *Embo J* 20: 2789-2801.

Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J (1995) Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- β 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet*, 11: 415-421.

Kaji H, Canaff L, Lebrun JJ (2001) Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3837-3842.

Kim IY, Ahn HJ, Zelner DJ, Shaw JW, Lang S, Kato M, Oefelein MG, Miyazono K, Nemeth JA, Kozlowski JM, Lee C (1996) Loss of expression of transforming growth factor β type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Clin Cancer Res*, 2: 1255-1261.

Kostenuik PJ, Sanchez-Sweatman O, Orr FW, Singh G (1996) Bone cell matrix promotes the adhesion of human prostatic carcinoma cells via the alpha 2 beta 1 integrin. *Clin Exp Metastasis* 14: 19-26.

Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/Smad signalling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13: 804-816.

Kulkarni AB, Karlsson S (1993) Transforming growth factor- β 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol*, 143: 3-9.

Kundu SD, Kim IY, Yang T (2000) Absence of proximal duct apoptosis in the vertical prostate of transgenic mice carrying the C3 (1)-TGF-beta type II dominant negative receptor. *Prostate* 2000, 43: 118-124.

Kurokawa M, Mitani K, Irie K (1998) The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature* 394: 92-96.

Kyprianou N, Isaacs JT (1988) Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology*, 122: 552-562.

Kyprianou N, Isaacs JT (1988) Identification of a cellular receptor for transforming growth factor-beta in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology*, 123: 2124-2131.

Landstrom M, Heldin NE, Bu S, Hermansson A, Hoh S, ten Dijke P, Heldin CH (2000) Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor beta in prostatic carcinoma cells. *Curr Biol* 10: 535-538.

Leitlein J, Aulwurm S, Waltereit R, Naumann U, Wagenknecht B, Garten W, Weller M, Platten M (2001) Processing of immunosuppressive pro-TGF-beta 1,2 by human glioblastoma cells involves cytoplasmic and secreted furin-like proteases. *J Immunol* 166: 7238-7243.

Lu T, Burdelya LG, Swiatkowski SM, Boiko AD, Howe PH, Stark GR, Gudkov AV (2004) Secreted transforming growth factor β 2 activates NF- κ B, blocks apoptosis, and is essential for the survival of some tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 7112-7117.

Lucia MS, Sporn MB, Roberts AB (1998) The role of transforming growth factor-beta1, -beta2 and -beta3 in androgenresponsive growth of NRP-152 rat prostatic epithelial cells. *J Cell Physiol* 175: 184-192.

Massague J, Chen YG (2000) Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev*, 14: 627-644.

MacGrogan D, Pegram M, Slamon D, Bookstein R (1997) Comparative mutational analysis of DPC4 (Smad4) in prostatic and colorectal carcinomas. *Oncogene* 15: 1111-1114.

McNeal JE (1981) The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2: 51-70.

Miettinen OJ, Ebner R, Lopez AR (1994) TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127: 2021-2036.

Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH (1991) A role of the latent TGF- β 1 binding protein in the assembly and secretion of TGF- β 1. *EMBO J*, 10: 1091-1101.

Müller HP (Hrsg) (2001) Immunologische Methoden, der Enzymimmunassay. *Parodontologie*, 1: 101-103. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York .

Netter FH (Hrsg)(1995) Atlas der Anatomie des Menschen, 2: 362. Novartis, Basel East Hanover, NJ.

Noll S, Schaub-Kuhnen S, Höfler H (Hrsg), Müller KM (Hrsg) (2000) Praxis der Immunhistochemie, 1: 13-20. Urban & Fischer Verlag, München Jena

O'Connor-McCourt MD, Wakefield LM (1987) Transforming growth factor-beta in serum. A specific complex with alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem*, 262: 14090-14099.

Paget S (1889) The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Cancer and Metastasis Reviews*, 8: 98-101.

Perry KT, Anthony CT, Case T, Steiner MS (1997a) Transforming growth factor beta as a clinical biomarker for prostate cancer. *Urology*, 49: 151-155.

Perry KT, Anthony CT, Steiner MS (1997b) Immunohistochemical localization of TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3 in normal and malignant human prostate. *Prostate*, 33: 133-140.

Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T (1995) Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet*, 11: 409-414.

Riede UN, Werner M, Schäfer HE (Hrsg) (2004) Neoplastische Läsionen. *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 5: 933-935. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.

Roberts AB, Sporn MB (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF β). *Growth Factors*, 8: 1-9.

Romeis B, Böck P (Hrsg), Denk H, Künzle H, Plenk H, Rüschoff J, Sellner W (1989) *Mikroskopische Technik*, 17: 213-229. Urban & Schwarzenberg Verlag, München.

Roodman GD (2004) Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med*, 350: 1655-1664.

Rotzer D, Roth M, Lutz M, Lindemann D, Sebald W, Knaus P (2001) Type III TGF β receptor-independent signalling of TGF β 2 via T β RII-B, an alternatively spliced TGF β type II receptor. *EMBO J*, 20: 480-490.

Royela M, de Miguel MP, Bethencourt FR, Sanchez-Chapado M, Fraile B, Paniagua R (1998) Transforming growth factor β 1 and its receptor type I and II. Comparison in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Growth Factors*, 16: 101-110.

Sanford LP, Ormsby I, de Gitterberger GA, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T (1997) TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development*, 124: 2659-2670.

Schumacher M, Burkhard FC, Studer UE (2005) Stellenwert der pelvinen Lymphadenektomie beim klinisch lokalisierten Prostatakarzinom. *Urologie A*, 44: 645-651.

Shariat SF, Shalev M, Menesses-Diaz A, Kim IY, Kattan MW, Wheeler TM, Slawin KM (2001) Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 19: 2856-2864.

Shariat SF, Menesses-Diaz A, Kim IY, Muramoto M, Wheeler TM, Slawin KM (2004a) Tissue expression of transforming growth factor-beta1 and its receptors: correlation

with pathologic features and biochemical progression in patients undergoing radical prostatectomy. *Urology* 63: 1191-1197.

Shariat SF, Kattan MW, Traxel E, Andrews B, Zhu K, Wheeler TM, Slawin KM (2004b) Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor β 1 and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 10: 1992-1999.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359: 693-699.

Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113: 685-700.

Song K, Krebs TL, Danielpour D (2006) Novel permissive role of epidermal growth factor in transforming growth factor β signalling and growth suppression. *J Biol Chem* 281: 7765-7774.

Stattin P, Bylund A, Rinaldi S (2000) Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 92: 1910-1917.

Stroschein SL, Wang W, Zhou S (1999) Negative feedback regulation of TGF-beta signalling by SnoN oncoprotein. *Science* 286: 771-774.

Sun Y, Liu X, Eaton EN (1999) Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signalling. *Mol Cell* 4: 499-509.

Tang B, de Castro K, Barnes HE, Parks WT, Stewart L, Böttinger EP, Danielpour D, Wakefield LM (1999) Loss of responsiveness to transforming growth factor β induces malignant transformation of nontumorigenic rat prostate epithelial cells. *Clin Cancer Res*, 59: 4834-4842.

Webb DJ, Wen J, Karns LR, Kurilla MG, Gonias SL (1998) Localization of binding site for transforming growth factor β in human α 2-macroglobulin to a 20-kDa peptide that also contains the bait region. *J Biol Chem* 273: 13339-13346.

Wikström P, Stattin P, Franck-Lissbrant I, Damber JE, Bergh A (1998) Transforming growth factor β 1 is associated with angiogenesis, metastasis and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate*, 37: 19-29.

Wikström P, Bergh A, Damber JE (1999) Transforming growth factor β 1 and prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol*, 34: 85-94.

Williams RH, Stapleton AMF, Yang G, Truong LD, Rogers E, Timme TL, Wheeler TM, Scardino PT, Thompson TC (1996) Reduced levels of transforming growth factor β receptor type II in human prostate cancer: an immunohistochemical study. *Clin Cancer Res*, 2: 635-640.

Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague J, Mundy GR, Guise TA (1999) TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103: 197-206.

Zhang Q, Rubenstein JN, Jang TL, Pins M, Javonovic B, Yang X, Kim SJ, Park I, Lee C (2005) Insensitivity to transforming growth factor- β results from promoter methylation of cognate receptors in human prostate cancer cells (LNCaP). *Mol Endocrinol* 19: 2390-2399.

Zicha D, Gernot E, Dunn GA, Kramer IM (1999) TGF-beta1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells. *J Cell Sci* 112: 447-454.

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

A	Adenosin
AK	Antikörper
AMH	Anti-Mullerian hormone
AP-1/AP-2	Aktivator-Protein-1/-2
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	Bone morphogenetic protein
BPH	benigne Prostatahyperplasie
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
DAB	Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DN-RII	dominant-negativer Rezeptor RII
E1A	adenovirales Onkoprotein; „early region 1A“
ECM	extra cellular matrix, Extrazellulärmatrix
ELISA	Enzymimmunoassay
EMT	epithelial to mesenchymal transition
et al.	und andere
Evi	Onkoprotein; „ecotropic virus integration“
FGF	Fibroblast growth factor
g	Gramm
G	Guanosin
GDF	Growth differentiation factor
h	human, Mensch
HCl	Salzsäure

HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	hydroxyethyl-piperazineethanesulfonic acid
H ₂ O	Wasser
Hrsg	Herausgeber
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IL	Interleukin
I-Smad	inhibitorisches Smad
k	Kilo = 1000
l	Liter
LNCaP	lymph node carcinoma of the prostate
m	Milli = 1/1000
M	molar
μ	Mikro = 1/1000000
MAPK	mitogen-activated-protein-Kinase
Max	Maximalwert
Med	Medium, Mittelwert
min	Minute(n)
Min	Minimalwert
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
μm	mikrometer
MW	Mittelwert
Myc	Protoonkogen, Transkriptionsfaktor
n	Probenanzahl
N	normal, 1molar

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NF- κ B	nuclear-factor- κ B
ng	nanogramm
Nr	Nummer
NRP	preneoplastische prostatistische Zelllinie
p53	Tumorsuppressorprotein mit einer Molekülmasse von 53kDa
PBS	phosphate buffered saline, Natriumphosphat-Puffer
PC3	Prostatakarzinom-3-Zelllinie
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
pH	pondus/potentia hydrogenii, negativ dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
PSA	Prostataspezifisches Antigen
P-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Irrtumswahrscheinlichkeit
Ras	„rat sarcoma“, Proto-Onkogen
R-Smad	rezeptorassoziiertes Smad
s	Sekunde(n)
SEM	standard error of the mean, Standardabweichung
Ski	Onkoprotein; „sloan-kettering avian retrovirus“
Smad	Zusammengesetzt aus „mother against decapentaplegic“ (MAD) und „small body size“ (SMA)
SnoN	Onkoprotein, „ski-related novel gene“
T	Thymidin
TATA	Goldberg-Hogness-Box
TBS	Tris buffered saline
TGF α	Transforming growth factor alpha

TGFβ	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrose factor
TNM	Tumorgröße, Noduläre Ausbreitung, Metastasen
TβRI	TGFβ-Rezeptor Typ I
TβRII	TGFβ-Rezeptor Typ II
TβRIII	TGFβ-Rezeptor Typ III
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
URK	urethrale Resektionskante
xg	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)

8.2. Tabellen

Tab. 10a: Auflistung der Immunhistochemischen Anfärbung des TGF β -Rezeptors TypII und der untersuchten Tumorparameter

Patient Nr.	TGF β RII	PSA	pT	N	Gleason	Samenblasen-Befall	Urethrale Absetzungs-ränder	Periprosta-tisches Fett- und Weichteilge-webe
1	-	43,8	3b	1	8-10	1-links	0	1
2	-	4	3a	0	5-7	0	0	1
3	-	6	3a	0	3	0	0	0
4	+	23	3a	0	5-7	0	0	0
5	+	64	3a	0	5-7	0	0	0
6	+	8	3a	0	5-7	0	0	0
7	+	16	2b	0	5-7	0	0	0
8	+	8	3a	0	5-7	0	1	0
9	+	48	3b	0	8-10	1-beidseitig	0	0
10	+	12	2b	0	5-7	0	0	0
11	+	24	3b	1	8-10	1-beidseitig	1	1
12	+	40,7	2b	0	8-10	0	0	1
13	+	19	3b	0	5-7	1-rechts	0	1
14	+	14	3b	0	5-7	1-beidseitig	0	0
15	+	3,5	3b	0	2-4	1-rechts	0	0
16	+	24	4	0	8-10	?	0	1
17	+	55,3	3b	1	8-10	1-beidseitig	1	1
18	+	7	3a	0	5-7	0	0	0
19	+	48	4	0	8-10	1-beidseitig	1	0
20	+	9	3b	0	8-10	1-beidseitig	1	1
21	+	22	3b	1	8-10	1-beidseitig	1	1
22	+	29,9	3b	1	8-10	1-links	0	1
23	+	45	3b	0	8-10	1-links	0	0
24	++	10,8	4	0	5-7	0	0	0
25	++	5	2b	0	1	0	0	0
26	++	17	2b	0	2-4	0	0	0
27	++	38	2b	0	8-10	0	1	0
28	++	37	3a	0	8-10	0	1	0
29	++	7	3a	0	5-7	0	0	0
30	++	16	3a	0	5-7	0	1	0
31	++	17	2b	0	5-7	0	1	0
32	++	61	3b	0	5-7	1-beidseitig	1	0
33	++	90	3b	1	8-10	1-links	0	1
34	++	42,3	3b	1	8-10	1-beidseitig	1	0
35	++	10	3b	1	8-10	1-links	0	0
36	++	19	4	1	8-10	1-beidseitig	1	1
37	++	14	3a	1	2-4	0	1	0
38	++	42	3a	0	5-7	0	1	0
39	++	4	3b	0	8-10	1-beidseitig	1	0
40	++	18,6	3b	1	8-10	1-beidseitig	1	1
41	++	52,62	3b	0	3	1-beidseitig	0	0
42	++	7	3b	1	8-10	1-rechts	1	0
43	++	11	3b	0	8-10	1-beidseitig	1	0

44	++	23	3b	0	8-10	1-beidseitig	0	0
45	++	112	3b	0	8-10	1-links	1	0
46	++	11	2b	1	8-10	0	0	0
47	++	55	3b	1	8-10	1-beidseitig	0	1
48	++	42	3b	1	8-10	1-links	0	1
49	++	19,1	3b	1	8-10	1-beidseitig	1	0
50	+++	12,7	3a	0	8-10	0	1	0
51	+++	25	3a	0	5-7	0	1	0
52	+++	6	2b	0	5-7	0	0	0
53	+++	43,7	3a	0	8-10	0	0	0
54	+++	5,2	3a	1	5-7	0	0	1
55	+++	11	3b	1	8-10	1-beidseitig	1	0
56	+++	28	3b	0	8-10	1-beidseitig	1	1
57	+++	8,6	3b	1	8-10	1-links	1	0
58	+++	6,7	3a	0	8-10	0	1	0

Nr.=Nummer; -=gar nicht angefärbt; +=leicht, kaum erkennbar angefärbt; ++=angefärbt; +++=stark angefärbt; 0=negativ (kein Befall); 1=positiv (Befall vorhanden)

Tab. 10b: Auflistung der Immunhistochemischen Anfärbung des TGF β -Rezeptors TypII und der untersuchten Tumorparameter

Patient Nr.	TGF β RII	Befall des Ductus deferenz	Befall der Neuralscheiden	Vaskulärer Befall	Metastasen	Rezidiv
1	-	0	0	0	0	0
2	-	0	1	0	0	0
3	-	0	0	0	0	0
4	+	0	1	0	0	0
5	+	0	0	0	0	0
6	+	0	0	0	0	0
7	+	0	1	0	1	0
8	+	0	1	0	0	0
9	+	0	1	0	0	0
10	+	0	0	0	0	0
11	+	1	0	0	0	0
12	+	0	0	0	0	0
13	+	0	1	0	0	0
14	+	0	1	0	0	0
15	+	0	0	1	1	1
16	+	?	1	1	0	0
17	+	0	1	0	1	1
18	+	0	1	0	0	0
19	+	0	1	0	1	0
20	+	0	0	0	?	0
21	+	0	0	0	1	?
22	+	0	0	0	0	?
23	+	0	0	0	0	1
24	++	1	0	0	0	0
25	++	0	1	0	0	0

26	++	0	1	0	0	0
27	++	0	0	0	1	0
28	++	0	0	0	0	0
29	++	0	0	0	0	1
30	++	0	0	0	0	0
31	++	1	0	0	0	0
32	++	1	0	0	?	0
33	++	1	1	0	1	0
34	++	0	0	1	1	0
35	++	0	0	0	0	0
36	++	0	1	0	0	1
37	++	0	0	0	0	0
38	++	0	0	0	?	0
39	++	0	0	1	0	0
40	++	0	1	0	0	?
41	++	0	0	0	0	0
42	++	1	0	0	0	0
43	++	0	0	0	1	0
44	++	1	0	0	1	0
45	++	1	0	0	0	0
46	++	1	0	1	1	1
47	++	0	1	0	0	0
48	++	0	1	0	0	1
49	++	0	1	0	?	0
50	+++	0	1	0	0	0
51	+++	0	1	0	?	?
52	+++	0	0	0	0	0
53	+++	0	0	0	1	?
54	+++	0	1	1	1	0
55	+++	0	1	0	1	1
56	+++	0	0	0	?	1
57	+++	0	0	1	1	1
58	+++	?	1	1	?	?

Nr.=Nummer; -=gar nicht angefärbt; +=leicht, kaum erkennbar angefärbt; ++=angefärbt; +++=stark angefärbt; 0=negativ (kein Befall/ Metastase/ Rezidiv); 1=positiv (Befall/ Metastase/ Rezidiv vorhanden)

8.4. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren/-innen und Dozenten/-innen:

Aumüller, Austermann, Dibbets, Dobbelsstein, Feek, Feuser, Flores de Jacoby, Folz, Gente, Gudermann, Hellinger, Höffken, Lammel, Lehmann, Loeffler, Lotzmann, Kern, König, Koolmann, Mengel, Mittag, Pieper, Radsak, Ramaswamy, Röhm, Seitz, Stachniss, Stoll, Sundermeyer, Pieper, Umstadt, Wagner, Weihe.

8.5. Danksagung

Herrn PD DR. L. Konrad gilt mein ganz besonderer Dank, zum einen für die Bereitstellung des Themas und die intensive Betreuung meiner Arbeit (ich weiß, dass ich auch per E-Mail ganz schön anstrengend werden kann), zum anderen für sein unermüdliches Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift.

Für die schnelle pathologische Einstufung meiner Patientenproben möchte ich den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danken.

Frau Brand und Frau Nottelmann danke ich für ihre herzliche und freundschaftliche Betreuung während des experimentellen Teils meiner Arbeit und für die Einführung in die erforderlichen Arbeitstechniken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. R. Hofmann, dass es mir möglich war, an seiner Klinik zu promovieren und mir die Daten seiner Patienten zur Verfügung gestellt wurden.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor und die nette Hilfe bei der Zusammenstellung aller notwendigen Materialien.

Vielen Dank auch an Frau Wittkowsky, die administrativ das „Durcheinander“ gemanagt hat und mit ihren fast schon persönlichen E-Mails mir ein wenig die Prüfungsangst genommen hat.

Für das unermüdliche Anspornen während der langen Promotionszeit danke ich meinen Freunden und Kollegen, besonders allen Mitarbeitern der Praxis Dr. Schleinitz, Herrn und Frau Olma und Frau Heierberg.

Für die vielen fachlichen aber auch un-fachlichen Diskussionen in unserer zweiten Heimat, dem Kaffeautomaten-Bereich, möchte ich ganz herzlich Herrn Müller-Rau danken. Das Studium, das Examen und auch diese Arbeit hätte ich ohne seine Unterstützung niemals in diesem Rahmen geschafft.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinen lieben Eltern und meinem Bruder für die beständige, zuversichtliche und finanzielle Unterstützung, die Ermöglichung des Studiums und natürlich das häufige suchen nach Rechtschreib- und Grammatikfehlern zukommen lassen. Sie haben so viele Anrufe aus Panik oder „ich wollt einfach mal reden“ entgegengenommen, dass sich die Telekom an uns bestimmt eine goldene Nase verdient hat und wir manchmal schon nicht mehr sagen konnten, das wievielte Mal wir an diesem Tag miteinander telefonieren. Für diese 24-Stunden-Bereitschaft kann ich mich gar nicht genug bedanken.

„Last but not least“ möchte ich mich bei meinem Mann T. Schmitt bedanken, der mir häufig während des Studiums, während meiner Assistenzzeit und auch während des Endspurts dieser Arbeit den Rücken freigehalten, unseren Sohn bespielt und am Ende für die Disputation fleißig alles über das Prostatakarzinom gelernt hat.

All diese Personen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

8.6. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Nachweis von Transforming growth factor (TGF) -beta2 und TGF-beta2 Rezeptor beim humanen Prostata-Karzinom

in der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Zentrums für Operative Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. R. Hofmann

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Kelkheim, den 16.04.2008

Christina Schmitt