

Ilka Prowatke

Identifikation molekularer Marker des Prostatakarzinoms
unter Verwendung der Gewebe-Mikroarray-Technologie

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Ilka Prowatke, geb. Bruch
aus Unna

Tag der mündlichen Prüfung: 31.1.08

Thema

Identifikation molekularer Marker des Prostatakarzinoms
unter Verwendung der Gewebe-Mikroarray-Technologie

Gutachter:

Prof. Dr. Werner Buselmaier

Prof. Dr. Peter Lichter

meiner Familie

Der Gelehrte studiert die Natur nicht, weil das etwas Nützliches ist. Er studiert sie, weil er daran Freude hat, und er hat Freude daran, weil sie so schön ist. Wenn die Natur nicht so schön wäre, so wäre es nicht der Mühe wert, sie kennen zu lernen, und das Leben wäre nicht wert, gelebt zu werden.

Henri Poincaré (1854-1912)

Die Wissenschaft ist ein Dschungel. Man schwingt sich von Ast zu Ast und weiß, dass überall Geheimnisse versteckt sind, die nur darauf warten, entdeckt zu werden.

Christofer Smith (2007)

INHALTSVERZEICHNIS:

Zusammenfassung	4
Abstract	5
1 Einleitung	9
1.1 Epidemiologie, Pathologie, Diagnose und Therapie des Prostatakarzinoms	10
1.1.1 Epidemiologie	10
1.1.2 Anatomie der Prostata	11
1.1.3 Pathologie der Prostata	12
1.1.4 Diagnose und Prognose	14
1.1.5 Therapie	15
1.2 Molekulare Grundlagen der Krebsentstehung und deren Bedeutung in Diagnose und Therapie	17
1.2.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene	17
1.2.2 Molekularbiologisch begründete Diagnose- und Therapieansätze	18
1.3 Molekulare Grundlagen des Prostatakarzinoms	19
1.3.1 Genetische Veränderungen beim Prostatakarzinom	20
1.3.1.1 Erblicher Prostatakrebs	20
1.3.1.2 Onkogene und Tumorsuppressorgene	20
1.3.1.3 Chromosomenaberrationen	23
1.3.2 Veränderung der Genexpression	27
1.3.3 Veränderung der Proteinexpression	28
1.3.4 Gewebe-Mikroarray Technologie	29
1.4 Ziele der Arbeit	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Patientenmaterial	33
2.1.2 Zelllinien	35
2.1.3 Zellkultur	35
2.1.4 Primer	36
2.1.4.1 Primer für RQ-PCR	36
2.1.5 Kits	36
2.1.6 Nukleotide und Fluorochrome	37
2.1.7 Antikörper	37
2.1.8 Chemikalien und Reagenzien	38
2.1.9 Geräte	39
2.1.10 Software	40

2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Herstellung von Gewebe-Mikroarrays.....	41
2.2.1.1	Konstruktion des Gewebe-Mikroarrays	41
2.2.1.2	Herstellen von Gewebe Chips	41
2.2.1.3	Silanisieren von Objektträgern.....	42
2.2.2	Analyse von Genom- und Transkriptom-Datensätzen.....	42
2.2.3	Immunhistochemie (IHC) Studie an Prostata-Gewebe-Mikroarrays.....	43
2.2.3.1	Immunhistochemie (IHC)	43
2.2.3.2	Auswertung der Antikörperfärbungen.....	47
2.2.3.3	Statistische Auswertung der IHC-Ergebnisse	47
2.2.4	Indirekte Immunfluoreszenz (IF).....	48
2.2.4.1	Indirekt Doppel-Immunfluoreszenz	48
2.2.4.2	Automatisierte quantitative Auswertung von Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen.....	49
2.2.4.3	Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der Immunfluoreszenzanalyse	50
2.2.5	Zellkultur	51
2.2.6	Proliferations-Assay.....	52
2.2.7	Real-time quantitative PCR (RQ-PCR)	52
2.2.7.1	RNA Präparation aus Kulturzellen.....	53
2.2.7.2	RNA Quantitäts- und Qualitätsbestimmung.....	53
2.2.7.3	Reverse Transkription (RT)	54
2.2.7.4	Real-time quantitative PCR (RQ-PCR).....	54
2.2.7.5	Statistische Auswertung der RQ-PCR-Ergebnisse.....	56
3	Ergebnisse	59
3.1	Identifikation von Kandidatengenomen durch einen Vergleich publizierter Genom- und Transkriptom-Veränderungen.....	59
3.2	Herstellung von Prostata-Gewebe-Mikroarrays.....	62
3.3	Immunhistochemische Analyse differentiell exprimierter Proteine in Prostatakarzinomen mittels Gewebe-Mikroarrays.....	62
3.3.1	Zelluläre und subzelluläre Lokalisation der untersuchten Protein-Kandidaten	63
3.3.2	Korrelationen der Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern	65
3.3.2.1	Univariate Analysen.....	65
3.3.2.2	Multivariate Analyse.....	68
3.4	Automatisierte Immunfluoreszenz-Analyse von Prostata-Gewebe-Mikroarrays.....	70
3.4.1	Methodenentwicklung.....	70
3.4.1.1	Test der digitalen Immunfluoreszenz-Analyse an Prostata-Gewebe-Mikroarrays.....	71
3.4.1.2	Immunfluoreszenz-Analyse von heterogenem Prostatagewebe unter Verwendung einer Kompartiment-spezifischen, digitalen Maske.....	73
3.4.2	Vergleich der automatisierten und der visuellen Auswertung von Immunfärbungen an Prostata-Gewebe-Mikroarrays am Beispiel von MYC	76
3.5	Untersuchung der β-Adrenergischen Rezeptor Kinase (BARK1) sowie der β-Adrenergischen Rezeptoren am Zellsystem.....	79
3.5.1	Wirkung von Stimulatoren und Inhibitoren der β -Adrenergischen Rezeptoren auf die Proliferation von Prostatazellen.....	82
3.5.2	Expressionsanalyse der Gene aus den Signaltransduktionswegen der β -Adrenergischen Rezeptoren	83
3.5.3	Änderung der Genexpression nach spezifischer Stimulation und Inhibition der β -Adrenergischen Rezeptoren.....	85

4	Diskussion.....	93
4.1	Identifikation von Kandidatengenomen durch den Vergleich publizierter Daten von Genom- und Transkriptom-Profilen	94
4.2	Immunhistochemische Analyse differentiell exprimierter Proteine in Prostatakarzinomen mittels Gewebe-Mikroarrays	95
4.3	Automatisierte Immunfluoreszenz-Analyse von Prostata-Gewebe-Mikroarrays	99
4.4	Untersuchung der β-Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 sowie der β-Adrenergischen Rezeptoren in Zelllinien.....	103
4.4.1	Untersuchung der Auswirkung von Stimulatoren und Hemmern der β -Adrenergischen Rezeptoren auf die Zellproliferation	103
4.4.2	Genexpression β -Adrenergischer Rezeptoren in Prostatazellen	104
4.4.3	Änderung der Expression der β -Adrenergischen Rezeptoren in Prostatazellen durch spezifische Agonisten und Antagonisten	107
5	Literaturverzeichnis	111
6	Anhang.....	119
6.1	Tabellen im Anhang.....	119
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	123
6.3	Publikationen.....	125
6.4	Danksagung.....	127
6.5	Eidesstattliche Erklärung.....	129

Zusammenfassung

Prostatakrebs ist die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern der westlichen Welt. Obwohl immer mehr Prostatakarzinome in frühen Stadien diagnostiziert werden, ist die Mortalitätsrate nicht entsprechend gesunken, da eine kurative Therapie fortgeschrittener, metastasierter Prostatakarzinome bisher nicht möglich ist. Die Aufklärung der biologischen Prozesse, welche an der Prostatakarzinogenese beteiligt sind, stellt die Grundlage zur Entwicklung neuer molekularer Marker und Therapeutika dar. Die Verwendung von Mikroarray-Technologien ermöglicht die Identifikation einer zunehmenden Anzahl an Kandidatengenen, deren Bedeutung für die Tumorprogression und Prognose z.B. mittels Gewebe-Mikroarrays an einem großen Tumorkollektiv validiert werden. In der vorliegenden Studie wurden Gewebe-Mikroarrays hergestellt, welche zur Untersuchung von Änderungen der Proteinexpression in unterschiedlichen Stadien der Progression des Prostatakarzinoms eingesetzt wurden.

Zur Identifikation neuer Kandidatengene wurden numerische chromosomale Veränderungen von 161 Prostatakarzinomen aus sieben Genomprofil-Studien systematisch mit den Ergebnissen von vier Expressionsprofil-Studien an 61 Prostatakarzinomen verglichen. Von der resultierenden Liste an Kandidatengenen wurden diejenigen der Kandidaten, für welche geeignete Antikörper verfügbar waren, mittels Immunhistochemie an einem Gewebe-Mikroarray mit 651 Gewebeproben von 175 Prostatakrebspatienten untersucht: Fettsäuresynthase (FASN), MYC, β -Adrenergische Rezeptor Kinase 1 (BARK1), die katalytischen Untereinheiten der Protein Phosphatasen PP1 α (PPP1CA) und PP2A (PPP2CB) sowie der Tumorsuppressor NM23-H1. In univariaten Analysen korrelierte die Immunfärbung von PP1 α mit dem pathologischen Parameter „Gleason Score“. Die Immunfärbung von MYC korrelierte in univariaten und multivariaten Analysen invers mit pT-Stadium und Gleason Score. Zudem war eine Untergruppe von Patienten mit hohen Gleason Scores durch den Verlust der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 (BARK1) charakterisiert. In dieser IHC-Studie wurden somit neue molekulare Marker von potentieller diagnostischer und therapeutischer Relevanz identifiziert.

Des Weiteren wurde die Bedeutung des in der IHC-Studie identifizierten Markers BARK1 bei der Progression des Prostatakarzinoms an Zelllinien analysiert (BPH-1, 22RV1, LNCaP, PC-3, DU145, HEK, Jurkat). BARK1 desensibilisiert spezifisch Agonist-gebundene β -Adrenergische Rezeptoren, sodass der bei fortgeschrittenen Tumoren beobachtete Verlust dieser Kinase zu einer verstärkten Signaltransduktion führen könnte. Eine Modulation der Signaltransduktion durch spezifische Agonisten (Isoproterenol, Terbutalin) und Antagonisten (ICI 118,551, ICI 89,406) beeinflusste zwar die Zellproliferation nicht. Die deutlich erhöhte Expression der β -Adrenergischen Rezeptor Gene (B1AR, B2AR) in Prostatazelllinien metastatischen Ursprungs (LNCaP, PC-3, DU145) sowie die durch Agonisten und Antagonisten hoch-regulierte Genexpression von B1AR und B2AR in den Zelllinien aus Fernmetastasen, PC-3 bzw. DU145, deuten jedoch auf eine Beteiligung der β -Adrenergischen Signaltransduktion an der Metastasierung hin. Ob β -Blocker die Metastasierung verhindern können, ist in weiteren Studien zu klären.

Zusammenfassend konnten in dieser Studie an Prostata-Gewebe-Mikroarrays neue molekulare Marker identifiziert werden. Einer dieser Marker, BARK1, könnte über die Regulation der β -Adrenergischen Rezeptoren an der Progression des Prostatakarzinoms involviert sein. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen den Vorschlag, in der Therapie von Prostatakarzinomen β -Blocker einzusetzen, um die Ausbildung von Metastasen zu hemmen.

Abstract

Prostate cancer is the second most frequent cause of cancer-related deaths in western countries. Although the incidence of early prostate carcinoma stages increased in recent years, this did not result in a respectively decreased mortality rate because a curative therapy of advanced, metastatic stages does not exist. Elucidation of the biologic processes involved in prostate carcinogenesis provides a basis for the development of novel molecular markers and therapies. By means of microarray technologies an increasing number of candidate genes has been identified. The relevance of these genes in tumour progression and prognosis is validated in large tumour collections e.g. by using tissue microarray technology. In this study tissue microarrays were generated to analyze changes in protein expression during the progression of prostate cancer.

To identify new candidate genes of diagnostic and therapeutic relevance, we performed an exhaustive gene search in seven previously described genomic profiling studies with 161 prostate tumours, and four expression profiling studies with 61 tumours. From the resulting list of candidate genes, six were selected for protein expression analysis based on the availability of antibodies applicable for paraffinized tissue: fatty acid synthase (FASN), MYC, β -adrenergic receptor kinase 1 (BARK1), the catalytic subunits of protein phosphatases PP1 α (PPP1CA) and PP2A (PPP2CB) and tumoursuppressor NM23-H1. These candidates were analysed by immunohistochemistry on a tissue microarray containing 651 cores of primary prostate cancer samples and benign prostatic hyperplasias from 175 patients. In univariate analysis, expression of PP1 α was found to strongly correlate with the pathological parameter "Gleason score". MYC immunostaining negatively correlated with both pT-stage and Gleason score in univariate and multivariate analysis. Furthermore, a subgroup of patients with high Gleason scores was characterized by a complete loss of BARK1 protein. In conclusion, this analysis revealed novel molecular markers of potential diagnostic and therapeutic relevance.

Finally the potential role of BARK1 in prostate cancer progression was further analyzed in cell lines (BPH-1, 22RV1, LNCaP, PC-3, DU145, HEK, Jurkat). BARK1 specifically desensitizes agonist-bound β -adrenergic receptors. Therefore, the loss of BARK1 which was observed in advanced tumours is likely to promote an enhanced signal transduction. Modulating the signal transduction intensity by specific agonists (isoproterenol, terbutaline) and antagonists (ICI 118,551, ICI 89,406) of the β -adrenergic receptors did not influence cell proliferation. However, expression of β -adrenergic receptor genes was found to be highly upregulated in all prostate cancer cell lines originating from metastases (LNCaP, PC-3, DU145). Furthermore, specific agonists and antagonists influenced β -adrenergic receptors by further increasing expression of β -adrenergic receptor genes B1AR and B2AR in PC-3 and DU145, the two cell lines originating from distant metastases. These findings indicate a role of β -adrenergic receptors in metastasis. If metastasis may be inhibited by β -blockers has to be elucidated in further studies.

In conclusion, the present analysis on tissue microarrays revealed novel molecular markers for prostate cancer progression. Of these, BARK1 might be involved in metastasis formation by regulating β -adrenergic receptors. These results support the notion to apply β -blockers in prostate cancer therapy in order to prevent metastasis.

1 Einleitung

Prostatakrebs ist die am häufigsten diagnostizierte nicht-kutane Neoplasie und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern in westlichen Ländern (Jemal et al., 2006). Die großflächig eingeführte Untersuchung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) in peripherem Blut ermöglicht zwar in vielen Fällen eine frühzeitige Entdeckung dieser Krankheit. Allerdings variiert die Aggressivität der Prostatakarzinome stark. Einige entwickeln sich sehr langsam und bleiben lebenslang latent. Für diese Patientengruppe bietet es sich an, den Tumor regelmäßig zu kontrollieren, aber nicht zu therapieren. Dieser Ansatz gewinnt insbesondere in Anbetracht des zunehmenden Alters der männlichen Bevölkerung und der damit einhergehenden Morbidität und Mortalität an Bedeutung (Steineck et al., 2002). Einige Prostatatumoren dagegen entwickeln sich zu einer invasiven, potentiell lebensbedrohlichen Krankheit. Etwa 30% der Männer mit Prostatakarzinom sterben an den im fortgeschrittenen Stadium auftretenden Metastasen. Welche Karzinome latent bleiben, gut auf eine Therapie ansprechen oder einen aggressiven Phänotyp entwickeln und welche Mechanismen diese Variabilität bewirken, ist weitgehend ungeklärt. Sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse scheinen eine Rolle zu spielen (Paris et al., 2003). Es ist daher notwendig, die genetischen Grundlagen der Prostatakrebsentwicklung sowie die Einflüsse aus der Umgebung der Tumorzellen aufzuklären. Dabei spielen Mikroarray Technologien als neue molekularbiologische Methoden eine entscheidende Rolle.

Im Folgenden werden nach einer kurzen Einführung zur Epidemiologie und Pathologie des Prostatakarzinoms zunächst die klassischen Diagnose- und Therapieverfahren angesprochen. Anschließend werden neue Methoden, insbesondere die Gewebe-Mikroarray Technologie und deren mögliche Bedeutung für die Aufklärung der Pathogenese des Prostatakarzinoms und die Entwicklung verbesserter Diagnose- und Therapieverfahren vorgestellt.

1.1 Epidemiologie, Pathologie, Diagnose und Therapie des Prostatakarzinoms

1.1.1 Epidemiologie

In westlichen Ländern ist Krebs für 23% der Todesfälle verantwortlich und stellt damit die häufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. Bei Männern zwischen 60 und 79 und Frauen zwischen 40 und 79 Jahren ist Krebs sogar die hauptsächliche Todesursache. Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an Krebs zu erkranken, ist bei Männern höher (46%) als bei Frauen (38%).

Die häufigsten Krebserkrankungen bei Männern sind Karzinome der Lunge und Bronchien, des Kolons und Rektums sowie der Prostata, bei Frauen Karzinome der Brust sowie ebenfalls Karzinome des Kolons und Rektums, der Lunge und der Bronchien. Diese Krebsarten machen die Hälfte aller krebsbedingten Todesursachen aus (Jemal et al., 2006).

Prostatakrebs ist die am häufigsten gestellte Krebsdiagnose bei Männern in westlichen Ländern. Das Alter bei Diagnosestellung beträgt im Mittel 71 Jahre. In Europa macht Prostatakrebs 1/5, in den USA 1/6 aller neugestellten Krebsdiagnosen aus (Ferlay et al., 2007; Jemal et al., 2006). Von den 1.701.800 im Jahr 2006 bei Männern in Europa neugestellten Krebsdiagnosen entfielen 345.900 auf Prostatakarzinome, 292.200 auf Lungen- und Bronchialkarzinome und 217.500 auf Kolon- und Rektumkarzinome. Mit 87.400 von 952.400 krebsbedingten Todesfällen steht Prostatakrebs bei europäischen Männern an dritter Stelle nach Lungen- und Bronchialkarzinomen (253.300 Todesfälle) sowie Kolon- und Rektumkarzinomen (217.500) (siehe Abb. 1). In Deutschland wurde im Jahr 2006 bei 451 von 100.000 Männern Krebs neu diagnostiziert, davon 113 Prostatakarzinome. 213 von 100.000 deutschen Männern erlagen einer krebsbedingten Todesursache, 21 davon starben an Prostatakrebs (Ferlay et al., 2007).

Die höchste krebsbedingte Mortalität (27%) wird zwar von Lungen- und Bronchialkarzinomen verursacht, könnte jedoch durch die Reduktion des Zigarettenkonsums deutlich vermindert werden. Bei Prostatakrebs scheint außer einer genetischen Prädisposition die Ernährung (Selen, Vitamin E, Phytoöstrogene, Antioxidantien) eine Rolle zu spielen. So liegt bei Japanern, welche im eigenen Land leben, eine 10x niedrigere Inzidenz für klinisch signifikante Prostatakarzinome vor als bei Japanern in westlichen Industrienationen (Schulz et al., 2003). Den wichtigsten Risikofaktor stellt bei Prostatakrebs jedoch das Alter dar. Im Jahr

2015 wird es in Europa 22% mehr Menschen geben, die über 65 Jahre alt sind, und >50% mehr, die über 80 Jahre alt sind (Boyle, Ferlay, 2005). Selbst wenn die Prostatakrebsraten pro Altersstufe konstant bleiben sollten, wird daher auf Grund der immer älter werdenden Bevölkerung die Anzahl der Prostatakrebsfälle zunehmen.

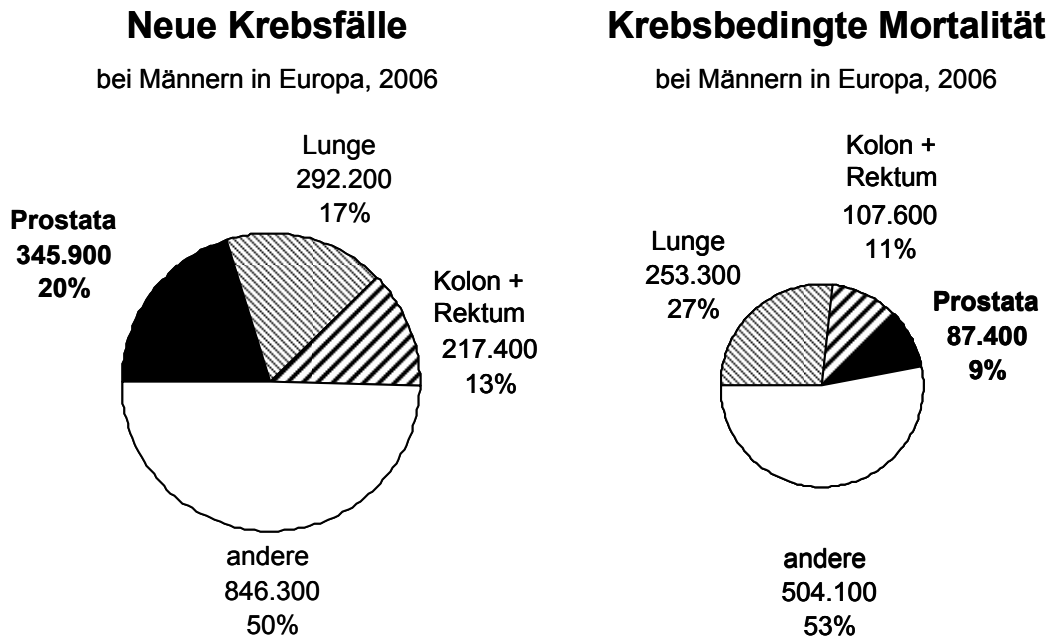


Abb. 1 Neue Krebsfälle und krebbsbedingte Sterbefälle für Männer in Europa und Deutschland (geschätzt für 2006). Daten aus (Ferlay et al., 2007).

1.1.2 Anatomie der Prostata

Die Prostata ist eine akzessorische Geschlechtsdrüse. Sie liegt unterhalb der Harnblase und umschließt den Anfangsteil der Harnröhre. Die Prostata gliedert sich in zentrale Zone, periphere Zone und Transitzone. Das walnussgroße, ca. 30g schwere Organ besteht aus 30-50 Drüsenläppchen, die von einem zweireihigem Drüsenepithel ausgekleidet sind und von Ausführungsgängen drainiert werden, die in die Harnröhre münden. Das gesunde Drüsenepithel besteht aus luminalen sekretorischen Zellen, die von einer Basalzell-Schicht (Basallamina) umschlossen werden, sowie aus wenigen neuroendokrinen Zellen. Luminale Zellen zeichnen sich durch die Expression von Prostataspezifischem Antigen (PSA) und Androgen-Rezeptoren (AR) aus. Basalzellen werden anhand der Expression bestimmter Cytokeratine (z. B. CK5) identifiziert. Vermutlich bilden Stammzellen in der Basallamina die Vorläufer dieser Zelltypen. Zwischen den Drüsen liegen glatte Muskelzellen sowie Bindegewebe. Eine Bindegewebskapsel umschließt die Prostata.

1.1.3 Pathologie der Prostata

Im Laufe des Lebens kommt es zunächst zu gutartigen Veränderungen der Prostata: bereits bei 80% aller Männer über 40 Jahren ist eine benigne Prostatahyperplasie (BPH) festzustellen. Es handelt sich makroskopisch um eine gutartige Vergrößerung (faustgroß) und eine Gewichtszunahme (bis zu 400g) der Prostata. Eine vergrößerte Prostata kann auf die Harnblase drücken und den Harnleiter einzwängen, so dass häufiger Harndrang mit unvollständiger Blasenentleerung gängige Symptome sind. Diese können durch α -Blocker gelindert werden, welche die glatte Prostata-Muskulatur durch Hemmung der α -Adrenergischen Rezeptoren relaxieren. Die BPH stellt keinen Vorläufer des Prostatakarzinoms dar.

Die prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN) zählt dagegen zu den Prä-Neoplasien, d. h. den Vorläufern des Karzinoms. In >60% aller über 60-Jährigen kann eine High-Grade-PIN nachgewiesen werden, welche zu 77% mit einem Karzinom assoziiert ist (Sakr, Partin, 2001). Histologische Prostatauntersuchungen bei Patienten, die an anderen Ursachen gestorben sind, wiesen latente maligne Veränderungen bereits bei 1/3 der 40 bis 50-Jährigen und 2/3 der über 60-Jährigen nach. Klinisch tritt das Prostatakarzinom jedoch wesentlich seltener auf (Sakr, Partin, 2001).

Prostatatumoren sind zu 97 % Adenokarzinome. Ihre Entstehung aus entarteten Drüsenzellen ist primär androgenabhängig. Vornehmlich wachsen die Karzinome innerhalb der peripheren Zone der Prostata. Etwa 1/3 der Karzinome wird invasiv. Dabei werden benachbarte Organe (Samenblasen, Harnblase, Beckenboden, Rektum) infiltriert. Die Metastasierung erfolgt zunächst lymphogen. Fern-Metastasen befinden sich größtenteils in Knochen (90%) Lunge (46%) und Leber (25%) (Bubendorf et al., 2000). Typische Symptome sind Schmerzen im Bereich des Beckens und der Wirbelsäule. Diese Beschwerden werden primär durch die Knochenmetastasen verursacht, während das Prostatakarzinom klinisch stumm bleibt (okkultes Karzinom).

Die Beschreibung früher und fortgeschrittener Prostatakarzinome erfolgt anhand klinisch-pathologischer Einteilungssysteme. Die TNM-Klassifikation unterscheidet Tumoren nach Größe und Ausdehnung des Tumors inner- und außerhalb der Prostata (T1-T4), Lymphknotenbefall (N0-N1) und Fern-Metastasen (M0-M1) (Tabelle 1). Ein histologisches zytologisches „Grading“ beurteilt den Tumor nach der Tumorzellmorphologie, wird aber in verschiedenen Kliniken unterschiedlich gehandhabt. Mit dem „Grading“-System nach D. Gleason wurde jedoch ein internationaler Standard geschaffen. Hierbei wird der Tumor auf Grund der Drüsen-Architektur eingeteilt (Gleason, Mellinger, 1974). Auf einer Skala von 1

bis 5 wird dabei stark differenzierten Drüsen ein niedriger Grad zugeteilt, gering differenzierten Drüsen ein hoher (Tabelle 2). Die beiden am häufigsten im gesamten Tumorgewebe anzutreffenden Grade werden anschließend addiert und als „Gleason Score“ bezeichnet (Skala von 2 bis 10). Zur Diagnose und Prognose werden Gleason Score und TNM-Stadium zusammen mit weiteren Parametern verwendet.

Tabelle 1 TNM-Klassifikation

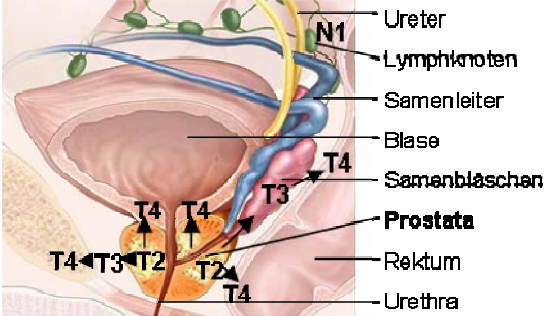
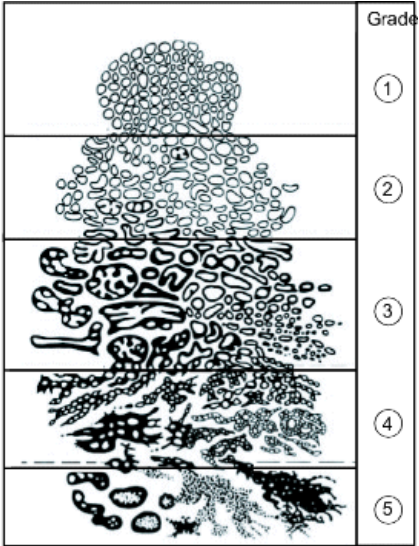
Stadium	Beschreibung	
T1	Inzidentaltumor (klein, zufällig gefunden)	 <p>Tumorstadien. Ausbreitung des Tumors in Pfeilrichtung. (Quelle: Terese Winslow, National Cancer Institute).</p>
T2	Tumor liegt innerhalb der Prostatakapsel	
T3	Ausbreitung über die Prostatakapsel hinaus	
T4	Infiltration von Nachbarstrukturen	
N0	Regionale Lymphknoten sind nicht befallen	
N1	Regionaler Lymphknotenbefall	
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar	
M1	Fernmetastasen nachgewiesen	

Tabelle 2 „Grading“ nach Gleason

Grade	Beschreibung	
G1	Stark differenzierte Drüsen ähnlich wie im Normalgewebe; runde Drüsen einheitlicher Größe. Seltenster Grad.	 <p>Histologische Grade nach Gleason (Gleason, Mellinger, 1974)</p>
G2	Drüsen oval/ abgerundet mit offenen Lumina.	
G3	Lumina sind immer noch offen, weisen aber unregelmäßige Umrisse, Größen und Abstände der Drüsen auf. Häufigster Grad.	
G4	Partieller Verlust der luminalen Differenzierung.	
G5	Fast vollständiger Verlust der luminalen Differenzierung. Das Epithel bildet solide Platten, Stränge oder einzelne, invasive Zellen.	

Die beiden häufigsten im Tumorgewebe anzutreffenden Grade werden zu Gleason Scores 2-10 addiert.

1.1.4 Diagnose und Prognose

Bei der Vorsorgeuntersuchung werden eine rektale Palpation (Tastuntersuchung) und eine Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blut durchgeführt. Ein PSA-Test ist zwar einfach durchzuführen, er weist jedoch eine geringe Spezifität und Sensitivität auf. Neben einem Prostatakarzinom können einem erhöhten PSA-Wert auch andere Ursachen zugrunde liegen, z. B. eine Prostatitis oder eine benigne Hyperplasie. Der positive Vorhersagewert bei einem PSA-Wert über dem Grenzwert von 4ng/ml liegt bei unter 20%. In Kombination mit der rektalen Palpation steigt der Vorhersagewert auf ~50% (Luboldt et al., 2001). Bei leicht erhöhten PSA-Werten (2-4ng/ml) kann zudem durch regelmäßige Kontrolle die Rate, mit der sich der PSA-Wert ändert (PSAV), bestimmt werden. Ist diese erhöht (<0,1ng/ml/a) oder liegt die PSA-Verdopplungsrate (PSADT) bei <10 Jahren, weist das ebenfalls auf ein Karzinom hin (Fang et al., 2002). Der PSA-Messung kommt in der Tumor-Nachsorge nach operativer Behandlung oder Radiotherapie und begleitend zur Hormontherapie eine weitere Bedeutung zu. Liegt die PSA-Verdopplungsrate unter einem Jahr, so besteht in einem Zeitraum von 10 Jahren ein erhöhtes Mortalitätsrisiko (Albertsen et al., 2004).

Sind PSA-Werte oder die rektale Palpation auffällig, so werden Prostatabiopsien entnommen und histo-pathologisch untersucht. Die Einteilung positiver Biopsien nach Gleason liefert bereits prognostische Hinweise: Während bei Gleason Scores 7-10 das Risiko, an Prostatakarzinomen zu sterben, deutlich erhöht ist, liegt die Mortalitätsrate bei Gleason Scores 2-6 in einem Zeitraum von 20 Jahren und konservativer Behandlung bei <20% (Albertsen et al., 2005).

Bildgebende Verfahren wie Ultraschall, Kernspinresonanz (NMR), Computertomografie (CT) und neuerdings eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit ^{11}C -Cholin als Radionuklid werden verwendet, um die Tumorgröße zu bestimmen und Metastasen zu detektieren

Ein Modell, welches bei der Erstellung einer Prognose hilfreich sein kann, beruht auf den sogenannten Partin-Tabellen. Dabei werden die prä-operativen Befunde für Serum-PSA, Gleason Score und klinisches T-Stadium verwendet, um Hinweise auf die Prognose zu bekommen. So kann besser abgeschätzt werden, ob eine lokale Therapie Aussicht auf klinischen Erfolg haben könnte (Partin et al., 2001).

Da jedoch keines der bisherigen Diagnoseverfahren ausreichend zuverlässige Prognosen liefert, werden zur Verbesserung der Diagnose neue molekulare Marker gesucht. Diese sollen in Zukunft auch die Grundlage für gezielte therapeutische Maßnahmen bilden.

1.1.5 Therapie

Prinzipiell gibt es vier verschiedene Therapieansätze: „Abwarten und Kontrollieren“, Hormontherapie, radikale Prostatektomie und Strahlentherapie. Die Therapiewahl hängt zum einen von der Diagnose, zum anderen aber auch vom Alter und der körperlichen Konstitution des Patienten ab. Lokal begrenzte, niedrig-gradige Karzinome werden konservativ behandelt, da die Mortalitätsrate bei diesen Tumoren nach 15 Jahren konstant bleibt (Albertsen et al., 2005), aber auch bei hohem Alter und schlechter körperlicher Verfassung werden eher konservative Behandlungsmethoden („Abwarten und Kontrollieren“ oder Hormontherapie) gewählt.

1. „Abwarten und Kontrollieren“

Die PSA-Werte werden regelmäßig kontrolliert und etwaige Symptome, die durch eine Prostatavergrößerung entstehen, gelindert. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt für hoch- bis mäßig differenzierte Karzinome bei 93-77% (Lu-Yao, Yao, 1997). Dementsprechend ist diese Strategie sinnvoll, wenn sich das Karzinom in einem frühen Stadium befindet (Gleason Score ≤ 6 , PSA ≤ 10 ng/ml, PSA Verdopplungszeit ≥ 10 Jahre), oder der Patient über 70 Jahre alt ist bzw. auf Grund der Begleiterkrankungen eine geringe Lebenserwartung hat (Choo et al., 2001).

2. Radikale Prostatektomie

Die vollständige Entfernung der Prostata (radikale Prostatektomie) zur Behandlung des Prostatakarzinoms wurde erstmals 1889 durch Vincenz Czerny in Heidelberg durchgeführt. Diese Therapie führt bei einem Großteil der lokal begrenzten Tumoren ($\leq T2$) auch bei geringer Differenzierung zur vollständigen Heilung. Eine Progression ist nach 5 Jahren nur in 15% der lokal begrenzten Tumoren, jedoch in $>50\%$ der T3 Tumoren festzustellen (Ohori et al., 1994). Bezüglich der 10-Jahres-Überlebensrate ist der Therapieerfolg bei wenig differenzierten Karzinomen nach einer Prostatektomie im Vergleich zum „Abwarten und Kontrollieren“ dementsprechend am größten (67% vs. 45%). Bei stark differenzierten (94% vs. 93%) und mäßig differenzierten Karzinomen (87% vs. 77%) sind die Unterschiede geringer (Lu-Yao, Yao, 1997). Die langfristigen (≥ 1 Jahr) Nebenwirkungen wie Inkontinenz (49% vs. 21%) und Impotenz (80% vs. 45%) sind dagegen häufiger (Steineck et al., 2002).

3. Strahlentherapie

Hochenergetische, ionisierende Strahlen werden zur Therapie von T1-T3 Tumoren eingesetzt. Nach der Methodik unterscheidet man die von außen einwirkende Teletherapie von der Brachytherapie, bei der kleine, gekapselte Strahlenquellen in die Prostata eingebracht werden (Seed-Implantation). Insbesondere bei Tumoren, die die Kapsel durchbrochen haben (T3, T4) wird die Teletherapie mit einer Hormontherapie kombiniert. Dadurch lässt sich die 5-Jahres-Überlebensrate von >60% auf >70% steigern (Horwich et al., 2002).

4. Hormontherapie

Die Proliferation von Prostatakrebszellen ist primär androgenabhängig. Androgenentzug führt zum programmierten Zelltod (Apoptose), d. h. zum Absterben von Tumorzellen. Hormonentzug wird klassisch durch Orchiectomie erreicht. Einen äquivalenten Effekt hat die Verabreichung eines Agonisten des Luteinisierenden Hormon Releasing Hormons (LHRH). Bei lokal begrenzten, niedrig-gradigen Tumoren kann diese Therapie durchaus 10 oder 20 Jahre wirksam sein. Der Hormon-Entzug stellt zudem bei metastasierten Karzinomen die Standardtherapie dar, auf welche zunächst 85% der Fälle ansprechen (Horwich, 2004). Nach einer gewissen Zeit (Medianwert 12-18 Monate) entwickeln sich jedoch durch androgenunabhängige Tumorzell-Proliferation Rezidive. Die mediane Überlebenszeit beträgt im androgenunabhängigen Stadium 1 Jahr. Behandlungsmöglichkeiten sind u. a. eine sekundäre Hormontherapie, Chemotherapie mit Taxanen (Docetaxel) und Radiopharmazeutika (Strontium 89). Mit Docetaxel (in Deutschland 2005 zugelassen) konnte eine Lebensverlängerung um 3 Monate (Medianwert) erreicht werden. Es handelt sich jedoch im Wesentlichen um palliative Therapien, welche die Symptome, insbesondere die Schmerzen, lindern, aber nicht zur Heilung führen.

Die Mechanismen androgenunabhängigen Tumorwachstums sind nicht vollständig geklärt. Zum einen kann die Signaltransduktion des Androgenrezeptors (AR) z. B. durch Amplifikation und erhöhte Expression des AR-Gens oder durch Punktmutationen, welche zur Selektion sensitiverer Rezeptoren führen, aufrecht erhalten werden (Jenster, 1999). Vollständig androgenunabhängig proliferierende Prostatakrebszellen weisen dagegen einen Verlust des Androgenrezeptors auf und umgehen den AR-Signaltransduktionsweg. In diesem Zusammenhang wird eine Aktivierung von Onkogenen, eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren, eine autokrine Stimulation der Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Edwards, Bartlett, 2005; Jenster, 1999) sowie eine Beteiligung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren diskutiert (Bookout et al., 2003; Daaka, 2004).

Letztendlich hat die Einführung des PSA-Screenings in der Bevölkerung Anfang der 90er Jahre zwar eine Steigerung der gestellten Prognosen bewirkt, die Prostatakarzinom-bedingte Mortalität ist jedoch nicht im gleichen Maße zurückgegangen (Perron et al., 2002). Die Therapien sind nicht bei allen Patienten erfolgreich und zum Teil mit erheblichen Nebenwirkungen auf das Urogenitalsystem verbunden. Weder die Mechanismen der Metastasierung, noch die Mechanismen des androgenunabhängigen Wachstums sind ausreichend geklärt. Eine kurative Therapie dieser Stadien ist nicht verfügbar. Die Aufklärung der molekularbiologischen Grundlagen der Prostatapathologie könnte helfen, neue Diagnose- und Therapieansätze zu finden.

1.2 Molekulare Grundlagen der Krebsentstehung und deren Bedeutung in Diagnose und Therapie

1.2.1 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Allen Krebserkrankungen liegen genetische Veränderungen zugrunde.

Die erste Krebserkrankung, die man auf eine bestimmte chromosomale Veränderung zurückführen konnte, war die chronisch-myeloische Leukämie (CML). Charakteristisch für diese Erkrankung ist das „Philadelphia-Chromosom“ (Nowell, Hungerford, 1960), welches durch reziproke Translokation $t(9;22)$ entsteht. Dabei kommt es zur Bildung von Fusionsgenen: BCR-ABL auf dem derivaten Chromosom 22 und ABL-BCR auf dem derivaten Chromosom 9. Das BCR/ABL Fusionsgen kodiert für eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die Proteine des Zellzyklus aktiviert, dadurch die Zellteilung beschleunigt und die Leukämie initiiert. Die Translokation $t(8;14)$ beim Burkitt-Lymphom bringt c-MYC unter den Einfluss eines Immunglobulin-Enhancers, so dass die Expression des MYC-Onkogens dereguliert wird.

Proto-Onkogene werden zu Onkogenen, wenn sie durch Mutation oder verstärkte Expression einen Funktionsgewinn erlangen. Sie kodieren häufig Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren (z. B. EGFR), G-Proteine (z. B. RAS), Proteinkinasen (z. B. SRC) oder

Transkriptionsfaktoren (z. B. MYC). Deren Aktivierung regt letztendlich die Zellproliferation an, beeinflusst die Zelldifferenzierung oder löst die Migration oder Adhäsion von Zellen aus.

Bei Tumorsuppressorgenen dagegen führt die Schädigung beider Allele zum Funktionsverlust des kodierten Proteins, was letztendlich zur malignen Transformation führt.

Das erste Tumorsuppressorgen wurde beim Retinoblastom beschrieben. Bei einer genetischen Prädisposition ist ein Allel des Gens RB1 geschädigt. Kommen genetische Veränderungen (somatische Mutation) im zweiten Allel dazu (Zwei-Schritt-Hypothese von Knudson, 1971), verliert RB1 seine Funktion bei der Zellzykluskontrolle. Erbliche Tumoren treten daher früher auf als spontane Tumoren, bei denen zwei somatische Mutationen Voraussetzung sind.

Metastasierungs-Suppressorgene wie NM23-H1 spielen bei Endozytose und Zellmotilität eine Rolle. Zwischen Höhe der NM23-H1-Expression und Tumor-Metastasierung besteht eine inverse Beziehung (de la Rosa et al., 1995).

Welche Onkogene und Tumorsuppressorgene bei der Progression des Prostatakarzinoms eine Rolle spielen ist weitgehend ungeklärt.

1.2.2 Molekularbiologisch begründete Diagnose- und Therapieansätze

Bei einigen Tumorarten konnten molekularbiologische Erkenntnisse bereits zur Entwicklung neuer Diagnose- oder Therapieverfahren verwendet werden.

Auf Grund charakteristischer genetischer Profile (vgl. 1.3.1.3 2. Matrix-CGH) können beispielsweise morphologisch ähnliche Leukämien unterschieden werden. Von Schwaenen et al. wurde ein Diagnose-Chip zur spezifischen und sensitiven Identifizierung der chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämie (B-CLL) hergestellt (Schwaenen et al., 2004).

Zu den molekularbiologischen Krebstherapeutika zählen Tyrosinkinase-Hemmer wie Imatinib (Glivec[®]), das zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) (Kapitel 1.2.1) eingesetzt wird, sowie therapeutische monoklonale Antikörper wie Trastuzumab (Herceptin[®]) zur Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs. Gegen den epidermalen Wachstumsfaktor EGFR sind der Inhibitor Gefitinib (Iressa[®]) und der monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix[®]) gerichtet, die für fortgeschrittenes Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC) bzw. Kolorektalkarzinom zugelassen sind.

Ebenso wie beim Prostatakarzinom nach anfänglich erfolgreicher Hormonentzugstherapie resistente Rezidive entstehen, so bilden auch Tumoren, die mit Tyrosinkinase-Hemmern oder

monoklonalen Antikörpern behandelt wurden, mit der Zeit Resistenzen aus. Beim HER2-positiven Mammakarzinomen steigt die Wahrscheinlichkeit der Resistenzbildung, wenn zusätzlich Proteine der Signaltransduktionswege der Wachstumsfaktoren exprimiert werden (Harris et al., 2007). Die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Resistenzbildungen ermöglicht wiederum die Aufdeckung weiterer Therapiemöglichkeiten.

Auch beim Prostatakarzinom hofft man durch Aufklärung der molekularen Grundlagen auf neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten. Therapieansätze, die auf den molekularen Erkenntnissen bei anderen Tumorarten beruhen, waren beim Prostatakarzinom bisher nicht erfolgreich.

1.3 Molekulare Grundlagen des Prostatakarzinoms

Die Entstehung des Prostatakarzinoms ist nur unvollständig geklärt. Zudem weist jedes Karzinom individuelle Merkmale auf. Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Prostatakarzinogenese werden die Gemeinsamkeiten der Prostatakarzinome analysiert. Dazu gibt es Ansätze auf verschiedenen molekularen Ebenen, wie in den folgenden Unterkapiteln beschrieben. Immer wiederkehrende (=rekurrente) chromosomale Imbalancen in Tumoren weisen auf beteiligte Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene hin. Nach der Veröffentlichung der humanen Genomsequenz im Jahre 2001 sind ein Großteil der Gene und deren Positionen bekannt (McPershon et al., 2001, Venter C et al., 2001). Genexpressionsanalysen decken charakteristische Veränderungen der Genexpression im Tumortranskriptom auf. Ob sich diese Veränderungen quantitativ auf der Proteinebene bemerkbar machen, kann mittels Immunhistochemie (IHC) nachgewiesen werden. Um Veränderungen zu bestimmen, die charakteristisch für die Entstehung und die Entwicklung des Tumors sind, werden Proben von Patienten untersucht, deren klinisch-pathologische Daten bekannt sind. Gewebe-Mikroarrays ermöglichen dabei die Analyse einzelner Proteine in einer großen Probenanzahl. So können Korrelationen von Proteinexpressionsdaten mit klinisch-pathologischen Parametern mit Hilfe statistischer Analyseverfahren aufgedeckt werden. Ein Ziel dieser Untersuchungen ist es, geeignete molekulare Marker zur besseren Diagnose und Prognose eines Tumors zu finden. Langfristig wird erhofft, neue therapeutische Strategien auf Grundlage einzelner, charakteristischer molekularer Veränderungen entwerfen und etablieren zu können.

1.3.1 Genetische Veränderungen beim Prostatakarzinom

1.3.1.1 Erblicher Prostatakrebs

Die Identifikation von Genen, die in erblichen humanen Tumoren eine Rolle spielen, hat auch entscheidend zum Verständnis der Entstehung der entsprechenden spontanen Tumoren beigetragen. Ein prominentes Beispiel ist das Tumorsuppressorgen RB1 beim Retinoblastom (s. o.).

Epidemiologisch kann auch das Prostatakarzinom in erbliche und spontane Formen unterteilt werden, auf genetischer Ebene ist das jedoch bisher nicht möglich. Einige Gene wurden identifiziert, die bei einem Teil der erblichen Fälle und der spontanen Fälle mutiert oder deletiert sind. Dazu gehören Gene der Immunantwort wie RNASEL auf Chromosomenarm 1q, welches eine Ribonuklease kodiert, die virale und zelluläre DNA degradiert und Apoptose induziert und MSR1 (Macrophage Scavenger Receptor) auf 8p, welches einen Rezeptor kodiert, der für die zelluläre Aufnahme von bakteriellen Zellwandprodukten zuständig ist. BRCA2, welches mit 1/3 der erblichen Brustkrebserkrankungen assoziiert ist, ist auch bei einem geringen Anteil (2%) der familiären Prostatakarzinome mutiert (Edwards et al., 2003). Des Weiteren wurden kürzlich zwei neue Kandidatengene identifiziert, NBS1 (5p) und CHEK2 (22q), welche Proteine kodieren, die bei der DNA-Reparatur bzw. der Zellzykluskontrolle eine Rolle spielen (Hughes et al., 2005).

1.3.1.2 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der Pathomechanismen des Prostatakarzinoms ist die Untersuchung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die von anderen Tumoren her bekannt sind.

Auch beim Prostatakarzinom sind Mutationen, Deletionen und Promoter-Hypermethylierungen, welche zur Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen führen können, sowie Mutationen, Amplifikationen und verstärkte Expressionen von Onkogenen detektiert worden, welche beispielsweise zu einem ungehemmten Fortschreiten des Zellzyklus oder einer Inhibition der Apoptose und somit zu unkontrollierter Zellvermehrung führen könnten. Eine Auswahl an Tumorsuppressorgenen und Onkogenen, die auf Chromosomenregionen liegen, welche häufig deletiert oder amplifiziert sind und beim Prostatakarzinom möglicherweise eine Rolle spielen, zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3 Tumorsuppressorgene und Onkogene beim Prostatakarzinom

Chromosomale Lokalisation	Gen	Beschreibung	Veränderung des Gens	Referenz
<u>Tumorsuppressorgene/-kandidaten</u>				
8p21.2	NKX3-1	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)	deletiert	(Bethel et al., 2006)
10q23.31	PTEN	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	mutiert, deletiert	(Porkka, Visakorpi, 2004; Ribeiro et al., 2006b)
11q13.2	GSTP1	glutathione S-Transferase pi	hypermetyliert	(Harden et al., 2003)
12p13	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	deletiert	(Nakamura et al., 2000)
13q13.1	BRCA2	breast cancer 2, early onset	deletiert, mutiert	(Edwards et al., 2003)
13q14.2	RB1	retinoblastoma 1	deletiert, mutiert	(Phillips et al., 1994)
17p13.1	TP53	tumor protein p53	inaktiviert	(Navone et al., 1993)
<u>Onkogene</u>				
7p11.2	EGFR	epidermal growth factor receptor	amplifiziert	(Djakiew, 2000)
8q24	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	amplifiziert	(Jenkins et al., 1997)
18q21.33	BCL2	B-cell CLL / lymphoma 2	erhöhte Expression	(Catz, Johnson, 2003)

Die **Tumorsuppressorgene** RB1 und p53 spielen bei vielen Tumoren eine Rolle. Monoallelicher Verlust oder Mutationen von RB1 treten bereits in frühen Stadien des Prostatakarzinoms auf (Phillips et al., 1994). Für p53 wurden diverse Inaktivierungsmechanismen nachgewiesen und eine anormale Expression mit fortgeschrittenem Tumorstadium, Metastasenbildung und Androgenunabhängigkeit assoziiert (Navone et al., 1993). Das Glutathion-S-Transferase-Gen (GSTP1) ist ein Tumorsuppressorgen mit dem Potential zum diagnostischen Marker. Seine Inaktivierung durch Promoter-Hypermethylierung ist eine der häufigsten epigenetischen Veränderungen beim Prostatakarzinom und tritt schon in frühen Stadien auf (Harden et al., 2003; Henrique et al., 2006). Auch der Verlust von Chromosomenarm 8p ist bereits bei einem Teil der frühen Stadien anzutreffen und nimmt während der Tumorprogression noch zu (Alers et al., 2001).

Ein Tumorsuppressorgen-Kandidat auf 8p21 ist NKX3.1. Dieses Gen kodiert ein prostataspezifisches Homöoboxprotein, welches die Expression des PSA-Gens unterdrückt (Bethel et al., 2006; Lei et al., 2006). Erst in fortgeschrittenen Tumorstadien treten dagegen somatische Mutationen bei PTEN (Phosphatase- and Tensin-Homolog (mutated in multiple cancers 1)) und Verlust der Heterozygotität (LOH) von 10q auf. PTEN inhibiert den PI3K-AKT Signaltransduktionsweg. Bei PTEN-Verlust bleibt AKT aktiv und phosphoryliert den Androgenrezeptor, welcher daraufhin hypersensitiv auf geringe Androgenkonzentrationen reagiert und so zu Androgen-unabhängigem Wachstum des Prostatakarzinoms beitragen kann (Edwards, Bartlett, 2005). Des Weiteren kann PTEN-Verlust zu einer reduzierten Expression der Tumorsuppressorgene NKX3.1 (Lei et al., 2006) und p27 führen (Nakamura et al., 2000). Die beschriebenen Gene liegen alle auf monoallelisch häufig deletierten Regionen. Abgesehen von p53 und PTEN wurde eine Inaktivierung des zweiten Allels nur in Einzelfällen nachgewiesen. Zum Teil scheint die Expression durch Promoter Hypermethylierung (GSTP1) oder andere Mechanismen (NKX1, p27) herunterreguliert zu werden. Es wurde vermutet, dass bereits eine Expressionsminderung für die Entwicklung des Prostatakarzinoms ausreichend sein könnte (Haploinsuffizienz) (Schulz et al., 2003).

Onkogene, welche bei zahlreichen anderen Tumoren eine Rolle spielen, sind auch beim Prostatakarzinom untersucht worden. Das Proto-Onkogen c-MYC auf Chromosomenbande 8q24 kodiert einen Transkriptionsfaktor. Zusätzliche Kopien des MYC-Gens sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Sato et al., 1999; Tsuchiya et al., 2002) und in verstärktem Maße bei Lymphknoten- und Fernmetastasen anzutreffen (20% haben $>2x$, 10% $\geq 3x$ zusätzliche Kopien) (Bubendorf et al., 1999; Jenkins et al., 1997).

Der Apoptose-Inhibitor BCL-2 scheint bei der Entwicklung von androgenunabhängigen Rezidiven eine Rolle zu spielen, da er in androgenunabhängigen Tumoren verstärkt exprimiert wird (Catz, Johnson, 2003).

Neben dem Androgenrezeptor haben auch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren eine wichtige Funktion bei Entwicklung und Wachstum der normalen Prostata. Eine verstärkte Expression kann bei der Metastasierung und der Entwicklung androgenunabhängiger Karzinome eine Rolle spielen (Djakiew, 2000). Beispielsweise können das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-6 (IL6) und die Wachstumsfaktoren IGF und EGF den Androgen-Rezeptor ligandenunabhängig aktivieren (Gregory et al., 2004).

Eine weitere Aufklärung der vielfältigen, individuell verschiedenen Mechanismen der Prostatakarzinogenese und Progression ist unerlässlich und könnte die Unterscheidung

aggressiver Tumoren von solchen, die den Patienten lebenslang begleiten, aber keine Todesursache darstellen, erleichtern.

1.3.1.3 Chromosomenaberrationen

Zur Aufdeckung von Genen, die bisher noch nicht mit Prostatakarzinomen in Zusammenhang gebracht wurden, werden chromosomale Bereiche analysiert, welche in Prostatakarzinomen häufig numerisch verändert sind. Korrelieren diese rekurrenten Veränderungen mit einer schlechten Prognose, so enthält die Chromosomenregion möglicherweise ein Gen (Kandidatengen), welches zur Progression des Prostatakarzinoms beiträgt. Genomische Analysemethoden und Erkenntnisse, die durch deren Anwendung gewonnen wurden, sind im Folgenden zusammengefasst.

1. Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Die Gesamtheit aller chromosomalen Imbalancen eines Tumorgenoms kann mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) (Kallioniemi et al., 1992; du Manoir et al., 1993; Joos et al., 1995) dargestellt werden. Bei dieser Technik werden mit unterschiedlichen Fluorochromen markierte Tumor-DNA und normale Kontroll-DNA auf normale gespreitete Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Das Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten gibt anschließend Aufschluss über numerische Veränderungen chromosomaler Bereiche: Während sich die Intensitätswerte der Tumor- und der Kontroll-DNA in balancierten Regionen nicht unterscheiden, weisen deletierte Bereiche schwächere, amplifizierte Bereiche stärkere Fluoreszenzintensitäten als die Kontroll-DNA auf. Die maximale Auflösung dieser chromosomalen CGH (cCGH) liegt bei etwa 10Mbp (Kallioniemi et al., 1994).

Ribeiro et al. haben kürzlich eine Meta-Analyse von CGH-Daten durchgeführt und ein Schema der chromosomalen Verluste und Zugewinne während der Prostatakarzinom-Progression von organbegrenzten über lokal invasive bis zu metastasierten Karzinomen aufgestellt (Ribeiro et al., 2006a). Die Anzahl der Fälle mit numerischen chromosomalen Veränderungen steigt im Laufe der Tumorprogression von 45% über 72% auf 89% an. Überwiegen in organbegrenzten Tumoren noch die chromosomalen Verluste (2:1), so weisen metastasierte und rekurrente Tumoren fast ebenso viele Zugewinne auf (Abb. 2).

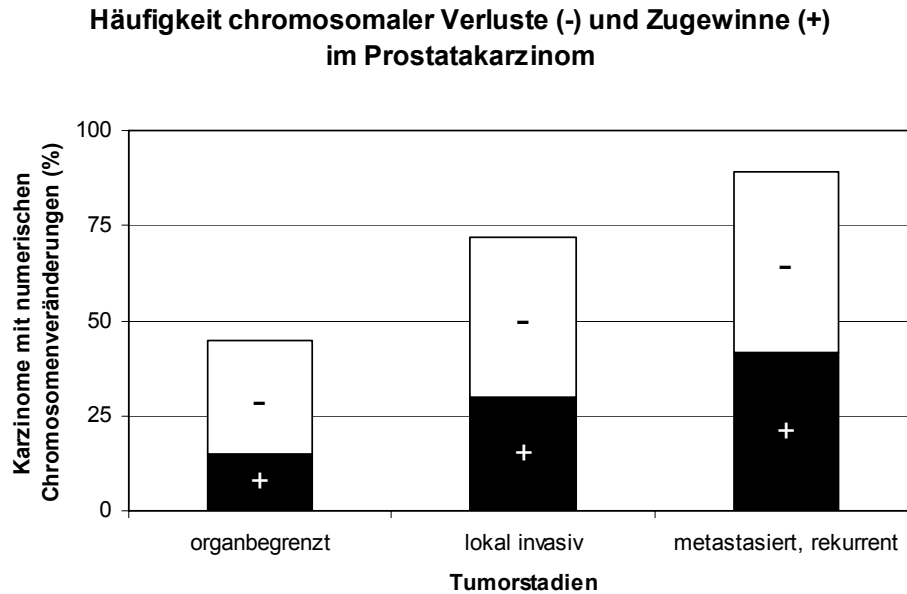


Abb. 2 Zunahme der chromosomaler Veränderungen (%) im Laufe der Progression des Prostatakarzinoms. Datenquelle: Meta-Analyse der CGH-Daten von 294 Prostatakarzinomen (Ribeiro et al., 2006a).

Frühe und häufig Ereignisse in der Entwicklung des Prostatakarzinoms sind der Verlust von 8p und/ oder 13q (je >15%). Bei lokal invasiven Karzinomen kommen Verluste auf 5q, 6q und 16q (je 15-18%) sowie zusätzliche Verluste auf 8p und 13q (je ~40%) hinzu. Des Weiteren sind Zugewinne auf den Chromosomenarmen 7p, 7q (13-15%) und 8q (~25%) zu verzeichnen. Bei metastasierten und rekurrenten Karzinomen sind fast alle Chromosomen von numerischen Aberrationen betroffen: Bei >15% dieser Karzinome kommen Verluste auf 1p, 2q, 4q, 5q, 6q, 10q, 14q, 16q und 18q sowie Gewinne auf 3q, 6p, 7p, 8q, 9q, 17q, 20q und Xpq hinzu (siehe Abb. 3). Logistische Regressionsanalysen haben gezeigt, dass Zugewinne auf 8q und Verluste auf 13q mit lokal invasiven Karzinomen assoziiert sind. Metastasierte oder rekurrente Karzinome hingegen sind einerseits mit Verlusten auf 6q, andererseits mit Zugewinnen auf 8q in Kombination mit Verlusten auf 10q assoziiert (in Abb. 3 hervorgehoben) (Ribeiro et al., 2006a). Das bestätigt die frühere Erkenntnis, dass 8q Zugewinne zum einen ein frühes Ereignis in der Prostatakarzinogenese darstellt, zum anderen aber auch mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Alers et al., 2001; Alers et al., 2000).

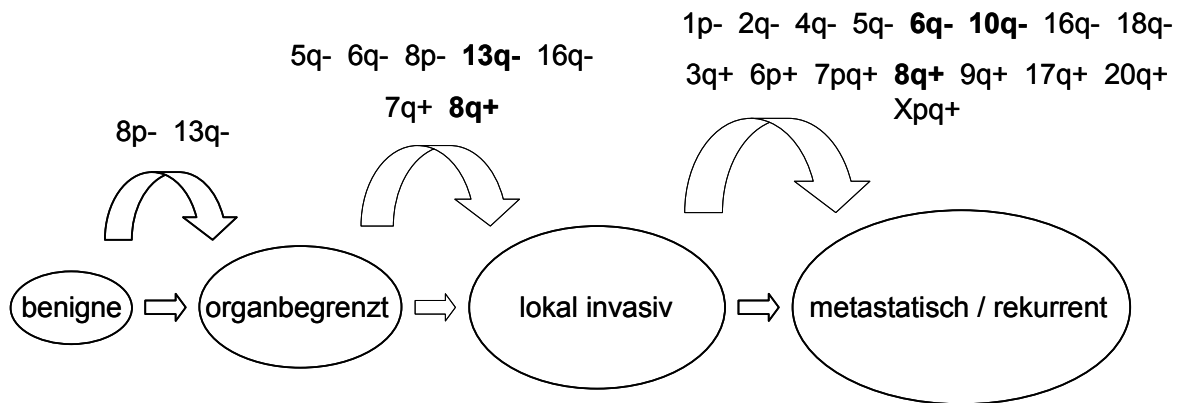


Abb. 3 Genomische Imbalancen, die mit der Progression des Prostatakarzinoms einhergehen und in >15% der Fälle auftreten. Imbalancen, welche in logistischen Regressionsanalysen am besten zwischen den Tumorstadien differenzieren, sind hervorgehoben. Datenquelle: CGH-Meta-Analyse (Ribeiro et al., 2006a).

Häufig sind ganze Chromosomenarme vom Verlust bzw. Zugewinn betroffen. Sind nur Teile betroffen, so lassen sich die minimal überlappenden Regionen bestimmen. Es wird vermutet, dass dort Gene liegen, die mit der Prostatakarzinogenese in Zusammenhang stehen. Chromosomenarm 8q weist mit ~6% bei organbegrenzten, ~25% bei lokal invasiven und ~40% bei metastasierten und rekurrenten Karzinomen die höchste Rate an Zugewinnen auf. Als minimal überlappender Bereich wurde 8q22-q24 identifiziert (Ribeiro et al., 2006a). Ein Kandidatengene auf 8q24 ist das Onkogen c-MYC (MYC) (siehe Tabelle 3). Zugewinne von MYC sind bei metastasierten Primärtumoren größtenteils auf einfache Zugewinne des ganzen Chromosomenarms zurückzuführen, während bei ~45% der Metastasen zusätzliche MYC-Kopien vorliegen (Jenkins et al., 1997). Zusätzliche MYC-Kopien in nicht-metastasierten Karzinomen sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Sato et al., 1999) (Tsuchiya et al., 2002). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass andere Gene als MYC auf 8q22-q24 als Kandidatengene in Frage kommen (Porkka et al., 2004).

13q weist bei ~5% der organbegrenzten, ~38% der lokal invasiven und ~45% der metastasierten und rekurrenten Karzinome Deletionen auf und stellt neben 8p den am häufigsten von Deletionen betroffenen Chromosomenarm dar (Ribeiro et al., 2006a). Die minimale Überlappungsregion auf 13q wurde zwischen dem RB1-Locus 13q14.2 und dem BRCA2-Locus 13q12 vermutet (Schulz et al., 2003). Da die verbleibende Kopie dieser Gene meist intakt bleibt, ist nicht klar, ob diese Gene bei Prostatakarzinomen die gesuchten Tumorsuppressoren in diesem chromosomalen Bereich darstellen.

Trotz häufiger Verluste auf 6q bei metastasierten und rekurrenten Karzinomen (>40%) konnte die minimale Überlappungsregion zwischen 6q14 und 6q21 bisher nicht genauer eingegrenzt werden (Ribeiro et al., 2006a; Sun et al., 2006).

Dagegen liegt das Tumorsuppressorgen PTEN genau in der minimalen Überlappungsregion 10q23q25. PTEN-Verlust kann zum Androgen-unabhängigen Wachstum beitragen (siehe 1.3.1.2).

Ein klassischer Mechanismus der Entstehung rekurrenter Karzinome stellt die Amplifikation des Androgenrezeptor-Gens dar. Dieses liegt genau in der bei hormonunabhängigen Karzinomen häufig amplifizierten minimalen Überlappungsregion Xq12q13 (Ribeiro et al., 2006a).

2. Matrix-CGH (array CGH)

Eine etwa 1000x höhere Auflösung als bei der chromosomalen CGH kann bei der Matrix-basierten CGH (Solinas-Toldo et al., 1997), auch array CGH (aCGH) genannt, erreicht werden. Zur Herstellung eines DNA-Chips für die Matrix-CGH werden genomische Sequenzen in einer regelmäßigen Anordnung (Array) auf einem Objektträger als Matrix fixiert. Tumor- und Kontroll-Genom werden zerkleinert, unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und auf den DNA-Chip hybridisiert. Das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten zeigt an, ob die Tumor-DNA gegenüber der Kontrolle numerische Veränderungen aufweist. Im Vergleich zur chromosomalen CGH können mit der Matrix-CGH die Grenzen der deletierten bzw. amplifizierten chromosomalen Regionen genauer definiert werden, rekurrent veränderte Bereiche eingengt werden und neue Deletionen und Amplifikationen, die unterhalb der möglichen Auflösung der chromosomalen CGH liegen, aufgedeckt werden (Lichter et al., 2000). Zudem sind auch balancierte Veränderungen wie Translokationen oder Inversionen nachweisbar. Die ersten Matrix-CGH Studien an Prostatakarzinomen, die das gesamte Genom abdeckten (Auflösung 1,4Mb), wurden von Paris et al. durchgeführt. Zur Verifizierung der Methode wurden dieselben Proben mittels chromosomaler CGH und Matrix-CGH analysiert (Paris et al., 2003; Ribeiro et al., 2006b). Zum einen konnten die mit chromosomaler CGH detektierten Veränderungen mit Matrix-CGH bestätigt werden, zum anderen wurden mittels Matrix-CGH 2,7x mehr chromosomale Veränderungen und 15% mehr Karzinome mit genomischen Imbalancen detektiert (Ribeiro et al., 2006b). Zusätzlich wurde bei 58% der Fälle mit 10q Verlust eine homozygote Deletion auf Bande 10q23.31, welches den PTEN-Locus einschließt, festgestellt, was die Bedeutung von PTEN beim Prostatakarzinom bestätigt (siehe Tabelle 3) (Ribeiro et al., 2006b).

Die Matrix-CGH ermöglicht also die Identifizierung und Eingrenzung veränderter chromosomaler Regionen in hoher Auflösung und kann somit die Identifikation von Kandidatengen erleichtern.

3. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Zur Überprüfung, ob potentielle Kandidatengene beim Prostatakarzinom numerisch verändert sind, eignet sich die Fluoreszenz- *in situ*- Hybridisierung. Dabei werden Sonden für das Kandidatengen und einen genomischen Referenzbereich mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und auf das Tumorgenom hybridisiert. Ist die Anzahl der Fluoreszenzsignale des Kandidatengens im Verhältnis zu den Signalen der Kontrolle deutlich höher oder niedriger, so liegt eine numerische Veränderung des Kandidatengens vor.

Stehen der Studie eine größere Anzahl Gewebeproben zur Verfügung, so ist es sinnvoll, repräsentative Probenstücke in einem Paraffinblock zu einem Gewebe-Mikroarray zu arrangieren (siehe 1.3.4). Durch die hohe Probenzahl können mittels FISH auch numerische Genveränderungen detektiert werden, die nur bei einem geringen Prozentsatz der Proben vorliegen. Der in Prostatakarzinomen häufigste chromosomale Zugewinn auf 8q etwa liegt bei organbegrenzten Tumoren in erst 5% der Fälle vor (Porkka, Visakorpi, 2004; Ribeiro et al., 2006a). Zusätzliche Genkopien treten in der Regel erst bei metastasierten Primärtumoren und insbesondere bei den zugehörigen Metastasen auf. So wiesen Bubendorf et al. mit Hilfe des ersten Prostata-Gewebe-Mikroarrays Zugewinne bzw. Amplifikationen ($\geq 3x$) von Cyclin-D1 in 5% und von c-MYC in 11% der Metastasen nach (Bubendorf et al., 1999).

1.3.2 Veränderung der Genexpression

1. Real-Time Quantitative Polymerase Kettenreaktionen (RQ-PCR)

Genomische oder genetische Veränderungen können Auswirkungen auf die Genexpression haben. Veränderungen der Expression einzelner Gene können klassisch mittels Northern-Blots nachgewiesen werden. Zur relativen quantitativen Bestimmung der Expression wird die Real-Time Quantitative Polymerase Kettenreaktionen (RQ-PCR) verwendet (siehe 2.2.7.4). Eine RQ-PCR Analyse der Expression von Kandidatengen auf der minimalen Überlappungsregion 8q23-q24 ergab in Prostatakarzinomen im Vergleich zu benignen Hyperplasien eine deutlich erhöhte Expression von EIF3S3, einer Untereinheit des eukaryotischen Translations Initiations Faktors 3, jedoch nicht von MYC (Savinainen et al., 2004).

2. Expressions-Mikroarrays

Die Mikroarray Technologie ermöglicht es heutzutage, einen Großteil aller exprimierten Gene (Transkriptom) auf einmal zu untersuchen und ein Expressionsprofil zu erstellen. Zur Herstellung von Expressions-Mikroarrays wird RNA in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe eines Roboters in regelmäßiger Anordnung auf einen Objektträger als Matrix gespottet (cDNA-Chip), oder es werden kurze Sequenzen (Oligonukleotide) synthetisiert und mittels Photolithographie auf den Chip gebracht (oligo-Chip). Die Chips werden mit fluoreszenzmarkierter Tumor-cDNA und Kontroll-cDNA hybridisiert. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der Proben- zur Kontroll-cDNA wird bestimmt, und differentiell exprimierte Gene werden mit Hilfe bioinformatischer Datenanalyse aufgedeckt. Zur Validierung der Mikroarray Ergebnisse wird die Expression einzelner Gene mittels RQ-PCR überprüft. Expressions-Mikroarrays eignen sich, um Auswirkungen genomischer Veränderungen auf das Transkriptom abzuschätzen oder um charakteristische Expressionsmuster bestimmter Tumorstadien oder Tumorarten aufzudecken, anhand derer Diagnose-Tools entwickelt werden können.

Beim Prostatakarzinom wurde mit dieser Technologie eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert, welche differentiell exprimiert werden und somit an der Tumorgenese beteiligt sein könnten (Rhodes et al., 2002).

1.3.3 Veränderung der Proteinexpression

Ob beim Prostatakarzinom einzelne Kandidatengene aus Genom- und Transkriptom-Untersuchungen auch auf Proteinebene in Gewebe oder in Kulturzellen differentiell exprimiert werden, kann mittels Immunhistochemie (IHC) untersucht werden. Dafür werden Gewebeschnitte oder Zellen auf einem Objektträger fixiert und mit einem spezifischen Primäantikörper gegen das zu untersuchende Protein inkubiert. Beim indirekten Nachweis des Proteins bindet an den primären Antikörper ein sekundärer Antikörper, an den ein Farbstoff oder ein Enzym gekoppelt ist, welches ein zugegebenes Substrat zu einem farbigen Produkt umsetzt. Die Lokalisation der Färbung zeigt, in welchem Gewebe, Zelltyp und subzellulärem Kompartiment das Protein lokalisiert ist. Die Farbintensität korreliert mit der Proteinmenge. Beim Prostatakarzinom wurde gezeigt, dass Verluste der Proteinexpression von PTEN, NKX3.1 und p27 mit fortgeschrittenen Tumorstadien korrelieren (Bowen et al., 2000; Cote et al., 1998; McMenamin et al., 1999). Verstärkt exprimiert werden die

Transmembran-Serinprotease Hepsin, die Serin/Threonin-Kinase PIM1, EZH2 (polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2) und die α -Methylacyl-CoA Racemase (AMACR), ein peroxisomales Enzym, welches im Metabolismus verzweigter Fettsäuren involviert ist (Dhanasekaran et al., 2001; Luo et al., 2002; Varambally et al., 2002). In Kombination mit dem Basalzellmarker p63, der benigne Zellen markiert, kann die AMACR-Färbung maligne Prostatazellen bereits in frühen Tumorstadien identifizieren. Somit scheint sich AMACR als neuer molekularer Marker zu etablieren (Luo et al., 2002).

1.3.4 Gewebe-Mikroarray Technologie

Um eine Vielzahl an Gewebeproben in einem einzigen Experiment untersuchen zu können, werden statt einzelner Gewebeschnitte Gewebe-Mikroarrays verwendet (Kononen J et al., 1998). Zur Herstellung der Gewebe-Mikroarrays werden mit Hilfe eines „Tissue Chip Mikroarrayers“ zylinderförmige Gewebe-Stanzen aus paraffinisierten Gewebeblöcken (Donorblöcke „D“) entnommen und in einen Paraffin-Empfängerblock („E“) überführt (Abb. 4). Je nach Stanzengröße können mehrere hundert Gewebeproben in einem Paraffinblock angeordnet werden. Mit einem Mikrotom können von diesem Block über 100 Schnitte gewonnen werden, die auf Objektträger gezogen werden.

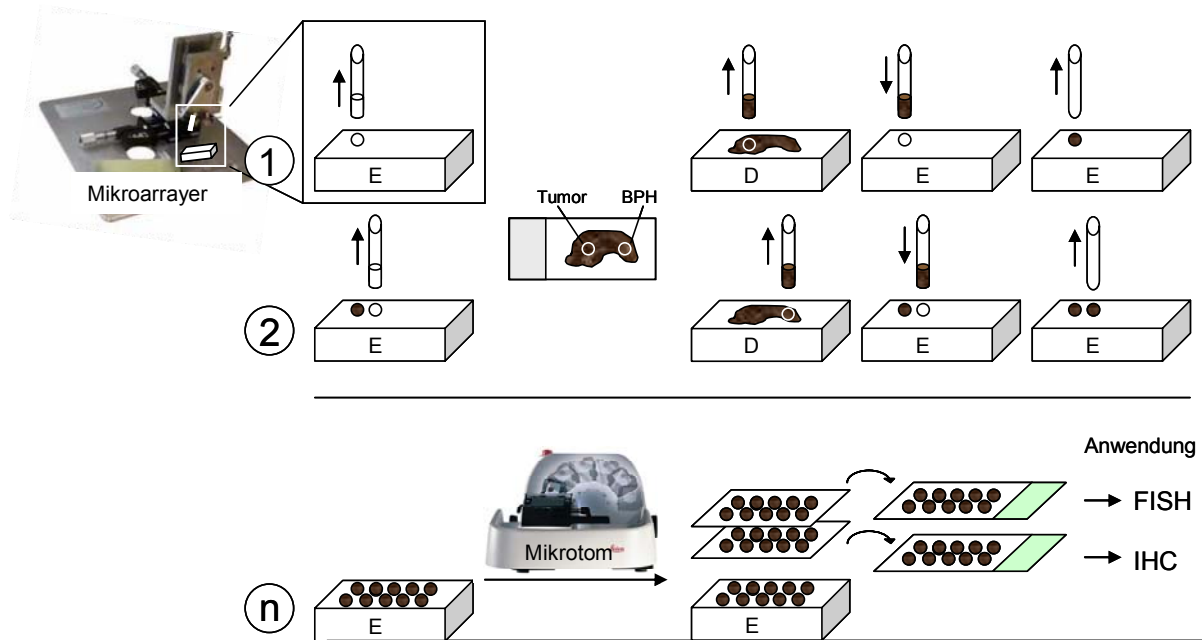


Abb. 4 Herstellung von Gewebe-Mikroarrays: Mit der Hohlzylinder-Nadel eines Mikroarrays werden zylinderförmige Vertiefungen mit einem Durchmesser von $6\mu\text{m}$ in einen Paraffinblock (Empfängerblock „E“) gestanzt. Tumor- bzw. benignes hyperplastisches Gewebe (BPH), dessen Lokalisation zuvor auf einem HE-gefärbten Gewebeschnitt markiert wurde, werden aus einem Gewebepart (Donor „D“) entnommen und in den Empfängerblock überführt. Dieser Vorgang wird n Mal wiederholt, bis der Gewebearray fertiggestellt ist. Mikrotomschnitte ($5\mu\text{m}$) werden angefertigt, auf Objektträgern fixiert und stehen fortan als Tissue Chips zur Analyse mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) oder Immunhistochemie (IHC) zur Verfügung.

Selbst bei heterogenem Gewebe, wie es in Mammakarzinomen vorliegt, können Gewebe-Mikroarrays als repräsentativ für den Gesamttumor angesehen werden: Zwischen Daten aus Gewebe-Mikroarray Analysen und herkömmlichen Gewebeschnitten ist eine statistische Übereinstimmung von über 95% erreicht worden (Torhorst et al., 2001; Zhang et al., 2003).

Gewebe-Mikroarrays ermöglichen es, in einem einzigen Experiment unter konstanten Reaktionsbedingungen mehrere hundert Proben zu untersuchen. Diese Technik liefert ein „Screening“ Werkzeug zur Charakterisierung genetischer Veränderungen mittels FISH oder Veränderungen in der Proteinexpression mittels IHC. Insbesondere gewinnen Gewebe-Mikroarrays auch bei der Validierung von Kandidatengen, welche mittels Matrix-CGH oder Expressions-Mikroarrays gewonnen werden, zunehmend an Bedeutung.

1.4 Ziele der Arbeit

Um neue Marker von diagnostischer Relevanz zu identifizieren und deren mögliche Bedeutung in der Prostatakarzinogenese zu bestimmen, sollten durch einen Vergleich öffentlich verfügbarer Daten Genom- und Transkriptom-Profile von Prostatakarzinomen verglichen werden. Differentiell exprimierte Gene, welche in den identifizierten genomischen Bereichen lokalisiert sind, wurden als Kandidatengene definiert. In einem großen Tumorkollektiv sollte an Gewebe-Mikroarrays untersucht werden, ob die Proteinexpression dieser Kandidaten mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert und neue molekulare Marker darstellen könnten. Die Analyse eines Markers in Prostatazelllinien verschiedener Tumorstadien sollte Hinweise auf die mögliche biologische Rolle in der Progression des Prostatakarzinoms liefern.

Fragestellungen:

1. Welche Kandidatengene ergeben sich aus dem Vergleich öffentlich verfügbarer Genom- und Transkriptom-Profile?
2. Korreliert die Proteinexpression dieser Kandidaten mit klinisch-pathologischen Parametern?
3. Eignet sich neben einer visuellen Immunhistochemie-Analyse auch eine neue automatisierte digitale Bildanalyse-Methode zur Auswertung von Immunfärbungen in Prostata-Gewebe-Mikroarrays?
4. Lassen sich durch die funktionelle Analyse eines neu identifizierten Kandidaten Rückschlüsse auf dessen Bedeutung in der Prostatakarzinogenese ziehen?

Um diese Fragestellungen zu klären, wurde ein Gewebe-Mikroarray aus klinisch definierten Prostatakarzinomen für die Untersuchung von Immunfärbungen hergestellt. Für die funktionelle Analyse wurde ein Panel repräsentativer Zelllinien aus Prostatakarzinomen verwendet.

Ziel dieser Arbeit war es, neue molekulare Marker in Prostatakarzinomen zu identifizieren und zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche der Progression der Prostatakarzinome zu Grunde liegen, beizutragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenmaterial

Das Tumorkollektiv umfasste 175 formalin-fixierte, paraffinisierte primäre Prostata-Adenokarzinome, welche von radikalen Prostatektomien aus den Jahren 1998 bis 2003 stammten. Die Karzinome wurden von Herrn Prof. H.-J. Gröne aus der Abteilung „Zelluläre und Molekulare Pathologie“ am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg diagnostiziert. Sie wurden von Frau Dr. E. F. Gröne von der Tumorbank dieser Abteilung zur Verfügung gestellt. Die Genehmigung zur Verknüpfung von Labordaten mit den klinisch-pathologischen Daten wurde von der lokalen Ethikkommission erstellt. Dieses Verfahren erfolgte in Übereinstimmung mit der offiziellen Anweisung der nationalen Ethikkommission der deutschen Bundesregierung vom März 2004. Zu den Adenokarzinomen standen folgende klinisch-pathologische Daten zur Verfügung: Patientenalter, pathologisches Tumorstadium nach TNM-Klassifikation (Tabelle 1), Gleason Scores nach dem „Grading“ System von D. Gleason (Tabelle 2) und ein zytologisches „Grading“, bei welchem das karzinogene Gewebe nach zellmorphologischen Kriterien eingeteilt wird. Zur Diagnose und Prognose werden international Gleason Score und TNM-Stadium verwendet. Das zytologische „Grading“ wird klinik-intern verwendet und ermöglicht eine Einteilung des Tumorgewebes auch in kleinen Gewebeproben wie Stanzbiopsien oder Stanzen auf Gewebe-Mikroarrays. Das Patientenalter zur Zeit der Prostatektomie lag zwischen 47 und 89 Jahren (Median: 67, Mittelwert: 66 Jahre). Die pathologischen Daten der 175 Patienten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Nicht zu allen Patienten war ein vollständiger Datensatz verfügbar. Vor der Konstruktion des Gewebe-Mikroarrays wurde in der Abteilung „Zelluläre und Molekulare Pathologie“ von jedem paraffinisierten Tumor Gewebeschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (H, E) angefärbt. Maligne Areale wurden von Pathologen (H.-J. Gröne, D. Trick) nach zytologischem „Grading“ beurteilt und ebenso wie benigne Areale (BPH) auf den Objektträgern markiert. An den entsprechenden Stellen wurden aus dem Gewebe Material zur Herstellung des Gewebe-Mikroarrays entnommen. Nach der Konstruktion des Gewebe

Mikroarray Blocks wurde jeder dreißigste Gewebe-Array Schnitt vom Pathologen überprüft. Sowohl Tumor als auch benignes Drüsengewebe war von 82 Patienten in ausreichendem Maße vorhanden und später auch auswertbar. Von weiteren 49 Patienten war nur Tumorgewebe, von weiteren 44 Patienten nur BPH auswertbar.

Tabelle 4 Pathologische Daten von 175 Patienten ^{a, b}

Pathologischer Faktor	Einteilung	Karzinome Fallzahl ^c	BPH ^d Fallzahl ^c
Gleason Score	2	2	2
	4	2	3
	5	15	25
	6	30	34
	7	31	24
	8	36	21
	9	9	6
Summe		125	115
pT-Stadium	pT2	60	80
	pT3	44	31
	pT4	5	2
	Summe	109	113
Zytologischer Grad	G1	3	4
	G1-G2	18	27
	G2	49	51
	G2-G3	46	32
	G3	11	7
Summe		127	121
Gesamte Fallzahl		131	126

BPH: benigne Prostatahyperplasie

^a 175 Patienten sind in die TMA-Analyse eingegangen. In 82 Fällen konnte sowohl Tumor- als auch BPH-Material ausgewertet werden. Von 49 Patienten konnte nur Tumor-, von 44 Patienten nur BPH-Material ausgewertet werden.

^b Patientenalter: 47-89 Jahre, Median: 67, Mittelwert: 66.

^c Pathologische Daten waren unvollständig.

^d gutartiges hyperplastisches Nachbargewebe von Tumoren mit der angegebenen pathologischen Klassifikation

Für statistische Analysen wurden die pathologischen Einteilungen in Gruppen zusammengefasst: Bei univariaten statistischen Analysen wurde das pathologische T-Stadium pT2 den Stadien pT3 und pT4 gegenübergestellt. Die Gradierung nach Gleason Score (GS) und die zytologischen Grade (G) wurden jeweils in drei Gruppen eingeteilt: GS5-6, GS7 und G8-9 bzw. hochdifferenziert (G1, G1-2), mäßig differenziert (G2) und gering differenziert

(G2-3, G3). Zur Erstellung eines multivariaten Modells wurden pT-Stadium und Gleason Score in je zwei Gruppen mit guter bzw. deutlich schlechterer Prognose zusammengefasst: organbegrenzte Tumoren (pT2) versus organüberschreitende Tumoren (pT3, pT4), hoch bis moderat differenzierte Tumoren (GS2-6) versus gering differenzierte Tumoren (GS 7-9).

2.1.2 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden für weiterführende Analysen eines Kandidaten aus der Gewebe-Mikroarray Studie verwendet:

Tabelle 5 Humane Zelllinien

Zelllinie	ATCC [®] Nummer	Herkunft der Zelllinie
BPH-1		BPH eines Patienten ohne Tumor
LNCaP	CRL-1740	Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms
DU-145	HTB-81	Fernmetastase (Gehirn) eines Prostatakarzinoms
PC-3	CRL-1435	Fernmetastase (Knochenmark) eines Prostatakarzinoms
22Rv1	CRL-2505	Nacktmaus Xenograft von primärem humanem Prostatakarzinom
HEK293	CRL-1573	Adenovirus Typ 5-transformierte embryonale Nierenzellen
Jurkat	TIB-152	akute T-Zell Leukämie

ATTC: American Type Culture Collection

2.1.3 Zellkultur

Tabelle 6 Produkte für die Zellkultur

Produkt	Firma
D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco BRL/ Invitrogen
Ham's F12	Gibco BRL/ Invitrogen
RPMI 1640	Gibco BRL/ Invitrogen
ITS (5µg/ml Insulin + 5µg/ml Transferrin + 5ng/ml Sodiumselenit)	Sigma, Heidelberg
FCS (fötale Kälberserum)	Sigma Aldrich
Penicillin 10000 U/ml	Gibco BRL/ Invitrogen
Streptomycin 100 µg/ml	Gibco BRL/ Invitrogen
Trypsin	Invitrogen

2.1.4 Primer

Sequenzinformationen zu Genen, Transkripten und STS-Markern wurden den öffentlichen Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.1.4.1 Primer für RQ-PCR

Tabelle 7 Primersequenzen für RQ-PCR

Gen	Primer forward (f) reverse (r)	Sequenz (5' 3') (5' 3')
BARK1	BARK12f	CAGTGTCATGCAGAAGTACCTG
	BARK14r	CTCCAGCTTCTCGTACTTCTTG
B2AR	ADRB21f	CTGTGCTGATCTGGTCATGG
	ADRB21r	AGTAGCGATGGACTGCGATC
B1AR	ADRB11f	GCTACAACGACCCCAAGTG
	ADRB11r	GAAGGCCATGATGCACAGG
PKA α	PRKACA3f	GAACCACTATGCCATGAAGATCC
	PRKACA4r	GAACTCGAGTTTGACGAGGAAC
PKC α	PRKCA3f	GGATAAGGGACCCGACACTG
	PRKCA4r	CCATAGAGCAGTGACCCACAG
ERK1	MAPK32f	CTTCGAACATCAGACCTACTGC
	MAPK33r	CTTGTACAGGTCAGTCTCCATC
ERK2	MAPK17f	GATTGAAGTAGAACAGGCTCTGG
	MAPK18r	TGTCGAACTTGAATGGTGCTTCG
SRC	SRC3f	AGTCTAGGACGGAGACAGAC
	SRC4r	ACGTAGTTGCTGGGGATGTAG
CREB1	CREB12f	AGCCACAGATTGCCACATTAGC
	CREB13r	GACTTGAAGTGTCTGCCATTG
HPRT1	HPRT2f	TGATGATGAACCAGGTTATGACCT
	HPRT23r	CAAGACGTTCAAGTCTGTCCA
TUBA1B	KALP23f	CCACAGTCATTGATGAAGTTCCG
	KALP34r	TCAGCCAGCTTGCGAATTCCG

2.1.5 Kits

Tabelle 8 Reaktionskits

Kit	Hersteller
CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (5000 Assays)	Promega

DAB-Substrat Kit	Linaris, Wertheim-Bettingen
RNA 6000 LabChip Kit	Agilent Technology, Palo Alto, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript II first strand synthesis kit	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR® Green 2x PCR-Mix	Abgene, Surrey, UK
Vectastain Universal ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.1.6 Nukleotide und Fluorochrome

Zur Herstellung der Nukleotidstammlösung (dNTP-Mix) wurden die Nukleotide dATP, dTTP, dCTP und dGTP (Ausgangskonzentration je 100mM) mit H₂O verdünnt (Endkonzentration je 2,5mM), sodass die Nukleotid-Gesamtkonzentration 10mM betrug.

Tabelle 9 Nukleotide und Fluorochrome

Bezeichnung	Hersteller
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Goat anti-mouse IgG-Cy5	Upstate, New York
Streptavidin Cy7	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.7 Antikörper

Tabelle 10 Antikörper

Antikörper α-	Hersteller	Verdünnung
GPCR-K2 (=BARK1) (5D5)	Invitrogen (Zymed), Paisley, USA	1/300
PP1alpha (N-19)	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA	1/150
nm23-H1 (NM301)	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA	1/50
FASN	Acris, Assay Design Inc., Ann Arbor, MI, USA	1/150
Cytokeratin 5	The Binding Site, Birmingham, UK	1/12000
NCL-cMYC (9E11)	Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK)	1/175
PP2A (FL-309)	Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)	1/100
PSA	DakoCytomation	1/4000
mouse, rabbit, goat, horse IgG (H+L), biotinylated	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	1/50

2.1.8 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Firma
(-)-Isoproterenol hydrochloride	Sigma-Aldrich, Heidelberg
Amminopropyltrimethoxysilan	Sigma-Aldrich, Heidelberg-Aldrich
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Heidelberg-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich, Heidelberg
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Heidelberg
DNA Polymerase I [10U/μl]	New England Biolabs, Schwalbach
DNase I amplification grade	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Hydrogen Peroxide	J.T. Baker, Deventer, NL
ICI 181,551	Sigma-Aldrich, Heidelberg
ICI 89406, 10mg	Biotrend GmbH, Köln
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
ITS (Insulin, Transferrin, Sodiumselenit)	Sigma-Aldrich, Heidelberg
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaun Lösung	AppliChem, Darmstadt
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Nuclease free water	Ambion, Frankfurt
Penicillin/Streptomycin	Eurobio, Raunheim
Random hexamer	Invitrogen, Karlsruhe
RNase H Rnase Zap	Ambion, Frankfurt
T4 Gene 32 Protein (cloned) 500ug	Amersham Biosciences
Terbutaline hemisulfate salt	Sigma-Aldrich, Heidelberg
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Heidelberg
Trizol	Gibco Life Technologies
Tween 20	Sigma, Heidelberg
Universal human reference RNA	Stratagene, Heidelberg
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.1.9 Geräte

Tabelle 12 Geräte

Tabelle 13

Gerät	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent/Caliper Technologies Corp.
240 pH/Temp Meter	Beckmann
7700 Sequence Detector	Abi Prism
7900 RT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Aruba Fluoreszenz Scanner	Carl Zeiss, Jena
Beckman GS-6KR Zentrifuge	Beckman
Beleuchtungssystem X-Cite 120FI	Carl Zeiss, Jena
Biofuge 13R, Biofuge Fresco, Biofuge pico	Heraeus
Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Clipso Schnellkochtopf, 6l (Art.Nr. 4113.40)	Tefal
CO2 Inkubator	Forma Scientific
Electronic power supply	NeoLab
Fluorescence Microscope Axioplan	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzausstattung mit Filterrad	Leica, Bensheim
GeneAmp PCR-System 9700	PE Applied Biosystems
Heizblock QBT2	Grant Instruments / CLF
HMT 702 C Mikrowelle	Robert Bosch GmbH
Hood Hera safe	Heraeus / Kendro
Mastercycler Gradient PCR-Maschine	Eppendorf
Mikroskop CKX41	Olympus
Multifuge 3 SR	Heraeus / Kendro
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies
PicoFuge	Stratagene
RC 5B Plus	Sorvall
Rotationsmikrotom Leica DSC1	Leica, Bensheim
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer MR3002	Heidolph Instruments
Tissue Chip Microarrayer	Beecher Instruments, Silver Spring, USA
Waagen BL 610 und BL150S	Sartorius AG
Wärmeschrank	memmert
Wärmeschrank Serie 6000	Heraeus / Kendro
Wasserbad K20	Haake
Wasserbad SW20C	Julabo Labortechnik
Wasserfiltrationsmaschine Millipore-Q UF Plus	Millipore

2.1.10 Software

Tabelle 14 Software

Software	Hersteller/Quelle
Adobe Photoshop 9	Adobe, USA
Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer-Biosizing (Version A.02.12Si292)	Caliper Technologies Corp.
BLAST (Basic Local Alignment Tool)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov (open source) und HUSAR (DKFZ)
EndNote 9	Thomson ResearchSoft, USA
GenePix 5,0	Axon, Foster City, USA
Microsoft Office XP	Microsoft, USA
R 2.1.0 und <i>Packages</i>	R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org .
SDS 2.1.1.	Applied Biosystems, Freiburg
SPSS 12	SPSS GmbH Software, München

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Gewebe-Mikroarrays

Vor der Konstruktion des Gewebe-Mikroarrays wurden Gewebeschnitte der in Paraffin eingebetteten Tumorproben angefertigt, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt und mikroskopisch detektierte Tumor- oder BPH-Areale entsprechend auf der Rückseite der Objektträger von Pathologen (H.-J. Gröne, D. Trick) markiert.

2.2.1.1 Konstruktion des Gewebe-Mikroarrays

Zur Herstellung eines Gewebe-Mikroarrays wurden Gewebestanden in einer bestimmten Anordnung in einen Paraffinblock eingebracht (Abb. 4). Dazu wurde der Paraffinblock im „Tissue Chip Mikroarrayer“ fixiert. Eine eingespannte Biopsienadel wurde mit Hilfe einer Mikrometerschraube, welche an ein x-y-Koordinatensystem gekoppelt war, positioniert und ein 0,6mm breites, ca. 3-4mm tiefes Loch in den Paraffinblock gestanzt. Anschließend wurde aus einem Gewebeblock an der Stelle, welche zuvor auf dem Objektträger markiert worden war, mit einer Biopsienadel eine Gewebeprobe entnommen. Diese wurde mit einem Metallstempel aus der Biopsienadel heraus- und in das vorgestanzte Loch des Paraffinblocks hineingedrückt. In einem Abstand von 0,8mm wurden die Gewebeproben in Reihen und Spalten in einer festgelegten Reihenfolge zu einem Gewebe Mikroarray Block angeordnet. Dieser enthielt 651 Biopsien von 175 Patienten, d. h. je 2-3 Biopsien pro Tumor und/oder BPH, was ausreichend sein sollte, um die Heterogenität des Tumorgewebes zu kompensieren (Torhorst et al., 2001).

2.2.1.2 Herstellen von Gewebe Chips

Der Gewebe Mikroarray Block wurde für 15min bei 37°C erwärmt, um die Einbindung der paraffinisierten Gewebebiopsien in das umgebende Paraffin zu verbessern. Anschließend wurde der Mikroarray Block gekühlt und mit einem Rotationsmikrotom 5µm dünn geschnitten. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad gegeben, wo sie sich auf der

Wasseroberfläche entspannten. Sie wurden auf silanisierte Objektträger gezogen, bei 37°C über Nacht getrocknet und in einer Gewebeschnitte-Box bei RT gelagert.

Jeder 30ste Schnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und von Pathologen (s. o.) auf das Vorhandensein von BPH und Tumorgewebe überprüft und der zytologische Tumorgrad bestimmt.

2.2.1.3 Silanisieren von Objektträgern

Die Oberfläche der Objektträger wurde silanisiert, um die Haftung der Gewebearray-Schnitte zu verbessern. Dazu wurden unbehandelte Glasobjektträger gesäubert und für 15sec in eine 2% 3-Aminopropyltrimethoxysilan- Lösung (in Aceton) getaucht. Die silanisierten Objektträger wurden anschließend für 15sec in Aceton und 2x für je 15sec in Aqua bidest gewaschen und über Nacht getrocknet.

2.2.2 Analyse von Genom- und Transkriptom-Datensätzen

Um die häufigsten chromosomalen Imbalancen bei primären, nicht-metastasierten Prostatakarzinom (T2-4N0M0) zu bestimmen, wurde eine Analyse publizierter genomischer Veränderungen durchgeführt, indem Daten von 145 Prostatakarzinomen aus sechs konventionellen CGH-Studien (Akers et al., 2001; Sattler et al., 1999; Steiner et al., 2002; Verdorfer et al., 2001; Wolter et al., 2002) und 16 Karzinomen aus einer vergleichenden cCGH/ array CGH Studie verglichen wurden (Paris et al., 2003). Bei diesen Studien waren für jeden Tumor sowohl die TNM-Klassifikation als auch die chromosomalen Imbalancen öffentlich zugänglich, sodass die minimal überlappenden chromosomalen Regionen der 161 Karzinome identifiziert werden konnten.

Um Kandidatengene zu identifizieren, welche direkt von diesen chromosomalen Imbalancen betroffen sein könnten, wurden die minimal überlappenden Regionen mit den chromosomalen Lokalisationen der 500 bei Prostatakarzinomen am stärksten differentiell exprimierten Genen verglichen. Letztere entstammten einer Meta-Analyse, in der vier unabhängige Expressions-Mikroarray Datensätze verglichen wurden, welche 61 primäre Prostatakarzinome beinhalteten (Rhodes et al., 2002).

2.2.3 Immunhistochemie (IHC) Studie an Prostata-Gewebe-Mikroarrays

Eine explorative Datenanalyse von Genom- (cCGH- und aCGH-Daten) und Transkriptom-Datensätzen (Expression Mikroarray-Daten) lieferte Kandidaten, deren Proteinstatus in Prostatakarzinomen und BPH auf Gewebe-Mikroarrays bestimmt wurde. Der jeweilige Proteinstatus wurde mit den zur Verfügung stehenden klinisch-pathologischen Daten verglichen.

2.2.3.1 Immunhistochemie (IHC)

Mit Immunhistochemie (IHC) können Proteine im Gewebe sichtbar gemacht werden. Die IHC beruht auf der spezifischen Bindung eines Primärantikörpers an Epitope auf der Proteinoberfläche. Bei Verwendung eines ABC-Detektionssystems binden sekundäre, biotinylierte Antikörper an den Primärantikörper und werden ihrerseits von Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexen gebunden, basierend auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin für Biotin (Abb. 5). Die gebundene Peroxidase (horse raddish peroxidase, HRP) katalysiert die Oxidation des löslichen, fast farblosen Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Dabei wird Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert. Die Oxidationsprodukte polymerisieren zu einem amorphen, unlöslichen Farbstoff. Positive Immunreaktionen erscheinen somit in einem bräunlichen Farbton. Als Gegenfärbung dient Hämalaun, welches Zellkerne hellblau erscheinen lässt.

Durch die Verwendung eines mehrstufigen Detektionssystems können durch Signalamplifikation auch gering exprimierte Proteine im Gewebe lokalisiert werden. Abgesehen von der Proteinkonzentration im Gewebe ist die Signalstärke jedoch auch abhängig von der Fixierungsart und Vorbehandlung der Präparate sowie den Reaktionsbedingungen (Temperatur, Konzentrationen, Inkubationszeiten, pH-Wert, Salzkonzentration). Diese Parameter müssen konstant gehalten werden, um Signalintensitäten in verschiedenen Gewebeproben vergleichen zu können. Zur standardisierten IHC-Auswertung ist es daher ideal, alle Gewebeproben gemeinsam zu behandeln, was durch die Verwendung von Gewebe-Mikroarrays möglich ist.

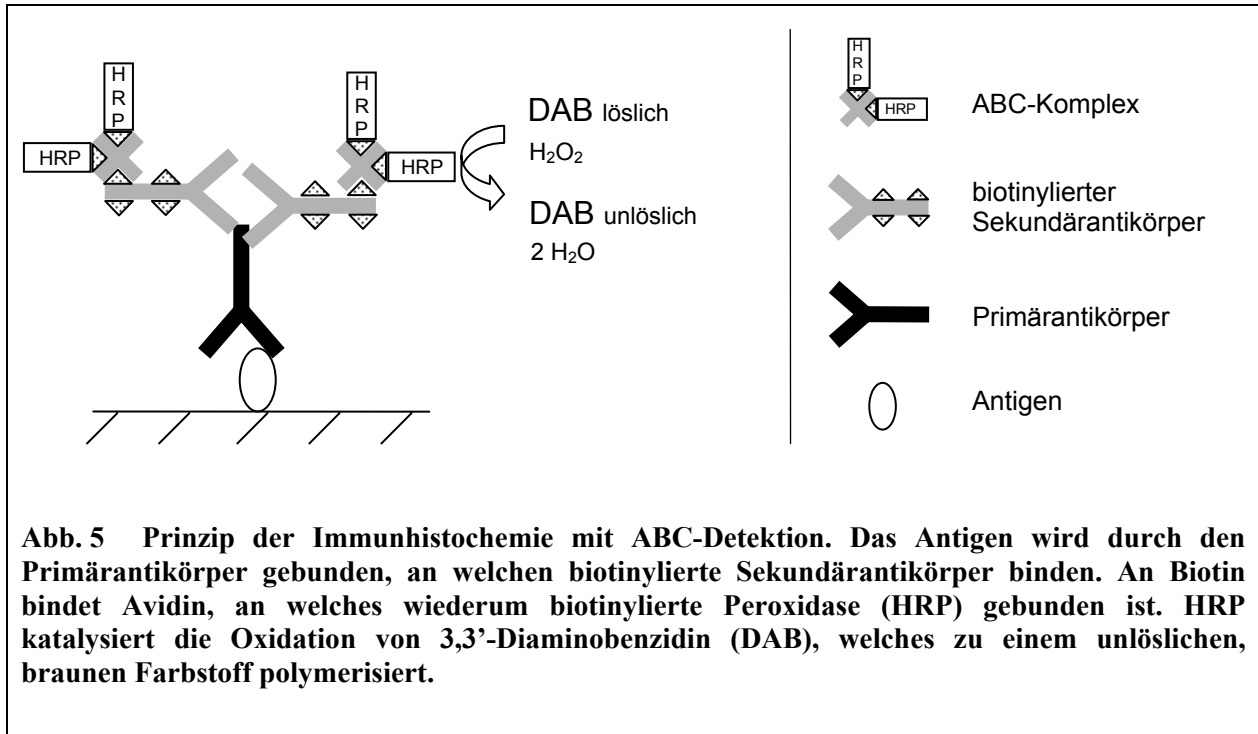


Tabelle 15 Lösungen für die Immunhistochemie

10x Citratpuffer	10mM Tri-Na-Citrat-Dihydrat pH 6,0, autoklavieren
Tris-EDTA-Puffer	10mM Tris 1mM EDTA pH 9,0
3% H2O2	30% H2O2-Lösung 1x PBS
10x PBS (phosphate buffered saline)	80g NaCl 14g Na2HPO4 2,4g KH2PO4 2g KCl ad 1,0 l aqua dest.
ABC-Reagenz (Vectastain ABC-Kit, Vector, Burlingame, CA, USA)	980µl 1x PBS 1µl Triton X-100 10µl Reagenz A 10µl Reagenz B 30min bei RT reagieren lassen
50mM NaHCO3	pH 9,6

Die Schnitte der formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebestücke oder die Gewebe-Mikroarray-Schnitte wurden vor der IHC-Färbung 2 x 5min in Xylol entparaffinisiert. Das Xylol wurde in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 2min 100% EtOH, 2min 96% EtOH, 2min 70% EtOH) aus dem Gewebe entfernt und das Gewebe 1min in Aqua dest. gewaschen. Zur Demaskierung der durch die Formalinfixierung veränderten Antigene wurde eine Hitzebehandlung durchgeführt. Dafür wurden die Gewebe-Mikroarray Schnitte je nach Antikörper für 10-20min in der Mikrowelle bei 400Watt in siedendem Citratpuffer behandelt. Für MYC wurde Tris-EDTA-Puffer verwendet. Anschließend kühlten die Schnitte in der Pufferlösung für 20min bei Raumtemperatur ab, wurden 1min in Aqua dest. gewaschen, luftgetrocknet und 5min in 1x PBS geschwenkt. Das Gewebe bzw. der Mikroarray wurde mit Fettstift umrandet, um in späteren Schritten eine Diffusion von Blocking- und Antikörperlösung über den Gewebe-Rand hinaus zu vermeiden. Nach 5-minütigem Waschen in PBS wurde die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes mit 3% H₂O₂ gehemmt und der Schnitt erneut in PBS gewaschen (2 x 5min). In einer feuchten Kammer wurden unspezifische Bindungsstellen für 1h mit 1% Normalserum (Blutserum der Tierart, aus welcher der im Folgenden eingesetzte Sekundärantikörper stammt) geblockt. Bei Verwendung des NM23-H1-Antikörpers wurde mit 3% BSA geblockt. Über Nacht erfolgte bei 4°C die Bindung des in Blockinglösung verdünnten Primärantikörpers. Alle Antikörper, welche auf den Gewebe-Mikroarrays ausgewertet wurden, sind zusammen mit den verwendeten Verdünnungen in Tabelle 10 angegeben. Nicht-gebundene Antikörper wurden in PBS abgewaschen (2 x 5min) und mit biotinyliertem Sekundärantikörper (2% Sekundärantikörper (Tabelle 10), 2% Serum bzw. 6%BSA in PBS) für 30min inkubiert. Nach dem Waschen in PBS (2 x 5min) wird das ABC-Reagenz aufgetragen. Nach 30-minütiger Inkubation werden nicht gebundene Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe in PBS abgewaschen (2 x 5min). Als Substrat für gebundene Peroxidase wurde DAB zusammen mit Wasserstoffperoxid (DAB Substrat Kit, Linaris, Wertheim-Bettingen) zugegeben und maximal 10min inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch NaHCO₃ (pH 9,6, 10min) gestoppt, das Gewebe kurz in Aqua dest. gewaschen, in Hämalaun gegengefärbt und überflüssiger Farbstoff 10min in fließendem Leitungswasser ausgespült. Das Gewebe wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (15sec 70% EtOH, 15sec 96% EtOH, 1min 100% EtOH, 2min 100% EtOH) und 2 x 5min mit Xylol behandelt. Abschließend wurde das Gewebe zur Fixierung in Eukitt eingedeckt und luftgetrocknet. Die Präparate wurden in einer Box bei RT aufbewahrt und später im Lichtmikroskop ausgewertet.

Optimierung der IHC für Gewebe-Mikroarrays

Um die Eignung der Primärantikörper zum Einsatz in der IHC an paraffinisiertem Prostatagewebe zu überprüfen, wurden die Antikörper zuerst an Einzelgewebeschnitten getestet. Nach Optimierung der Antikörperverdünnung, der Antigen-Demaskierung (Pufferwahl, Hitzebehandlungsdauer) und der Blockierung unspezifischer Bindestellen wurde die zelltypspezifische und subzelluläre Lokalisation der Antikörperfärbung vom Pathologen (H.-J. Gröne) begutachtet. Die Reaktionsbedingungen wurden an kleinen Gewebe-Mikroarrays, welche zu Test-Zwecken hergestellt worden waren, weiter optimiert, um für alle Gewebeproben Färbeintensitäten auf einer Skala von negativ bis stark positiv zu erhalten (d. h. eine Überfärbung oder zu schwache Färbung der Proben zu vermeiden) und somit eine semiquantitative Auswertung zu ermöglichen.

IHC an Prostatagewebe-Mikroarrays

Aufgrund der starken Heterogenität der Prostatakzinome wurde die IHC mit den verschiedenen Primärantikörpern an aufeinander folgenden Gewebe-Mikroarray-Schnitten durchgeführt. Je ein Schnitt vor und nach den IHC-gefärbten Schnitten wurde Hämatoxylin-Eosin gefärbt und vom Pathologen (H.-J. Gröne) auf die Anwesenheit von BPH und malignem Gewebe überprüft und Karzinome nach zytologischem „Grading“ nachdiagnostiziert.

Ein Vorteil der immunhistochemischen Färbung gegenüber der Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen ist die gute Erkennbarkeit der Gewebemorphologie. Somit können benigne und maligne Drüsenzellen optisch von anderen Zelltypen unterschieden werden. Um die Identifikation von Drüsenzellen zu erleichtern, wurden in einem Gewebearray Drüsenzellen spezifisch mit einem Antikörper gegen das prostataspezifische Antigen (PSA) markiert, welches ausschließlich von prostatistischen Drüsenzellen synthetisiert wird. Um in jeder Biopsie auf dem Gewebe-Mikroarray maligne von benignen Drüsen (BPH) zu unterscheiden, wurden die Basalzellen mit dem Basalzellmarker Cytokeratin 5 angefärbt. BPH sind zumindest teilweise von Basalzellen umgeben, während maligne Drüsen durch den Verlust der Basalzellen gekennzeichnet sind.

Externe negative Kontrollen wurden ohne Primärantikörper hergestellt und zeigten keine unspezifischen Färbungen. Externe positive Kontrollen stellten Gewebeschnitte dar, die eine deutlich positive Färbung der Adenokarzinom-Bereiche aufwiesen. In den Gewebe-Mikroarrays dienten Gewebeproben mit negativ gefärbten Drüsen als interne negative Kontrollen. Gewebeproben, welche bereits in vorangehenden Experimenten positiv reagiert hatten, dienten als interne positive Kontrollen.

2.2.3.2 Auswertung der Antikörperfärbungen

Ausschließlich Antikörper, welche die glandulären Zellen der Adenokarzinome bzw. der BPH anfärbten, wurden ausgewertet. Dabei wurden zytoplasmatische (MYC, BARK1, PP1 α , PP2A, FASN) und nukleäre Immunfärbungen (PP1 α , PP2A, NM23-H1) separat ausgewertet. Die Färbungsintensität wurde semi-quantitativ in negativ (-), schwach positiv (+), moderat positiv (++) und stark positiv (+++) eingeteilt. Jeder Antikörper wurde von zwei Personen (Frauke Devens, Ilka Prowatke) doppel-blind ausgewertet (Kriterium: <15% Varianz). Da von jedem Patienten 2-3 Tumor- und/ oder BPH Proben vorlagen, wurde der jeweilige Mittelwert der Immunfärbungen bestimmt. Für die statistischen Auswertungen wurden die Mittelwerte der Immunfärbungen in zwei Kategorien zusammengefasst: negativ und positiv. Auf Grund der niedrigen Anzahl an völlig negativ gefärbten Proben enthielt die negative Kategorie die schwach positiven Färbungen.

2.2.3.3 Statistische Auswertung der IHC-Ergebnisse

Um Beziehungen zwischen den Immunfärbungen und klinisch-pathologischen Parametern aufzudecken, wurden statistische Analysen mit Hilfe der Statistik Software SPSS 12.0 (SPSS GmbH Software, München) durchgeführt.

Um univariate Korrelationen aufzudecken, wurden **Pearson's χ^2 -Test** und **Fischer's-Exakt Test** verwendet. Diese Tests evaluieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei (Fischer) oder mehreren (χ^2 -Test) Gruppen in einem Datensatz. Ergebnisse mit einem Wahrscheinlichkeitswert (*P*-Wert) $\leq 0,05$ wurden als signifikant erachtet. Da bei multiplem Testen (alle Immunfärbungsergebnisse gegen alle Klinisch-pathologische Daten) die Wahrscheinlichkeit steigt, dass einige der *P*-Werte $< 0,05$ falsch-positiv sind, wurde die familienweise Fehlerrate für 5% falsch-positive Werte korrigiert. Dazu wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur, eine konservative Korrektur für multiples Testen, verwendet (Software Paket R, Version 2.1.0). Diese Korrektur wurde für jeden der klinisch-pathologischen Parameter unabhängig vorgenommen. Falls nicht anders angegeben, beziehen sich die *P*-Werte im Text jedoch auf die ursprünglichen, nicht-korrigierten *P*-Werte.

Multivariate Analyse: Um gleichzeitig den Einfluss mehrerer Faktoren (IHC-Ergebnisse) auf eine Zielvariable (pathologischer Parameter) untersuchen zu können, wurde die **binäre logistische Regression** zusammen mit einer moderaten Rückwärtsselektion verwendet. In das multivariate Modell wurden die Daten aller Patienten eingeschlossen, von denen vollständige IHC- und pathologische Datensätze vorhanden waren. Bei der Rückwärtsselektion wurden

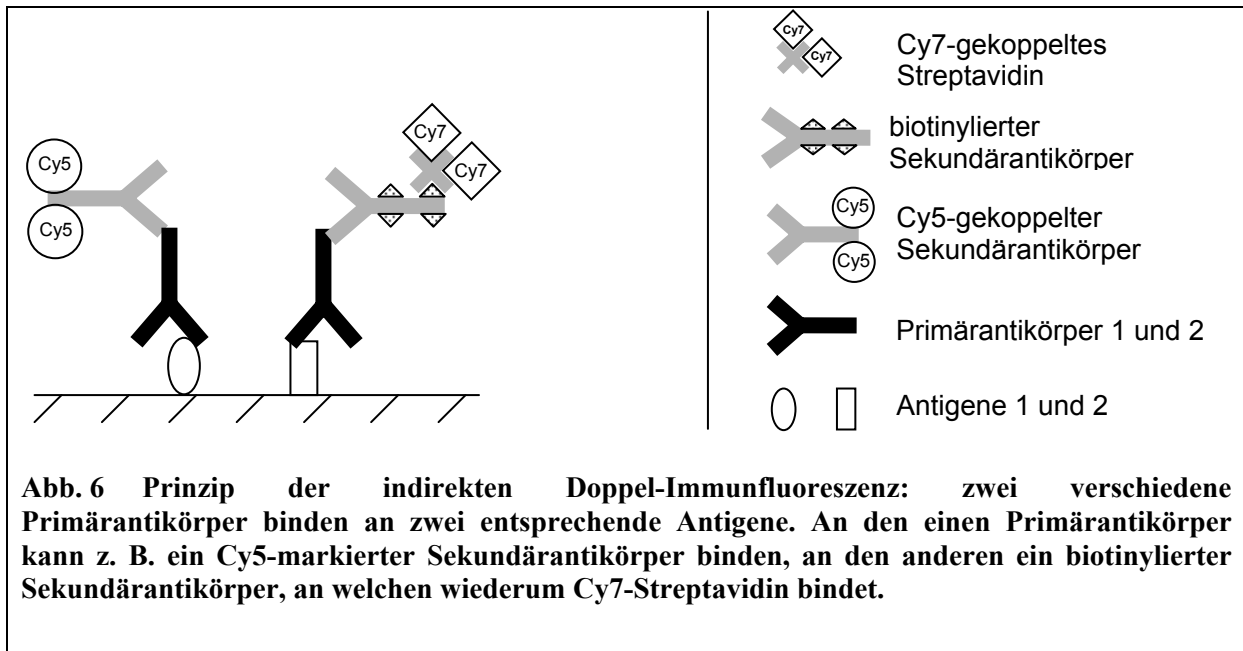
diejenigen Faktoren, welche keinen signifikanten Einfluss auf die Zielvariable hatten, sukzessive aus dem Modell herausgenommen. (Der Signifikanzwert, bei der ein Faktor im Modell blieb, lag bei 0,5.) Zum Schluss sind nur noch diejenigen Faktoren (1 bis mehrere) im Modell, welche die Zielvariable, in diesem Fall einen prognostischen pathologischen Parameter, am besten beschreiben ($P \leq 0,05$).

2.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Bei der indirekten Immunfluoreszenz (IF) erfolgt die Detektion des Antigens über ein Fluoreszenz-System (Abb. 6) anstelle der bei der konventionellen IHC zumeist verwendeten farbgebenden Enzym-Substrat-Reaktion (Abb. 5). Entsprechend wird die IF wie die oben beschriebene IHC durchgeführt, jedoch bindet an den Primärantikörper ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper oder ein biotinylierter Sekundärantikörper, an den wiederum Fluorochrom-konjugiertes Streptavidin bindet.

2.2.4.1 Indirekt Doppel-Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Doppel-Immunfluoreszenz (Abb. 6) wurden die Gewebeschnitte oder Gewebe-Mikroarray-Schnitte wie bei der oben für die IHC beschriebenen entparaffiniert, die Antigene hitzedemaskiert und unspezifische Bindestellen geblockt. Anschließend wurden sie mit zwei Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies inkubiert (ü.N., 4°C), gewaschen (2 x 5min PBS) und mit zwei Sekundärantikörpern (2%ig verdünnt in PBS, 2% Serum) inkubiert (45min, RT). Es wurden ein biotinylierter und ein Cy5-markierter Sekundärantikörper (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern wurde wiederholt (je 15min, RT) und das Gewebe in Streptavidin-Cy7 (Amersham, Freiburg) (1:500 in PBS, 15min) inkubiert. Nach jedem Schritt wurde 2-3 x 5min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne bzw. das Chromatin in DAPI (200ng/ml in 2x SSC) gegengefärbt (7min), in DAPI-Waschlösung (0,5ml/l Tween in 2x SSC) (5min) und Aqua bidest (2 x 1min) gewaschen. Das Gewebe wurde im Dunkeln getrocknet und die Fluoreszenzsignale bei geeigneten Wellenlängen eingescannt.



2.2.4.2 Automatisierte quantitative Auswertung von Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen

Um die Färbungsintensitäten quantitativ mit einem automatisierten Auswerteverfahren messen zu können, wurden Gewebe-Mikroarrays mittels Immunfluoreszenz gefärbt und die Fluoreszenzsignale eingescannt. Dazu wurde ein Fluoreszenz-Scanner „Aruba“, ein Prototyp der Firma Zeiss, verwendet. Der Aruba Scanner war mit einem 20x Objektiv und dem Beleuchtungssystem X-Cite120 Fl, einer 120W Metall Halogenid Lampe mit Flüssig-Lichtleiter (Zeiss, Jena) zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe ausgestattet. Die Belichtungsdauer betrug für die Fluoreszenzfarbstoffe Cy5 und Cy7 450ms, für DAPI 250ms. Für jeden Farbstoffkanal wurde bei einer maximalen Auflösung von 1,6nm eine digitale Abbildung des Gewebearrays als 12Bit Graustufenbild erzeugt und direkt durch die Software „Image Tool“ (Zeiss, Jena) als Falschfarbenbild dargestellt. Die Graustufenbilder wurden in die Mikroarray Analysesoftware GenePix 5.0 (Axon, USA) importiert und ausgewertet. Mit Hilfe dieses Programmes wurde ein Gitter auf das DAPI-Bild des Arrays gelegt und die Biopsien kreisförmig gekennzeichnet. Anschließend konnten fehlende, unvollständige oder nicht-auswertbare Biopsien als solche gekennzeichnet und von der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen werden. Die auswertbaren Biopsien auf den Cy5- bzw. Cy7-Immunfluoreszenz-Abbildungen wurden analysiert, indem die Farbintensitäten pixelgenau bestimmt wurden. Anschließend wurden für jede Biopsie Mittelwert, Median und Standardabweichung aus den Immunfluoreszenzintensitäten berechnet.

Da Prostatakarzinom und BPH eine heterogene Gewebemorphologie aufweisen, enthielt jede Gewebebiopsie unterschiedlich große Bereiche mit malignen bzw. benignen (BPH) Zellen und Bindegewebe. Um ausschließlich die Fluoreszenzintensitäten in den jeweiligen Tumor- bzw. BPH-Bereichen analysieren zu können, wurden diese mit Hilfe eines PSA-Antikörpers fluoreszenzmarkiert (Cy7). Auf der eingescannten Abbildung wurden diese Bereiche mit Hilfe der Software GenePix 5,0 (Axon, USA) gekennzeichnet und daraus eine digitale Maske erstellt. Das zu untersuchende Antigen war im Zuge einer Doppel-Immunfluoreszenz-Färbung mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff (Cy5) markiert worden. Die Fluoreszenzintensitäten wurden durch digitale Bildanalyse mittels GenePix ausschließlich innerhalb dieser Maske ermittelt und der Mittelwert berechnet.

2.2.4.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der Immunfluoreszenzanalyse

Student's T-Test wurde verwendet, um herauszufinden, ob sich frühe und weiter fortgeschrittene Tumoren bezüglich der Immunfluoreszenz-Scan-Mittelwerte signifikant unterscheiden. Für den T-Test werden numerische Werte (IF-Scan Mittelwerte) nach den zugehörigen binären Werten (klinisch-pathologischer Parameter) eingeteilt und anschließend getestet, ob sich die beiden Gruppen unterscheiden.

Um herauszufinden, ob die Ergebnisse der digitalen Immunfluoreszenz-Analyse (Scan-Mittelwerte) („IF-Ergebnisse“) mit den Ergebnissen der visuellen IHC-Auswertung („IHC-Ergebnisse“) bei Verwendung des gleichen Antikörpers und des gleichen Gewebe-Mikroarrays vergleichbar sind, wurden Korrelations-Tests der gepaarten Werte (d. h. der „IF-Ergebnisse“ und der „IHC-Ergebnisse“ der gleichen Patientenproben) durchgeführt. Bei Korrelations-Tests werden zwei numerische Variablen (d.h. die „IF-“ und „IHC-Ergebnisse“) miteinander verglichen. Bei der **Pearson's Produkt Moment Korrelation** wird von intervallskalierten Variablen (Messwerten) und einem linearen Zusammenhang der gepaarten IF und IHC-Werte ausgegangen. Die **Rangkorrelation von Spearman** ist ein Spezialfall der Korrelation von Pearson, bei der die Messwerte in Ränge konvertiert werden (Rang: nach Größensortierung der Messwerte wird jedem Wert eine fortlaufende Nummer (Rang) zugeteilt). Somit braucht der Zusammenhang zwischen den Variablen („IF-“ und „IHC-Ergebnisse“) nicht linear zu sein und die Merkmale (Messwerte) können ordinalskaliert sein, d. h. die Abstände zwischen den Kategorien (bei der visuellen IHC-Auswertung: -, +, ++, +++) müssen im Gegensatz zu intervallskalierten Messwerten nicht exakt gleich sein. Bei allen Tests wurden P -Werte $< 0,05$ als signifikant erachtet.

2.2.5 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien (Tabelle 5) wurden in Zellkulturflaschen in einem Inkubator mit 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in den entsprechenden Medien (Tabelle 6, Tabelle 16) kultiviert.

Tabelle 16 Medien für die Zellkultur

Zelllinie	Medium
BPH-1	80% (v/v) RPMI 1640, 20% (v/v) FBS (fetal bovine serum), P/S, ITS
22Rv1	40% (v/v) D-MEM, 40% (v/v) RPMI 1640, 20% (v/v) FBS, P/S
PC-3	45% (v/v) Ham's F12, 45% (v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) FBS, P/S
LNCaP, DU-145, HEK, Jurkat	90% (v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) FBS, P/S

P/S: 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin

ITS: 5µg/ml Insulin + 5µg/ml Transferrin + 5ng/ml Sodiumselenit

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert: Bei adhärenenten Zellen wurde das alte Medium entfernt, die Zellen 2 x in 1xPBS mit 0,02% EDTA gewaschen und mit 0,25% Trypsin in 1x PBS vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in vorgewärmtem Medium resuspendiert und 1:5 bis 1:10 verdünnt (LNCaP: 1:3) in neue Flaschen überführt. Suspensionszellen (Jurkat) wurden 1:10-1:20 verdünnt und in neuen Flaschen kultiviert.

Zur Gewinnung von Zellen z. B. für die Isolation von RNA wurden die Zellen pelletiert (1000 rpm, Beckman GS-6KR Zentrifuge, 7min), das Medium abgesaugt und das Pellet bei -80°C gelagert.

Für die Langzeit-Lagerung von Zellen zur späteren Re-Kultivierung wurden die Zellen pelletiert, in Medium mit 10% (v/v) DMSO rückgelöst, in Cryo-Röhrchen überführt, über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter langsam auf -80°C abgekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Re-Kultivierung wurden die Zellen in 5ml warmes Medium überführt. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO zu entfernen, und die Zellen weiter kultiviert.

2.2.6 Proliferations-Assay

Der mögliche Einfluss pharmakologisch wirksamer Substanzen auf die Proliferation diverser Zelllinien wurde mit Hilfe eines Proliferations-Assays (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) untersucht. Das Nachweisverfahren beruht auf der Reduktion eines Tetrazolium Salzes („MTS“) zu löslichem Formazan durch Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen. Die Quantität des Formazan Produktes wurde durch Messung der Absorption bei 490nm im ELISA Reader bestimmt und ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Die lineare Korrelation zwischen Absorption und Zellzahl wurde durch Messung einer Standardreihe überprüft (0, 1000, 2000, 4000 und 8000 Zellen/ Kammer).

Zur Durchführung der Versuchsreihen wurden für jede Zelllinie fünf 96 Well Zellkulturplatten mit je 1000 Zellen/ Kammer bestückt. Diese Zellzahl gewährleistete ein gutes Anwachsen und ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen in allen Kammern. Die Zellen wurden alle 24h mit je einer pharmakologischen Substanz der Konzentrationen 0nM, 10nM, 100nM, 1µM und 10µM in Duplikaten behandelt. Der Einfluss der Substanzen auf die Zellproliferation wurde untersucht, indem an fünf aufeinanderfolgenden Tagen die adhärenenten Zellen jeweils einer Platte/ Zelllinie abgelöst, mit MTS/ Phenazin Methosulfat -Lösung wie im Assay-Protokoll beschrieben behandelt und die Absorbtion gemessen wurde. Somit konnte die Proliferation behandelter und unbehandelter Zellen in einer Zeitreihe verglichen werden.

2.2.7 Real-time quantitative PCR (RQ-PCR)

Die Real-time quantitative PCR dient zur relativen Quantifizierung der Expression von Ziel-Genen. In diesem Projekt wurde der Kurzzeit-Einfluß vier verschiedener Substanzen auf die Expression von Genen in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dazu wurde RNA aus Zellen isoliert, welche 2h oder 4h unter dem Einfluss von 0nM, 1nM oder 10nM der vier Effektoren standen. Qualität und Quantität der isolierten RNA wurden überprüft, RNA in cDNA umgeschrieben und mittels RQ-PCR die Expression der Ziel-Gene im Verhältnis zu Haushaltsgenen quantifiziert.

2.2.7.1 RNA Präparation aus Kulturzellen

Zellen, welche vor der Ernte für 2h oder 4h mit verschiedenen Effektoren inkubiert wurden, sowie unbehandelte Kontrollproben wurden in 12-Well-Kulturplatten kultiviert, um eine Ausbeute von ca. 5×10^6 Zellen zu erlangen. Die Zellen wurden pelletiert, bei -80°C zwischengelagert und Gesamt-RNA nach Anleitung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) gewonnen. Dieses Verfahren eignet sich zur Aufreinigung von Gesamt-RNA ($>200\text{b}$), welche zur Analyse mittels RQ-PCR ebenso geeignet ist wie eine zum Vergleich ebenfalls durchgeführte Aufreinigung mit vorgeschalteter Trizol Behandlung.

2.2.7.2 RNA Quantitäts- und Qualitätsbestimmung

Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde spektrophotometrisch mittels Nano-Drop Technologie bestimmt. Die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen basiert auf der Absorption von Nukleinsäuren im UV-Bereich mit einem Absorptionsmaximum bei 260nm. Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei einem Strahlenweg von 1cm wie folgt berechnet:

$$[\text{RNA}_{\text{ds}}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 42 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, bedingt durch die Absorption der aromatischen Aminosäurereste, bei 280nm. Durch Bestimmung des Quotienten von $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ lässt sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Reine RNA-Lösungen weisen Werte um 2,0 auf. Deutlich niedrigere Werte deuten auf Kontaminationen mit Proteinen oder Phenolen hin. Zur exakten Überprüfung der Integrität und Quantität der RNA wurde der Agilent 2100 Bioanalyser nach Vorgaben des RNA 6000 Nano Assay Protokolls verwendet. In Kombination mit den dargestellten Absorptionsspektren kann hierbei durch Auftrennung der RNA nach Größe zusammen mit einem RNA-Größenstandard analog zur herkömmlichen Gelelektrophorese beurteilt werden, ob die Proben degradiert oder intakt sind.

2.2.7.3 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird mRNA in einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. CDNA ist wesentlich stabiler und kann somit anstelle der mRNA als Matrize in der RQ-PCR eingesetzt werden. Um auch leicht degradierte mRNA amplifizieren zu können, wurden Random Hexamer-Primer verwendet.

Zur Umschreibung von 1µg RNA in einem Gesamtansatzvolumen von 20µl werden 1µg RNA in 8µl RNase-freiem Wasser mit 2µl 5x 1st strand buffer (Superscript II first strand synthesis kit, Invitrogen) und 1µl DNase (amplification grade 1) für 15min bei RT inkubiert, um etwaige DNA-Verunreinigungen zu beseitigen. Anschließend wurden 3µl Mastermix 1, welcher zu gleichen Teilen EDTA (25mM), dNTP-Mix (10mM) und Random Hexamer Primer (300ng/µl) enthielt, zugegeben und in der Mastercycler Gradient PCR-Maschine zur Auflösung störender Sekundärstrukturen für 10min bei 65°C inkubiert. Die Primerbindung an die RNA (Annealing) erfolgte bei 25°C für 10min. Nachfolgend wurden 5µl Mastermix 2 zugegeben, welcher 2µl 5x 1st strand buffer, 2µl DTT (0,1M) und 1µl RNase freies Wasser enthielt und 2min bei 42°C inkubiert. Die Umschreibung der RNA erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkriptase Superskript II (1µl) unter Zugabe des Einzelstrang-bindenden T4 Gen 32-Proteins (0,2µl) bei 42°C für 50min. Anschließend wurde das Enzym für 10min bei 95°C inaktiviert.

Zusammen mit den RNA-Proben aus Zelllinien wurde bei jeder RT Referenz-RNA (Universal human Reference RNA, Stratagene) mit umgeschrieben. Die resultierende Referenz-cDNA wurde bei nachfolgenden RQ-PCR Experimenten jeweils zusammen mit den gemeinsam umgeschriebenen Proben-cDNAs eingesetzt, um einen Einfluss verschiedener RT-Reaktions-Effizienzen auf die RQ-PCR Ergebnisse zu vermeiden.

Negativkontrollen enthielten DNase, aber keine reverse Transkriptase. Sie stellten sicher, dass DNA in der nachfolgenden RQ-PCR nicht als Matrize diente. Diese Bedingung galt als erfüllt, wenn innerhalb von 5 Zyklen nach dem produktspezifischen CT-Wert (s. u.) kein PCR-Produkt erschien.

2.2.7.4 Real-time quantitative PCR (RQ-PCR)

Die Real-time quantitative PCR ermöglicht die relative Quantifizierung spezifischer mRNA-Moleküle, nach deren Umschreibung in cDNA. Die Ausgangsmenge der spezifischen cDNA lässt sich während der log-linearen Phase der PCR-Reaktion, in der die Amplifikationseffizienzen annähernd konstant sind, aus der generierten Produktmenge

berechnen. Die Messung der Produktzunahme geschieht über die Detektion von Fluoreszenzlicht, welches proportional zur Produktzunahme generiert wird. Bei den verwendeten Detektionssystemen wird dazu der Farbstoff SYBR-Green I eingesetzt. Während des Elongations-Schrittes der PCR-Reaktion interkaliert SYBR-Green I in die kleinen Furchen der nun doppelsträngigen DNA-Bereiche und fluoresziert nach Anregung bei 480nm. Die Fluoreszenzintensität wird am Ende jedes Elongations-Schrittes gemessen. Das ermöglicht die Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit („Real Time“).

Primerdesign und -validierung

Um eine Auswirkung möglicher genomischer Kontaminationen der eingesetzten cDNA-Proben auf die RQ-PCR zu vermeiden, wurden Primerpaare auf Exons ausgewählt, die durch lange Introns ($>>1000\text{bp}$) getrennt sind. Bei Genen ohne Introns wurde anhand einer „Negativkontrolle“ (RT-Ansatz mit DNase, ohne reverse Transkriptase) sichergestellt, dass potentielle genomische Kontaminationen in der RQ-PCR nicht als Matrize dienen (2.2.7.3). Weitere Kriterien zur Primerwahl waren eine Schmelztemperatur von ca. 60°C , eine Amplifikatlänge zwischen 90 und 170bp, um das Amplifikat in der Schmelzkurvenanalyse (s.u.) deutlich von Primerdimeren unterscheiden zu können, ein GC-Gehalt zwischen 45% und 60%, keine [GC]-Bereiche $>4\text{bp}$ Länge und keine Sequenzwiederholungen. Die Primerpaare wurden digital auf komplementäre Sequenzen und Ausbildung störender Sekundärstrukturen (Haarnadeln) überprüft. Mit dem Programm „BLAST“ wurde die Sequenzspezifität der Primer in genomischen und Transkript-Datenbanken überprüft. Des Weiteren wurde die Spezifität der Primer an einer Referenz-cDNA, einer humanen genomischen Referenz und einer Negativreferenz (H_2O) in Duplikaten in einer RQ-PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse (s.u.) überprüft, bevor sie zur Probenanalyse eingesetzt wurden.

Durchführung der RQ-PCR

RQ-PCR Messungen zur Bestimmung des normalen Niveaus der Genexpression bzw. nach Zugabe verschiedener Effektoren wurden 8-fach bzw. in Duplikaten im 7900 RT Fast Real-Time PCR System (12 μl -Reaktionsansätzen, 384 Well Platten) durchgeführt. Für einen 12 μl -Reaktionsansatz wurden 30 μg cDNA eingesetzt. Des Weiteren wurden je 100nM forward und reverse Primer in 2x SYBR Green Mix I verwendet. Die im Mix enthaltene Taq-DNA-Polymerase wurde durch einen „Hot Start“ bei 95°C für 15min aktiviert. Es folgten 40 Amplifikationszyklen mit Primer-Annealing und Elongation für 1min bei 60°C und Denaturierung bei 95°C für 15sec.

Überprüfung der Spezifität der Reaktion

Im Anschluss an die RQ-PCR wurden Schmelzkurven aller Reaktionsprodukte erstellt, indem die Temperatur in Schritten von 0,1°K/sec von 60°C auf 95°C erhöht wurde. Mittels Schmelzkurvenanalyse wurde überprüft, ob die gemessene Fluoreszenzintensität auf die gewünschte spezifische Produkt-Amplifikation zurückzuführen war.

Auswertung der RQ-PCR

Die Quantifizierung der PCR beruht auf der Berechnung des Referenz-Schwellenwertes (Cycle Threshold, CT-Wert). Als CT-Wert bezeichnet man die Anzahl der Zyklen, bei der die Produktfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Um die Effizienz der PCR-Reaktion zu bestimmen, wurde parallel zur Proben-cDNA die Referenz-cDNA in einer Verdünnungsreihe mit denselben Primern amplifiziert. Die Menge der eingesetzten Referenz-cDNA wurde in einer logarithmischen Skala gegen die erhaltenen CT-Werte aufgetragen. Anhand der Geradengleichung konnte für jeden CT-Wert die Menge der Amplifikationsprodukte berechnet werden.

Die Menge der Amplifikationsprodukte ist jedoch auch abhängig von der eingesetzten cDNA-Menge, welche trotz vorheriger spektrophotometrischer Bestimmung und entsprechender Verdünnung zwischen den Proben variiert. Um die Ergebnisse verschiedener Proben vergleichen zu können, wurden die berechneten Werte normalisiert (relative Quantifizierung). Dafür wurde die berechnete Expression jedes Gens auf die Expression von „Haushaltsgenen“ bezogen, welche allein (HPRT1) oder in Kombination mit dem Alpha-Tubulin-Gen (TUBA1B), bei Prostatakarzinomen am Besten zur Normalisierung geeignet sind, wie ein Vergleich der Expression von 16 der bei Prostata bisher verwendeten „Haushaltsgenen“ gezeigt hatte (Ohl et al., 2005).

2.2.7.5 Statistische Auswertung der RQ-PCR-Ergebnisse

Der Einfluss zugegebener Effektoren auf die Genexpression in Prostata- und anderen Zelllinien wurde mittels statistischer Analysen unter Verwendung der Statistiksoftware R 2.1.0 untersucht.

Die quantitative Verteilung der normalisierten Genexpressionswerte wurde zur Veranschaulichung grafisch als **Boxplots** dargestellt (deskriptive Statistik). Boxplots eignen sich zur Darstellung numerischer Daten und werden durch fünf Werte definiert (Abb. 7): den Median, das untere und das obere Quartil sowie das Minimum und das Maximum. Der

Median wird als Indikator für Verteilung der Daten (symmetrisch, asymmetrisch) verwendet. Der Abstand zwischen den Quartilen ist ein Maß für die Streuung der Daten. Die Quartile umfassen 50% der Daten, 25% liegen darunter, 25% darüber. Außerhalb der Quartile liegen die „Whisker“. Die Länge der Whisker wird durch den minimalen bzw. maximalen Datenwert festgelegt, beträgt aber maximal das 1,5-fache des Interquartilabstandes. Werte außerhalb der Whisker werden als Ausreißer bezeichnet und separat markiert (Tukey et al., 1977).

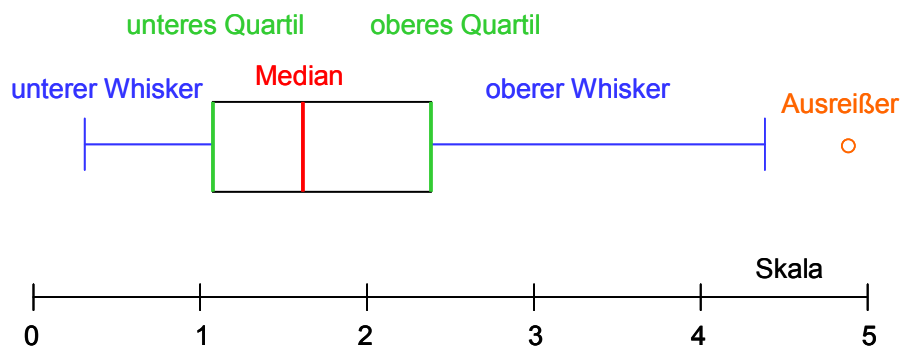


Abb. 7 Boxplot-Darstellung über eine Zahlenskala

Um den Einfluss verschiedener Faktoren (4 Effektoren in 2 Konzentrationen zu 2 Zeitpunkten) auf die Genexpression (Zielvariable) in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen und gleichzeitig mögliche Wechselwirkungen der Variablen zu berücksichtigen, wurden **multivariate Varianzanalysen (ANOVA)** mit anschließende Tukey HSD (honestly significant difference) Test durchgeführt (<http://stat.ethz.ch/R-manual/R-patched/library/stats/html/TukeyHSD.html>). Varianzanalysen sind dazu geeignet, in einem Multi-Faktor Modell signifikante Faktoren ($P < 0,05$) aufzudecken (explorative Statistik). Der Tukey HSD post-hoc Test berechnet zusätzlich die 95% familienweisen Konfidenzintervalle und P -Werte für den Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Level eines Faktors, mit anschließender P -Wert Korrektur für multiples Testen. Zur übersichtlichen Darstellung der Analyse-Ergebnisse wurden die erhaltenen P -Werte in eine Matrix konvertiert, die mit einer visuellen Anzeige gekoppelt war. Diese zeigte anhand von farbigen Symbolen an, ob die Differenzen zwischen den untersuchten Leveln eines Faktors (d. h. z. B. zwischen den vier verschiedenen Effektoren) statistisch signifikant waren ($P < 0,05$) oder nicht.

Zur Beantwortung der primären Fragestellung, ob die verschiedenen Effektoren die Expression der β -Adrenergischen Rezeptor Gene B1AR und B2AR in den untersuchten Prostatazelllinien beeinflussen, wurde ein Gesamtmodell erstellt. Innerhalb des

Gesamtmodells wurden die *P*-Werte für multiples Testen korrigiert. Die Beantwortung der sekundären Fragestellungen (Einfluss der Effektoren auf alle untersuchten Gene in den jeweiligen Zelllinien) wurde in Einzelmodellen vorgenommen. Innerhalb der Einzelmodelle, aber nicht zwischen verschiedenen Modellen, wurde für multiples Testen korrigiert. Ebenso wie der Versuchsaufbau hatte die Analyse der sekundären Fragestellungen somit explorativen Charakter. In allen Modellen galten *P*-Werte < 0,05 als signifikant.

Modellvalidierung

Um zu überprüfen, ob die Daten (Messwerte) in einem aufgestellten Multi-Faktor Modell zur Auswertung mittels ANOVA geeignet sind, wurde eine grafische Analyse der Residuen durchgeführt. Die Residuen beschreiben für jede Kombination der eingesetzten Variablen die Differenz zwischen den beobachteten und den entsprechenden vorhergesagten Werten. Sind die Residuen statistisch zufällig verteilt (z. B. normal verteilt), so kann davon ausgegangen werden, dass die Daten (Messwerte) in einem aufgestellten Multi-Faktor Modell zur Auswertung mittels ANOVA geeignet sind.

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von Kandidatengenen durch einen Vergleich publizierter Genom- und Transkriptom-Veränderungen

Zur systematischen Identifikation neuer Kandidatengene, welche für die Prostatakarzinogenese relevant sein könnten, wurden die chromosomalen Veränderungen von 145 primären, nicht-metastasierten Prostatakarzinomen aus sechs konventionellen CGH-Studien (Alers et al., 2001; Sattler et al., 1999; Steiner et al., 2002; Verdorfer et al., 2001; Wolter et al., 2002; Zitzelsberger et al., 2001) und von 16 primären Karzinomen aus der ersten Array-CGH Studie, welche an Prostatakarzinomen durchgeführt wurde (Paris et al., 2003), verglichen (Abb. 8).

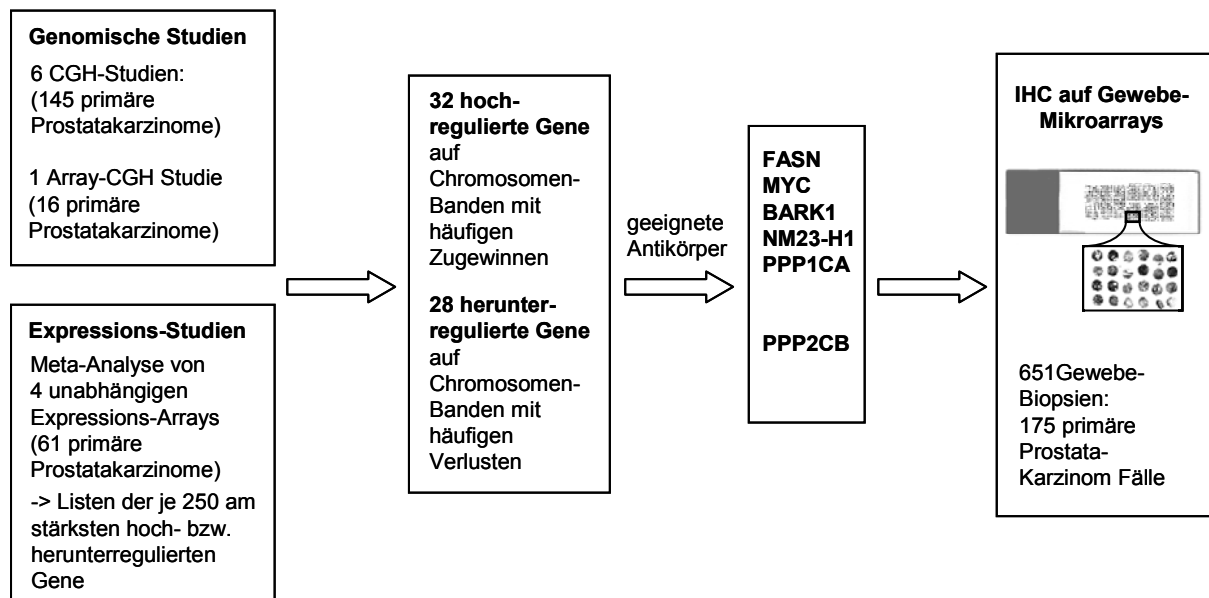


Abb. 8 Schematische Darstellung der Suche nach Kandidatengenen: Genomische Veränderungen aus sechs vergleichenden genomischen Hybridisierungs- (CGH-) Studien (Alers et al., 2001; Sattler et al., 1999; Steiner et al., 2002; Verdorfer et al., 2001; Wolter et al., 2002; Zitzelsberger et al., 2001) und einer Array-CGH Studie (Paris et al., 2003) wurden mit den Ergebnissen einer Expressions-Mikroarray Meta-Analyse (Rhodes et al., 2002) verglichen. Auf diese Weise wurden in Tumoren vs. benignem Prostatagewebe 32 hoch-regulierte und 28 herunter-regulierte Gene auf Chromosomenbanden mit häufigen Zugewinnen bzw. Verlusten identifiziert. Für sechs dieser Kandidatengene waren geeignete Antikörper verfügbar. Diese Kandidaten konnten mittels Immunhistochemie (IHC) auf Prostata-Gewebe-Mikroarrays analysiert werden.

Von chromosomalen Zugewinnen betroffen waren Regionen auf den Chromosomenarmen 17p, 8q, 7q, 3q, 7p, 17q, 1p, 19q, 20q, 16p, 11q, 12q, 19p und 9q, mit abnehmender Häufigkeit von 17p (21%) zu 9q (8%). Am häufigsten von chromosomalen Verlusten betroffen waren 8p, 13q, 6q, 16q, 18q, 5q, 2q und 4q in 28% bis 9% der Fälle. Um diejenigen Kandidatengene zu identifizieren, welche direkt von den genomischen Imbalancen betroffen sein könnten, wurden die rekurrenten numerischen Abberationen mit der chromosomalen Lokalisation der 500 in Prostatakarzinomen versus benignem Prostatagewebe am stärksten differentiell exprimierten Gene verglichen. Diese 500 Gene waren in einer Meta-Analyse, welche die Expressionsprofile von 61 nicht-metastasierten Prostatakarzinomen und 42 benignen Prostatageweben aus vier unabhängigen Expressions-Mikroarrays verglich, identifiziert worden (Rhodes et al., 2002). 32 der Gene mit in Tumoren erhöhter Expression waren auf chromosomalen Banden mit häufigen Zugewinnen lokalisiert, während 28 der Gene mit in Tumoren erniedrigter Expression auf Banden mit häufigen chromosomalen Verlusten lokalisiert waren (Anhang Tabelle 26, Tabelle 27). Für sechs dieser Gene waren geeignete Antikörper verfügbar. Dazu zählten das Onkogen MYC (8q24) und die Gene, welche für die β -Adrenergische Rezeptor Kinase BARK1 (11q13), den Metastasierungs-Suppressor NM23-H1 (17q21), die Fettsäuresynthase FASN (17q25) und die katalytischen Untereinheiten der Protein Phosphatasen PP1 α (PPP1CA) (11q13) und die β -Isoform von PP2A (PPP2B) (8p11-p12) kodieren. Diese Kandidatengene, ihre chromosomale Lokalisation, die numerischen Abberationen (in %) sowie der Rang der Expressionsänderung sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Ob diese Genom- und Transkriptom-Änderungen Auswirkungen auf die Expression der entsprechenden Proteine haben, wurde anschließend an einem großen Tumor-Kollektiv unter Verwendung von Prostata-Gewebe-Mikroarrays untersucht.

Tabelle 17 Kandidaten für die IHC-Analyse

Gen ^a	Gen Name; Alias ^a	Chromosomale Lokalisation	CGH ^b	Array- CGH ^c	Expressions- Array ^d
			(n=145) Zugewinne	(n=16) Zugewinne	(n=61) Rang Nr. ^e
<i>NME1</i>	<i>non-metastatic cells 1, protein (NM23a) expressed in</i>	17q21.3	15.2%	2/16	1
<i>FASN</i>	<i>fatty acid synthase; FAS, OA-519</i>	17q25	20.7%	3/16	6
<i>MYC</i>	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	8q24.12-q24.13	15.2%	0/16	46
<i>ADRBK1</i>	<i>adrenergic, beta, receptor kinase 1; GRK2; BARK1</i>	11q13	8.3%	3/16	131
<i>PPP1CA</i>	<i>protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform</i>	11q13	8.3%	3/16	236
			Verluste	Verluste	
<i>PPP2CB</i>	<i>protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform</i>	8p12-p11.2	23.5%	5/16	66

IHC = Immunhistochemie; CGH = Vergleichende genomische Hybridisierung.

^a offizielle Genbezeichnungen der Humanen Genom Organisation (HUGO).

^b (Alers et al., 2001; Sattler et al., 1999; Steiner et al., 2002; Verdorfer et al., 2001; Wolter et al., 2002; Zitzelsberger et al., 2001).

^c (Paris et al., 2003).

^d Expressions-Array Meta-Analyse (Rhodes et al., 2002).

^e Rang in der Liste der 500 am stärksten hoch- bzw. herunter-regulierten Gene in Prostatakarzinomen gegenüber gutartigem Prostatagewebe.

3.2 Herstellung von Prostata-Gewebe-Mikroarrays

Es wurde ein Prostata Gewebe Mikroarray hergestellt, welcher 651 Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben von 175 Patienten enthielt (Abb. 9 und Kapitel 2.2.1.1), sowie mehrere kleinere Gewebe-Mikroarrays zur Optimierung der bei den Gewebearrays angewendeten Methoden. Die Gewebe-Mikroarrays enthielten von jedem Tumor bzw. jeder benignen Hyperplasie (BPH) 2-3 Biopsien, um die Heterogenität des Tumorgewebes ausgleichen zu können (Torhorst et al., 2001).

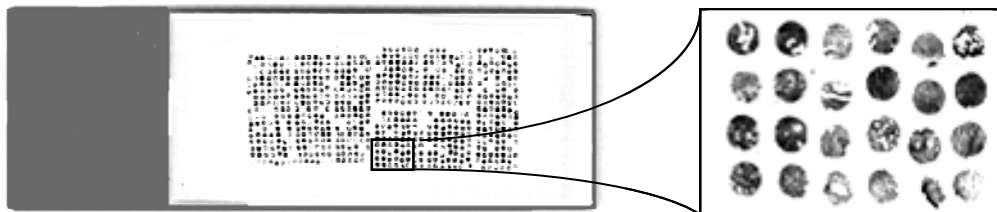


Abb. 9 Prostata-Gewebe-Mikroarray-Chip

3.3 Immunhistochemische Analyse differentiell exprimierter Proteine in Prostatakarzinomen mittels Gewebe-Mikroarrays

Durch den beschriebenen Vergleich von Genom- und Transkriptom-Veränderungen wurden systematisch Kandidatengene identifiziert. Ob die von diesen Genen kodierten Proteine in Prostatakarzinomen im Vergleich zu benignem Prostatagewebe und/oder während der Tumorprogression differentiell exprimiert werden, wurde in einem großen Tumorkollektiv an Prostata-Gewebe-Mikroarrays (Abb. 9) untersucht. Von den 60 identifizierten Kandidatengenen wurden MYC, BARK1, PP1 α , FASN, NM23-H1 und PP2A zur Analyse mittels Immunhistochemie, basierend auf der Verfügbarkeit spezifischer Antikörper, welche für den Nachweis von Antigenen in Formalin-fixiertem Gewebe geeignet waren, ausgewählt (Tabelle 17).

3.3.1 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation der untersuchten Protein-Kandidaten

Um zu überprüfen, ob sich die Antikörper zur Untersuchung der Proteinexpression in Formalin-fixiertem Prostatagewebe eignen, wurde die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der Antikörperfärbungen im Gewebe bestimmt. Voraussetzungen für die Verwendbarkeit eines Antikörpers sind eine spezifische Immunfärbung der benignen bzw. malignen Drüsenzellen in Kombination mit einer negativen Immunfärbung des fibromuskulären Bindegewebes sowie eine für jeden Antikörper spezifische subzelluläre Lokalisation der Immunfärbungen. Für die in der IHC-Studie verwendeten Antikörper wurden diese Voraussetzungen erfüllt (siehe jeweils Abb. 10): Die Immunfärbung der Fettsäuresynthase war homogen im Zytoplasma verteilt (wie zuvor beschrieben von Rossi et al., 2003 und Swinnen et al., 2002). Der NCL-cMYC-Antikörper färbte vorwiegend zytoplasmatisch: In benignen Drüsenzellen (BPH) wurde eine perinukleäre, granuläre Immunfärbung an der luminalen Seite der Zellen beobachtet, während maligne Drüsenzellen überwiegend eine diffuse zytoplasmatische Verteilung der Immunfärbung zeigten. Dieses subzelluläre Färbeverhalten stimmt mit früheren Untersuchungen an Formalin-fixierten Prostatakarzinomen überein, bei denen der gleiche Antikörper verwendet wurde (Jenkins et al., 1997). Die Immunfärbung der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 war hoch spezifisch im Zytoplasma der Drüsenzellen zu finden, wobei die Färbungsintensität insbesondere in benignen Zellen zur luminalen Seite hin zunahm. Bei NM23-H1 wurde eine zytoplasmatische und nukleäre Immunfärbung beobachtet, wie sie bereits für den gleichen Antikörper in IHC-Färbungen beschrieben worden war (Forus et al., 2001). Die Antikörper gegen die Proteinphosphatasen PP1 α und PP2A wiesen, wie auf Grund der vielfältigen Funktionen dieser Phosphatasen erwartet, sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Lokalisation nach und hatten sich in früheren Western Blot Analysen bewährt (Chen et al., 2005).

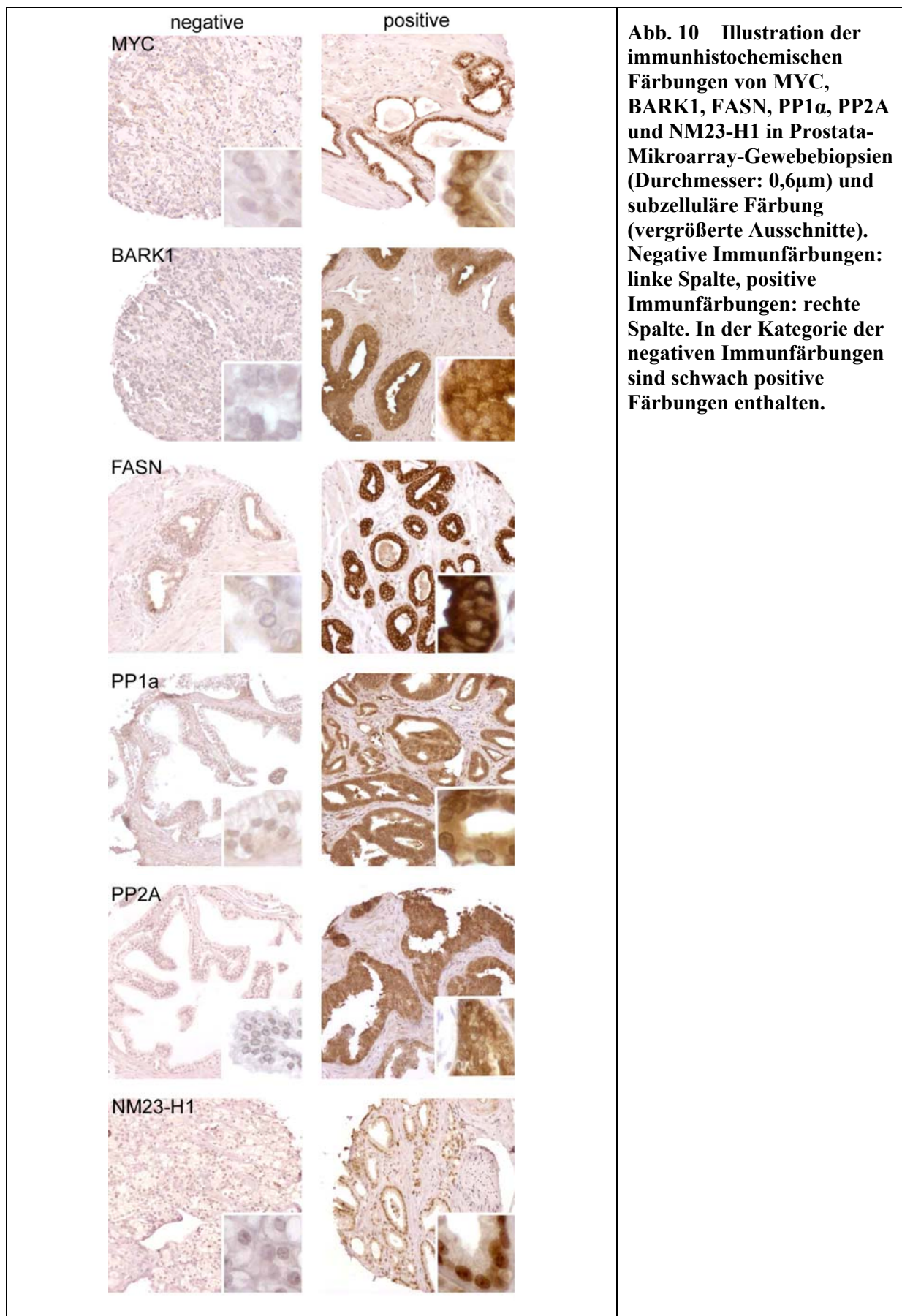


Abb. 10 Illustration der immunohistochemischen Färbungen von MYC, BARK1, FASN, PP1 α , PP2A und NM23-H1 in Prostata-Mikroarray-Gewebebiopsien (Durchmesser: 0,6 μ m) und subzelluläre Färbung (vergrößerte Ausschnitte). Negative Immunfärbungen: linke Spalte, positive Immunfärbungen: rechte Spalte. In der Kategorie der negativen Immunfärbungen sind schwach positive Färbungen enthalten.

3.3.2 Korrelationen der Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern

Es wurde untersucht, ob die Expressionen der ausgewählten Kandidatenproteine mit klinisch-pathologischen Parametern korrelieren. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob diese Proteine als diagnostische Marker in Frage kommen und in der Pathogenese des Prostatakarzinoms potentiell eine Rolle spielen könnten. Zur Untersuchung der Proteinexpression mittels Immunhistochemie wurde ein Gewebe-Mikroarray hergestellt, welcher 651 Gewebestanden von 131 Tumoren und 126 benachbarten benignen Hyperplasien (BPH) von insgesamt 175 Patienten mit klinisch-pathologisch gut dokumentierten primären Prostatakarzinomen enthielt (Tabelle 4, Abb. 9).

3.3.2.1 Univariate Analysen

Univariate Analysen zeigten, dass sich die immunhistochemischen Färbungen von FASN ($P < 0,001$), MYC ($P < 0,001$) und PP1 α ($P = 0,020$) in Tumorgewebe und benignem hyperplastischem Gewebe auf dem Gewebe-Mikroarray signifikant unterschieden (Tabelle 18), was auf eine mögliche Rolle dieser Proteine in der frühen Tumorentwicklung hindeutet.

Tabelle 18 Immunfärbungen in Prostatakarzinom- und BPH- Proben

Fallzahl (n)	Positive IHC-Färbung (%) (n positiv / n total)					
	MYC ^a	BARK1 ^a	PP1 α ^a	FASN ^a	NM23-H1 ^b	PP2A ^{a,b}
Karzinome (n=131)	52%	93%	71%	54%	59%	54%
BPH (n=126)	78%	92%	56%	15%	61%	56%
<i>P</i> - Wert	<0.001	0.807	0.020	<0.001	0.685	0.891
Adjustierter <i>P</i> - Wert ^c	<0.001	1.000	0.120	<0.001	1.000	1.000

IHC: Immunhistochemie; BARK1: β -Adrenergische Rezeptor Kinase 1; PP1 α , PP2A: Protein Phosphatasen; FASN: Fettsäuresynthase.

^a Zytoplasmatische Immunfärbung

^b Nukleäre Immunfärbung

^c Um für multiples Testen zu korrigieren, wurden die *P*-Werte nach Bonferreми-Holm adjustiert.

MYC, BARK1 und PP1 α zeigten univariate Korrelationen der Proteinexpression mit den prognostischen pathologischen Parametern Gleason Score und pT-Stadium (Tabelle 18, Abb. 11), was auf eine Funktion dieser Proteine in der Tumorprogression hindeutet.

Dabei nahm die Immunfärbung von MYC von niedrigen zu hohen Gleason Scores sowie von organbegrenzten zu organüberschreitenden pT-Stadien deutlich ab (P -Werte jeweils $<0,001$). Auch die Immunfärbung der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 nahm von niedrigen zu hohen Gleason Scores ab ($P = 0,040$). Zudem wurde eine negative Korrelation der BARK1-Immunfärbung mit hohen Gleason Scores auch für die benignen hyperplastischen Gewebereiche der entsprechenden Karzinome festgestellt ($P = 0,003$). Die Korrelation von MYC und BARK1 mit dem zytologischen Grad, welcher in jeder Biopsie auf dem Gewebe-Array direkt bestimmt werden konnte, unterstrich diese Ergebnisse. Da der zytologische Grad im Gegensatz zur international anerkannten Grad-Einteilung nach Gleason keinem internationalen Standard entspricht und als prognostischer Faktor nicht anerkannt ist, wird auf diese Ergebnisse in Tabelle 18 und Abb. 11 nicht weiter eingegangen. Die Immunfärbung der Protein Phosphatase PP1 α blieb in niedrigen Gleason Scores (GS5-6) und mittleren Gleason Scores (GS7) konstant, nahm jedoch in hohen Gleason Scores (GS8-9) zu ($P = 0,001$). PP2A, FASN und NM23-H1 (Tabelle 18) korrelierten mit keinem der prognostischen klinisch-pathologischen Parameter. Für keines der untersuchten Proteine wurde eine Korrelation mit dem Patientenalter festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 19 Korrelationen positiver Immunfärbungen mit klinisch-pathologischen Faktoren

Klinisch- patho- logischer Faktor	Fallzahl		Positive IHC-Färbung (%) (n positiv / n total)											
	T (n=131)	BPH (n=126)	MYC ^a		BARK1 ^a		PP1α ^a		FASN ^a		NM23-H1 ^b		PP2A ^{ab}	
			T	BPH	T	BPH	T	BPH	T	BPH	T	BPH	T	BPH
Gleason Score														
5-6	45	59	74%	80%	100%	100%	63%	51%	54%	16%	59%	55%	60%	60%
7	31	24	54%	74%	93%	87%	64%	55%	59%	18%	62%	71%	60%	61%
8-9	45	27	28%	68%	85%	78%	84%	68%	57%	14%	59%	76%	43%	50%
	121 ^c	110 ^c												
P- Wert			<0.001	0.501	0.040	0.003	0.074 ^d	0.385	0.910	0.918	0.974	0.134	0.280	0.686
adjustierter P- Wert ^e			0.002	1.000	0.240	0.024	0.052	1.000	1.000	1.000	1.000	0.804	1.000	1.000
pT-Stadium														
pT2	60	80	73%	79%	96%	92%	66%	58%	59%	14%	61%	60%	55%	54%
pT3-pT4	49	33	36%	70%	93%	87%	73%	48%	63%	19%	60%	70%	55%	53%
	109 ^c	113 ^c												
P- Wert			<0.001	0.324	0.657	0.477	0.515	0.392	0.832	0.556	1.000	0.375	1.000	1.000
adjustierter P- Wert ^e			0.006	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

IHC: Immunhistochemie; T: Tumor; BPH: benigne Prostatahyperplasie; BARK1: β-Adrenergische Rezeptor Kinase; PP1α, PP2A: Protein Phosphatasen; FASN: Fettsäuresynthase.

^a Zytoplasmatische Immunfärbung

^b Nukleäre Immunfärbung

^c Anzahl der Fälle, für welche die entsprechenden klinisch-pathologischen Daten verfügbar waren. Nicht alle BPH-Proben stammen von denselben Patienten wie die Tumor-Proben.

^d für Gleason Scores 5-7 versus 8-9: P- Wert = 0,001

^e Um für multiples Testen zu korrigieren, wurden die P-Werte der Immunfärbungen aus χ²-Test bzw. Fisher's Exakt Test für Gleason Score und pT-Stadium nach Bonferroni-Holm adjustiert.

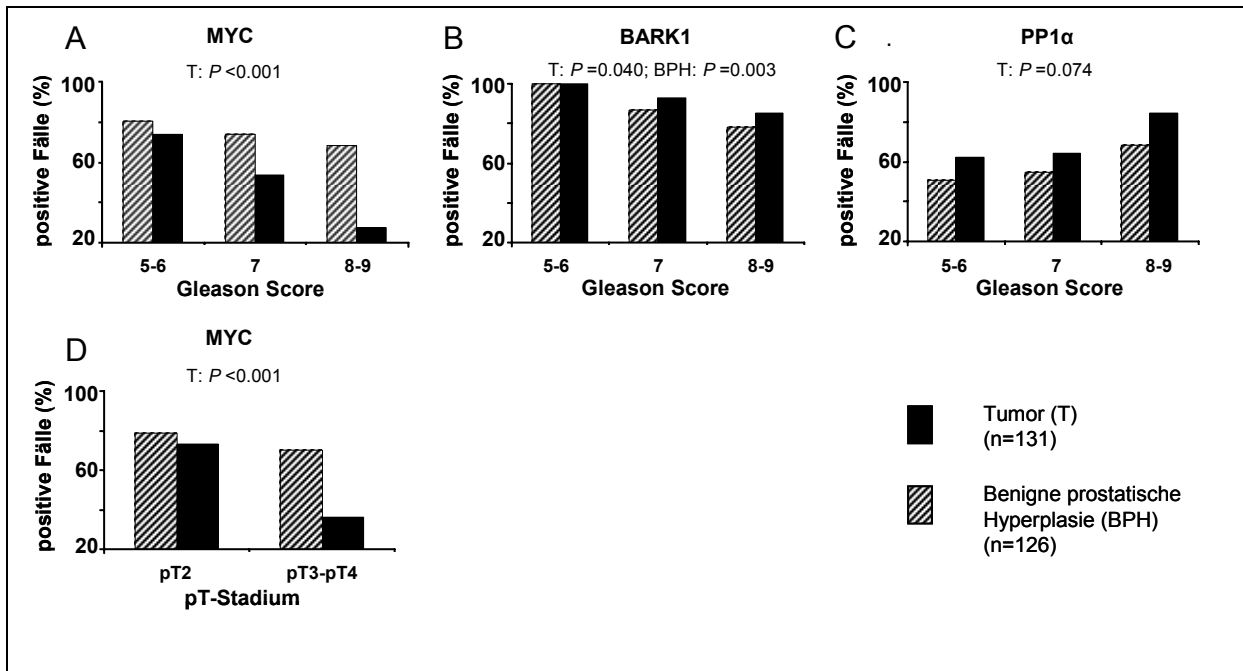


Abb. 11 Korrelation der Immunfärbungen von MYC, BARK1 und PP1 α mit klinisch-pathologischen Parametern in Tumorgewebe (T) und benignem Gewebe (BPH) von Prostatakarzinom-Patienten (n=175). Die MYC-Immunfärbung korrelierte in Tumoren negativ mit Gleason Score (A) und pT-Stadium (D). Eine Untergruppe von Patienten mit hohen Gleason Scores wurde durch eine negative BARK1-Immunfärbung charakterisiert (B). Die Immunfärbung von PP1 α korrelierte in Tumoren positiv mit hohen Gleason Scores (GS 5-7 versus 8-9: $P=0,001$). Die P -Werte stammen von χ^2 -Test bzw. Fisher's Exakt Test.

3.3.2.2 Multivariate Analyse

Eine logistische Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um herauszufinden, welche der untersuchten Proteine die prognostischen Parameter Gleason Score (hoch- bis mäßig differenziert (GS 2-6) versus gering- bis undifferenziert (GS 7-9)) und pT-Stadium (organbegrenzt (pT2) versus extraprostatisch (pT3-pT4)) vorhersagen können (Tabelle 20). Alle untersuchten Proteine, welche aus dem Vergleich der genomischen und Expressions-Veränderungen hervorgegangen waren (MYC, BARK1, PP1 α , FASN, NM23-H1 und PP2A), wurden in das Modell aufgenommen. Eine moderate Rückwärtsselektion wurde angewandt, um Faktoren (Proteine), welche für das Modell nicht relevant waren, sukzessiv zu aus dem Modell zu entfernen.

Die Immunfärbungen von MYC, BARK1 und FASN eigneten sich statistisch signifikant zur Vorhersage des Gleason Scores, welcher die Differenzierung des malignen Drüsengewebes darstellt ($P < 0,001$; $P = 0,023$; $P = 0,036$). Die hohen Werte der Odds Ratios (OR) und 95% Konfidenzintervalle [CI] der MYC- (OR=7,143 [2,079-24,390]) und der FASN-

Immunfärbung (OR=3,106 [1,035-9,259]) unterstreichen die Signifikanz. Für BARK1 waren OR und 95% CI nicht berechenbar (unendlich hoch), da negative BARK1-Immunfärbungen ausschließlich in Patienten mit hohen Gleason Scores und niemals in Fällen mit niedrigeren Gleason Scores (GS5-6) gefunden wurden (0, Abb. 11).

Die MYC-Immunfärbung eignete sich als einziger Faktor, um das pT-Stadium und somit die Tumorgroße vorherzusagen ($P < 0,001$, OR=6,993 [2,387-20,408]).

Tabelle 20 Multivariate Analyse^a zur Vorhersage prognostischer klinisch-pathologischer Parameter durch die Immunfärbungen von MYC, BARK1, PP1 α , FASN, NM23-H1 und PP2A in Prostatakarzinomen

Klinisch-pathologischer Parameter	Fälle in der Analyse ^b	Faktor	P-Wert ^c	OR [95% CI]
Gleason Score (GS2-6 / GS7-9)	82	MYC	<0.001	7.143 (2.079-24.390) ^d
		BARK1	0.023	
		FASN	0.036	3.106 (1.035-9.259)
pT-Stadium (pT2 / pT3-pT4)	77	MYC	<0.001	6.993 (2.387-20.408)

OR: Chance (odds ratio); CI: Konfidenzintervall; BARK1: β -Adrenergische Rezeptor Kinase; FASN: Fettsäuresynthase.

^a Logistische Regressionsanalyse mit moderater Rückwärtsselektion.

^b Alle Prostatakarzinome, von denen die Ergebnisse aller Immunfärbungen lückenlos bekannt waren.

^c P-Wert des Wahrscheinlichkeitsverhältnis-Tests.

^d Nicht berechenbar (unendlich hoch), da negative BARK1-Immunfärbungen ausschließlich in hohen Gleason Scores (GS7-9) zu finden waren.

Zusammengefasst identifizierte die logistische Regressionsanalyse MYC, BARK1 und FASN als Faktoren, welche eine Vorhersage des Gleason Scores ermöglichten, sowie MYC als einzigen Faktor, der die Vorhersage des pT-Stadiums ermöglichte.

3.4 Automatisierte Immunfluoreszenz-Analyse von Prostata-Gewebe-Mikroarrays

3.4.1 Methodenentwicklung

Der Nachweis von Proteinen im Gewebe erfordert konventionell die doppel-blinde Auswertung immunhistochemischer Färbungen am Mikroskop durch qualifizierte Personen. Auf Grund der regelmäßigen Anordnung der Gewebeproben sollten Gewebe-Mikroarrays zur automatisierten Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen prädestiniert sein. Um Immunfärbungen in einem Prostata-Gewebe-Mikroarray mit einem automatisierten Verfahren quantifizieren zu können, wurden die Antigene mittels Immunfluoreszenz markiert und die Fluoreszenzintensitäten bei den entsprechenden Wellenlängen mit einem Fluoreszenzscanner (Aruba Scanner, Zeiss) bei 1,6µm Auflösung eingelesen. Bei diesem Scanner handelte es sich um einen Prototyp, der zur Entwicklung einer automatisierten Mikroarray Auswertung (Göttel, Dissertation 2007) zur Verfügung stand. Verwendet wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Cy5 und Cy7, da bei Messung der langwelligen Emissionen im Gegensatz zu Farbstoffen, deren Emissionsspektren im kurzwelligeren Bereich liegen (z. B. Cy3), keine Autofluoreszenz des Gewebes festzustellen war.

Zur digitalen Analyse der generierten 12 Bit Grauskala Bilder der Biopsien auf dem Gewebe-Array wurde die Software GenePix 5.0 (Axon, Foster City, USA) verwendet. In den digitalen Bildern konnte die Lokalisation der einzelnen Gewebeproben im Array anhand der Autofluoreszenz des Gewebes im Cy3-Kanal oder anhand der DAPI-Färbung bestimmt werden. Die Biopsieränder wurden automatisch kreisförmig markiert (Abb. 15B). Des Weiteren wurden fehlende oder fehlerhafte Biopsien manuell markiert, um diese von der späteren Analyse auszuschließen. Innerhalb der Biopsiegrenzen wurden anschließend die Farbintensitäten der jeweiligen Fluoreszenzfärbung (Cy5, Cy7) pixelgenau bestimmt. Für jede Biopsie ließen sich somit u. a. Mittelwert, Median und Standardabweichung der Färbung berechnen. Diese Werte könnten dazu verwendet werden, Tumorproben mit benignen Proben (Abb. 13) oder mit klinisch-pathologischen Daten quantitativ zu vergleichen.

3.4.1.1 Test der digitalen Immunfluoreszenz-Analyse an Prostata-Gewebe-Mikroarrays

Die Methode der digitalen Immunfluoreszenz- (IF-) Bildanalyse wurde an Prostata-Gewebe-Mikroarrays mit 20 Gewebeproben (Biopsiestanzen aus radikalen Prostatektomien) ausgetestet. Um die Ergebnisse des automatisierten digitalen Bildanalyse-Verfahrens mit den Ergebnissen der konventionell ausgewerteten IHC-Färbungen vergleichen zu können, wurden bei beiden Auswerteverfahren die gleichen Antikörper verwendet. Da die Auflösung des Fluoreszenz-Scanners (1,6 μ m) nur wenig unterhalb der Größe von Zellkernen lag, wurden ausschließlich die zytoplasmatisch färbenden Antikörper verwendet, d. h. die Antikörper gegen FASN, BARK1 und MYC (Abb. 12). Zur Lokalisation und Markierung der kreisförmigen Gewebeprobenfläche wurde die Autofluoreszenz des Gewebes im kurzwelligen Bereich (Cy3-Kanal) gemessen.

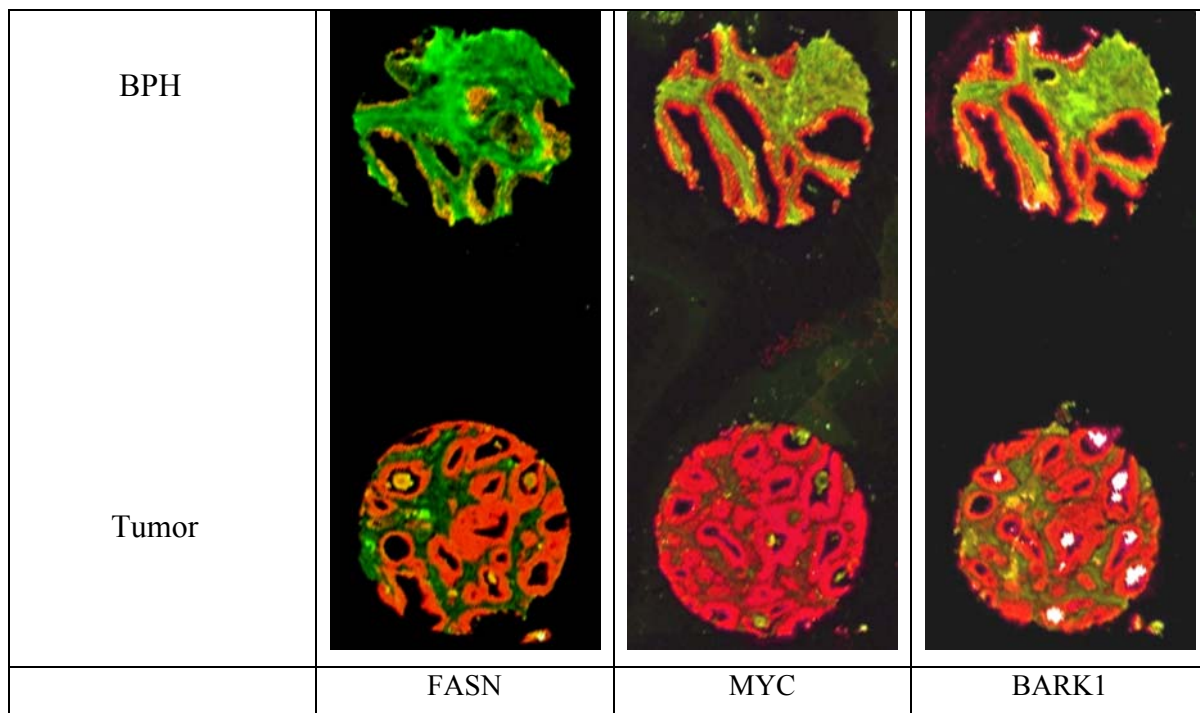


Abb. 12 Test der digitalen IF-Bildanalyse an Prostata-Gewebe-Mikroarrays (20 Gewebeproben) unter Verwendung der Antikörper gegen FASN, MYC und BARK1, nachgewiesen durch Farbstoff Cy5 (rot) bei einer Belichtungsdauer von 450ms. Die Autofluoreszenz des Gewebes (grün) wurde zur kreisförmigen Markierung der Gewebeproben verwendet. Der Bindegewebsanteil ist in benignen Hyperplasien (BPH) höher als in Tumoren. **FASN:** Tumorgewebe weist deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten auf als BPH. **MYC und BARK1:** Tumor und BPH weisen etwa gleich starke Färbungen auf.

Die Mittelwerte der Cy5-Fluoreszenzintensitäten der Immunfärbungen von FASN, MYC und BARK1 wurden zuerst pro Gewebebiopsie berechnet, d. h., in die Berechnung gingen die

Intensitäten sämtlicher Pixel pro Biopsiefläche ein (Abb. 13 links). Die Ergebnisse spiegelten daher nicht nur die relevanten Färbungsintensitäten der benignen (BPH) bzw. malignen Drüsenzellen (Tumor) wider sondern auch das geringere Verhältnis von Drüsenzellen zu Bindegewebsanteilen in benignen Hyperplasien im Vergleich zu Tumoren (Abb. 12). Die variablen Anteile an Bindegewebe und Drüsenlumen sollten daher von der Mittelwertberechnung ausgeschlossen werden. Diese Biopsiebestandteile weisen im Allgemeinen deutlich geringere Färbungsintensitäten auf als die benachbarten Drüsenzellen. Nach Festlegung eines Schwellenwertes berechnete das Genepix-Programm daher die Intensitäts-Mittelwerte des lokalen Hintergrundes ($I_{\text{mittel, Hintergrund}}$). Anhand folgender Formel konnte somit der Intensitätsmittelwert (I_{Biopsie}) derjenigen Biopsieanteile ($\% \text{Pixel}_{\text{Biopsie}}$), deren Färbungsintensität über dem Hintergrundschwellenwert lag, bestimmt werden (Volp et al., 2006):

$$I_{\text{Biopsie}} = (\% \text{Pixel}_{\text{Biopsie}} > (I_{\text{Hintergrund}} + 1 \text{ Stabw})) / 100\% * (I_{\text{mittel, Biopsie}} - I_{\text{mittel, Hintergrund}})$$

I = Intensität

Stabw = Standardabweichung

$I_{\text{mittel, Biopsie}}$ = Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten aller Pixel einer Biopsie

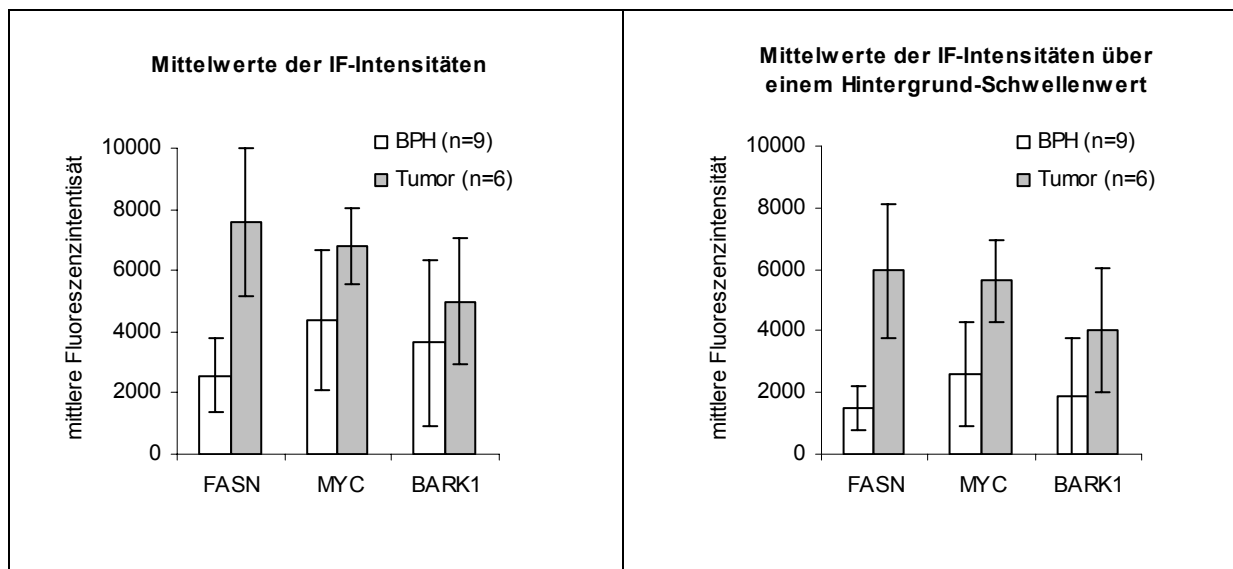


Abb. 13 Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten pro Biopsie (links). Die Fettsäuresynthase (FASN) zeigt in Prostatatumoren deutlich stärkere Fluoreszenzintensitäten als in benignen Hyperplasien (BPH). MYC und BARK1 zeigen keine signifikanten Unterschiede. Wird die lokale Hintergrundintensität von der Mittelwertbildung ausgeschlossen (Formel siehe Text), vergrößern sich die Unterschiede zwischen den Mittelwerten von Tumor und BPH geringfügig (rechts).

FASN wies sowohl vor (Abb. 13 links) als auch nach Abzug des lokalen Hintergrundes (Abb. 13 rechts) in Tumoren signifikant höhere Intensitätsmittelwerte auf als in benachbarten benignen Hyperplasien, was die Ergebnisse der konventionellen Immunhistochemie bestätigt (positive IHC-Färbungen in Tumoren 54% gegenüber 15% in BPH, Tabelle 18). MYC wies jedoch nach Abzug des Hintergrundes in Tumoren (n=6) ebenfalls höhere Intensitätsmittelwerte auf (Abb. 13 links), was der konventionellen IHC-Auswertung widersprach. Die Ursache des erhöhten Mittelwertes der MYC-Immunfärbungsintensitäten in Tumoren liegt vermutlich in der Auswahl der Pixel, welche in die Mittelwertsberechnung eingehen: Einerseits liegen die Intensitätswerte der Bindegewebsfluoreszenz häufig oberhalb des automatisch berechneten Hintergrundschwellenwertes (siehe Bindegewebsfärbung (rot) durch den MYC-Antikörper (rot) in der Tumor-Biopsie, Abb. 12), andererseits werden Drüsenzellen, wenn sie nur schwach angefärbt sind, von der Mittelwertsberechnung fälschlich ausgeschlossen.

Die Berechnung der Pixelintensitäts-Mittelwerte oberhalb eines Hintergrundschwellenwertes (Abb. 13 rechts) stellt somit noch keine wesentliche Verbesserung gegenüber der Verwendung des Mittelwertes der Gesamt-Biopsie (Abb. 13 links) dar und könnte lediglich zur Auswertung von Antikörperfärbungen verwendet werden, die sich ausgesprochen deutlich zwischen zwei Gruppen unterscheiden, wie es beim FASN-Antikörper der Fall ist.

Eine Verbesserung der Auswertung könnte erreicht werden, wenn ausschließlich die Pixelintensitäten innerhalb des interessierenden Kompartiments, d. h. der Drüsenzellen, in die Mittelwertsberechnung eingeschlossen würden. Dies wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.4.1.2 Immunfluoreszenz-Analyse von heterogenem Prostatagewebe unter Verwendung einer Kompartiment-spezifischen, digitalen Maske

Prostata Adenokarzinome und benigne Prostatahyperplasien (BPH) sind sehr heterogen aufgebaut und enthalten unterschiedliche Anteile an fibromuskulärem Gewebe. Benigne hyperplastische Drüsen weisen zudem häufig stark vergrößerte Drüsenlumina auf, wogegen bei malignen Drüsen mit abnehmender Differenzierung (d. h. höheren zytologischen Graden bzw. Gleason Scores) die Drüsenlumina deutlich abnehmen (Abb. 14). Die berechneten Fluoreszenzintensitäts-Mittelwerte der Biopsien hängen somit bei Prostatagewebe in hohem Maße vom prozentualen Anteil der Drüsenzellenfläche pro Biopsie ab.

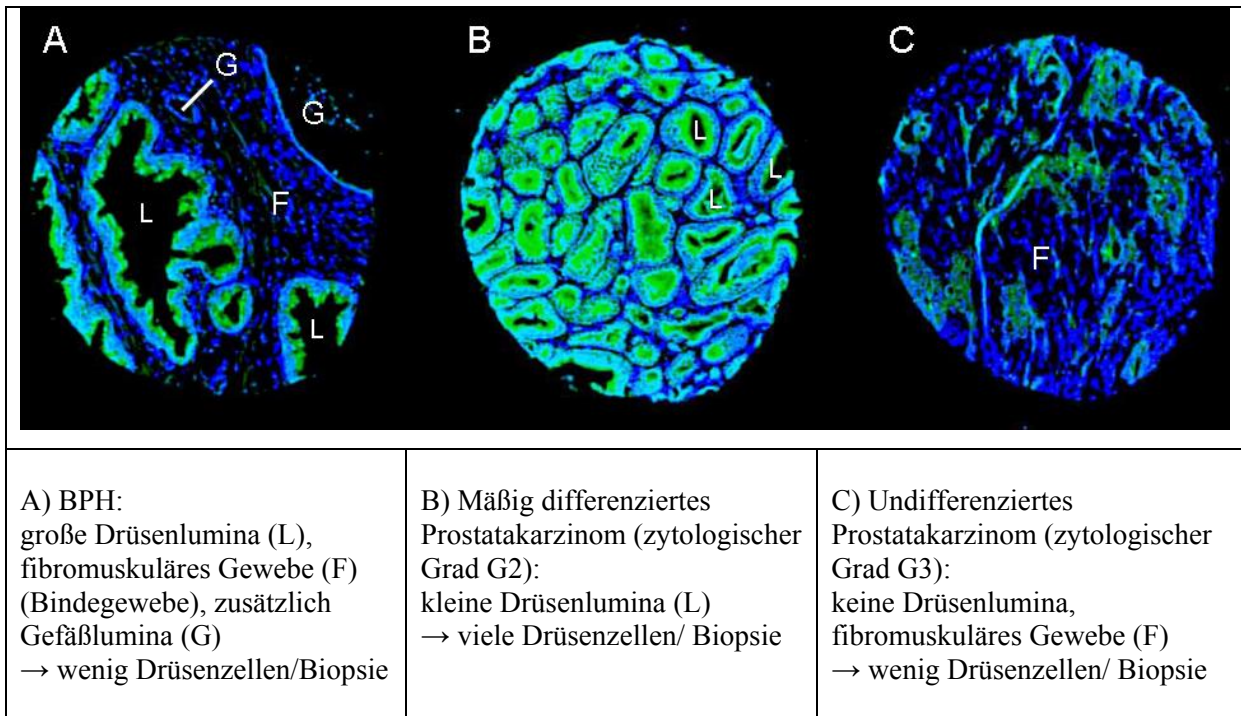


Abb. 14 Unterschiedliche prozentuale Anteile an Drüsenzellen pro Biopsie (Beispiele). Zellkerne sind blau (DAPI-Färbung), Drüsenzellen grün (PSA-Antikörper) dargestellt.

Ausgewertet werden sollen ausschließlich die Fluoreszenzintensitäten in den Drüsenzellen. Zu diesem Zweck wurden die Drüsenzellen mit einem Primärantikörper gegen das Prostataspezifische Antigen (PSA), welches ausschließlich in prostatistischen Drüsenzellen exprimiert wird, markiert. Der PSA-Antikörper sowie der Antikörper gegen das zu untersuchende Protein wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy5, Cy7) nachgewiesen (Doppel-Immunfluoreszenz). Für jeden Farbstoff wurde ein digitales Bild erzeugt. Die 12 Bit Grauskala Bilder wurden in RGB Bilder umgewandelt. Zur Veranschaulichung wurde die Cy5-Färbung rot, die Cy7-Färbung grün und die DAPI-Färbung blau dargestellt. Anhand des Bildes der Drüsenzellfärbung (PSA, Cy7) wurde ein Schwellenwert festgelegt, der die Fluoreszenzintensität der spezifisch angefärbten Drüsenzellen von der Hintergrundfluoreszenz unterschied. Anhand dieses Schwellenwertes wurde eine Maske generiert, welche alle Intensitätswerte oberhalb des Schwellenwertes und somit die Areale der Drüsenzellen kennzeichnete (Abb. 15 D, F). Innerhalb dieser Maske wurde die Intensität des zweiten Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5), der das zu untersuchende Antigen kennzeichnete, gemessen. Für jede Biopsie wurde der Intensitäts-Mittelwert innerhalb der Maske berechnet.

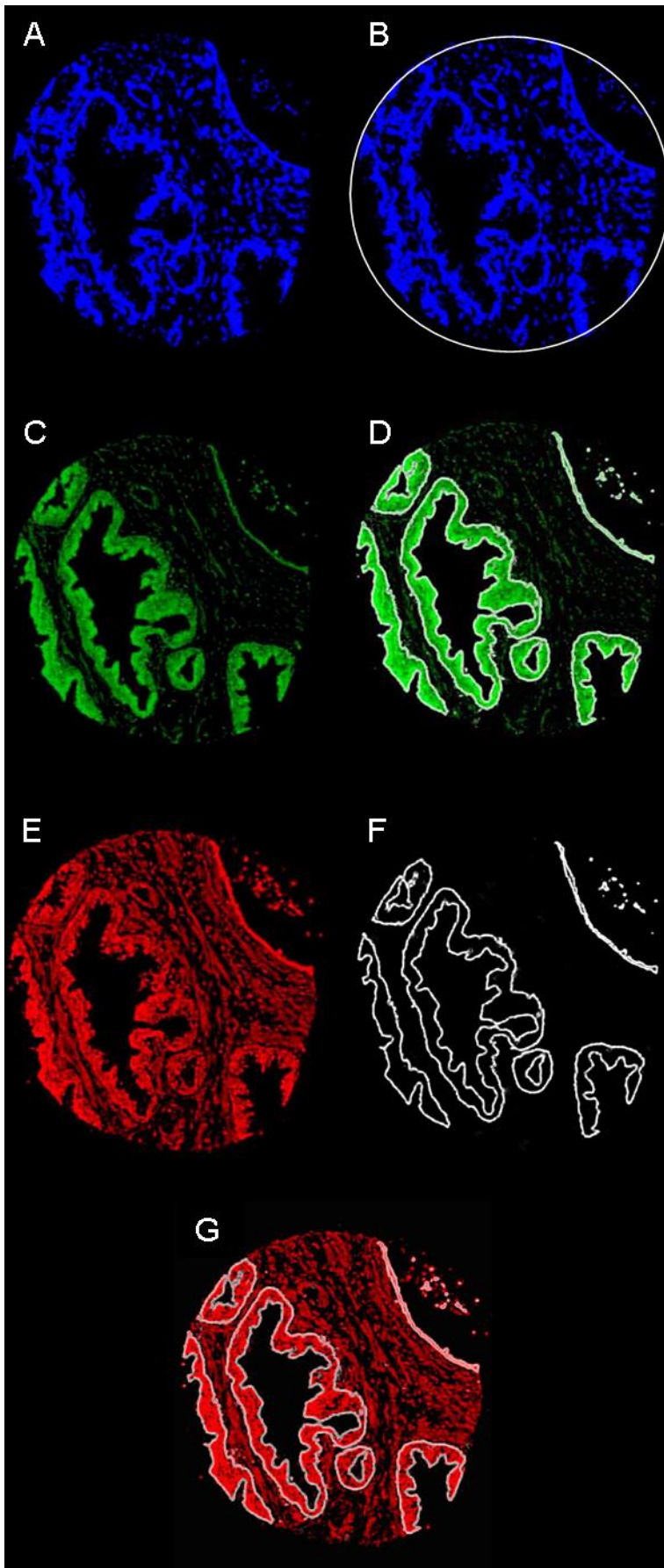


Abb. 15 Prinzip der automatisierten quantitativen Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen bei Prostatagewebe: Erstellung und Anwendung einer Maske am Beispiel der Biopsie einer benignen Hyperplasie (BPH).

- A) DAPI-Färbung der Zellkerne
- B) Kennzeichnung der Biopsie anhand der DAPI-Färbung
- C) IF-Färbung der Drüsenzellen (PSA-Antikörper, Dako)
- D) Erstellung einer Maske anhand eines Intensitätsschwellenwertes. Ausschließlich Drüsenzellen sollten in die Maske eingeschlossen werden.
- E) IF-Färbung des zu untersuchenden Antigens (hier MYC, Antikörper NCL-cMYC, Novokastra)
- F) Digitale Maske
- G) Verwendung der Maske zur Markierung der Drüsenzell-Bereiche, innerhalb derer die Fluoreszenz-Intensitäten pixelgenau gemessen werden sollen. Anschließend wird für jede Biopsie der Mittelwert der Intensitäten gebildet.

3.4.2 Vergleich der automatisierten und der visuellen Auswertung von Immunfärbungen an Prostata-Gewebe-Mikroarrays am Beispiel von MYC

Zur Untersuchung, ob sich bei Verwendung des gleichen Gewebe-Mikroarrays die Ergebnisse einer konventionellen, doppel-blinden IHC-Auswertung am Mikroskop mit den Ergebnissen einer automatisierten, digitalen Auswertung von Immunfärbungen vergleichen lassen, wurde der MYC-Antikörper gewählt (Abb. 16): Zum einen wiesen die zytoplasmatischen IHC-Färbungen von MYC im Gegensatz zu allen anderen bei der IHC-Analyse verwendeten Antikörpern sowohl Unterschiede zwischen benignen und malignen Proben als auch Korrelationen mit sämtlichen untersuchten pathologischen Parametern auf, zum anderen sollte eine zytoplasmatische Färbung zur Auswertung von Intensitäten besser geeignet sein als eine Färbung von Zellkernen, deren Durchmesser nur wenig oberhalb der Auflösung des verwendeten Fluoreszenzscanners liegt.

Ein Antikörper gegen PSA in Kombination mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy7 wurde zur spezifischen Markierung der Drüsenzellen verwendet. Zur Generierung der Drüsenzell-markierenden Maske wurde ein Grenzwert festgelegt, welcher die Cy7-Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Drüsenzellen im Wesentlichen ein-, die schwache Hintergrundfluoreszenz jedoch ausschloss. Anschließend wurden die Cy5-Fluoreszenzintensitäten, welche MYC kennzeichneten, pixelgenau innerhalb der Maske gemessen.

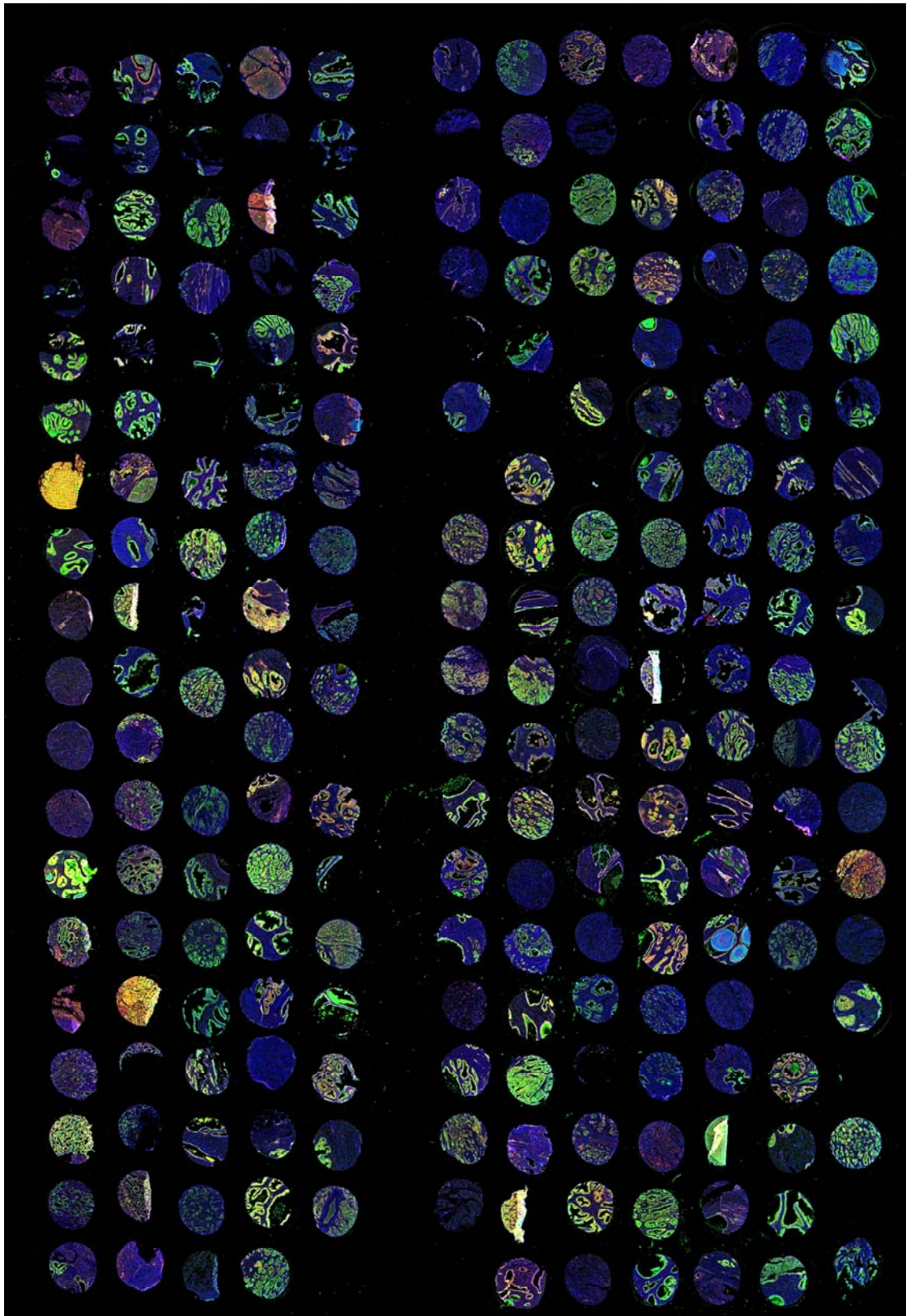


Abb.16 Immunfluoreszenzfärbung auf einem Prostata-Gewebe-Mikroarray. Ein PSA-Antikörper wurde zur Markierung der Prostata-Drüsenzellen verwendet (grün). Die Fluoreszenzintensitäten der MYC-Immunfärbung (rot) wurden nur innerhalb der markierten Drüsenzellen gemessen. Die blaue Hintergrundfärbung stammt von der DAPI-Färbung der Zellkerne und zeigt die Lokalisation der Gewebestanden auf dem Chip an.

Statistische Auswertung der Ergebnisse der digitalen IF-Bildanalyse und Vergleich mit den Ergebnissen der konventionellen visuellen IHC-Auswertung am Beispiel von MYC

Die in der digitalen Abbildung jeder Biopsie innerhalb der Maske gemessenen Fluoreszenzintensitätswerte pro Pixel wiesen eine Normalverteilung auf. Daher eignete sich der Mittelwert, um die Fluoreszenzintensitäten der Biopsien zu beschreiben.

Der Student's T-Test wurde verwendet um herauszufinden, ob sich frühe und fortgeschrittene Prostatakarzinome bezüglich der MYC-Fluoreszenzintensitäts-Mittelwerte signifikant unterscheiden. Die klinisch-pathologischen Faktoren wurden in die gleichen zwei Gruppen zusammengefasst wie für die konventionelle visuelle IHC-Auswertung: zytologisches „Grading“ G1-2 vs. G3, Gleason Score 2-6 vs. 7-9, pT-Stadium pT2 (organbegrenzt) vs. pT3-4 (organüberschreitend).

Während die konventionellen MYC-IHC-Ergebnisse mit allen drei klinisch-pathologischen Faktoren korrelierten, unterschieden sich die MYC-IF-Mittelwerte in frühen Tumoren („Grading“ G1-2, GS2-6 bzw. pT2) nicht von den weiter fortgeschrittenen Tumoren (G3, GS7-9 bzw. pT3-4) (alle P -Werte $>0,05$).

Um herauszufinden, ob die Ergebnisse der digitalen IF-Bildanalyse mit den Ergebnissen der konventionellen Immunhistochemie bei Verwendung des gleichen Antikörpers und Gewebe-Mikroarrays korrelieren, wurden Korrelations-Tests der gepaarten Werte d. h., der IF- und IHC-Daten der gleichen Patientenproben, durchgeführt. Pearson's Produkt Moment Korrelation und die Rangkorrelation von Spearman ergaben jeweils eine durchschnittliche Übereinstimmung der IF-Daten mit den Daten der visuell doppel-blind ausgewerteten IHC von $<15\%$ (Konfidenz-Intervall: 0,137 (-0,065 - 0,328), P -Wert = 0,1832 (Pearson) bzw. P -Wert = 0,1983 (Spearman)). Die Ergebnisse zweier unabhängiger Auswertungen der IHC-Färbungen am Mikroskop (bei einer Einteilung der Immunfärbungen in 0,5er Schritten von 0 bis 4) stimmten dagegen zu durchschnittlich $>85\%$ überein (95% Konfidenz-Intervall: 0,858 (0,763 - 0,917), P -Wert = $8,882 \times 10^{-16}$ (Pearson) bzw. P -Wert = $3,620 \times 10^{-16}$ (Spearman)). Somit erfüllte die doppel-blinde visuelle Auswertung der IHC-Färbungen den Grenzwert zur Validierung von Immunfärbungen von $\geq 85\%$, während die Ergebnisse der automatisierten digitalen IF-Auswertung nicht zur Validierung visuell ausgewerteter IHC-Färbungen geeignet waren.

3.5 Untersuchung der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase (BARK1) sowie der β -Adrenergischen Rezeptoren am Zellsystem

Von den Kandidaten-Proteinen, welche mittels Immunhistochemie an Prostata-Gewebe-Mikroarrays untersucht worden waren, stellt die β -Adrenergische Rezeptor Kinase 1 (BARK1) einen neuen, beim Prostatakarzinom zuvor nicht untersuchten Kandidaten dar. Eine negative BARK1-Immunfärbung war in der IHC-Analyse ausschließlich in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen (Gleason Score 7-9) festgestellt worden. Da die Funktion dieser Kinase in der transienten Desensibilisierung Agonist-gebundener β -Adrenergischer Rezeptoren (B1AR und B2AR) besteht (Pierce et al., 2002), würde die Abwesenheit der Kinase zu einer anhaltenden Aktivität stimulierter Rezeptoren führen. Die beobachtete Abwesenheit der Kinase deutet darauf hin, dass eine erhöhte Sensibilisierung der β -Adrenergischen Rezeptoren eine Rolle bei der Progression des Prostatakarzinoms spielen könnte. Die β -Adrenergischen Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), deren Beteiligung an der Entstehung androgenunabhängig wachsender Rezidive (Bookout et al., 2003; Daaka, 2004) und der Metastasierung von Prostatakarzinomzellen diskutiert wird (Lang et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde an Zelllinien mit Hilfe spezifischer, pharmakologisch wirksamer Agonisten (Stimulatoren) und Antagonisten (Hemmern) der β -Adrenergischen Rezeptoren zuerst untersucht, ob diese Rezeptoren eine Rolle in der Zellproliferation spielen könnten.

Da die Möglichkeit maligner Zellen, einen aggressiveren Phänotyp auszubilden, jedoch nicht allein von den Signalsubstanzen abhängig ist, sondern grundlegend auf der Expression entsprechender Gene beruht, wurde anschließend die Genexpression der Kinase BARK1, der β -Adrenergischen Rezeptoren B1AR und B2AR sowie exemplarischer Gene aus den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen (rot markiert in Abb. 17) in verschiedenen Prostatakarzinom-Stadien untersucht. Repräsentativ für die verschiedenen Stadien (BPH, primäres Karzinom, Metastasen) wurden entsprechende Prostatakarzinom-Zelllinien verwendet (Tabelle 21).

Des Weiteren wurde untersucht, ob B1AR- und B2AR-spezifische, inhibierende und stimulierende Liganden über die Beeinflussung der Expression der erwähnten Gene einen

aggressiven Phänotyp ermöglichen könnten. Diese Liganden könnten dabei ähnliche Auswirkungen auf die Signaltransduktion haben wie endogene Liganden oder eine möglicherweise erhöhte bzw. erniedrigte BARK1-Expression.

Tabelle 21 Charakterisierung der Prostata-Zelllinien, welche verschiedene Stadien der Tumorprogression repräsentieren

Zelllinie	BPH-1	22RV1	LNCaP	PC-3	DU145
Ursprung	Benigne Prostata-hyperplasie	humanes primäres Prostata-karzinom (Maus-Xenograft)	Lymphknoten-Metastase	Fern-Metastase (Knochenmark)	Fern-Metastase (Hirn)
Androgen-Abhängigkeit^a	androgen-abhängig	primär androgen-abhängig	primär androgen-abhängig	nicht androgen-abhängig	nicht androgen-abhängig
Aktivität der β-Adrenergischen Rezeptoren^b	unbekannt	unbekannt	B2AR-Aktivität >> B1AR-Aktivität ^c	B2AR-Aktivität > B1AR-Aktivität ^d	B2AR-Aktivität >>> B1AR-Aktivität ^e
B1AR- und B2AR-Gen-Expression	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt

B1AR: β 1-Adrenergischer Rezeptor; B2AR: β 2-Adrenergischer Rezeptor

^a Androgen-abhängig: Androgen Rezeptor vorhanden.

Androgen-unabhängig: Zellproliferation trotz Verlust des Androgen Rezeptors.

^b Spezifische Antagonisten wurden zur Bestimmung der Aktivität der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren verwendet.

^c (Nagmani et al., 2003)

^d (Lang et al., 2004)

^e (Ramos-Jimenez et al., 2007)

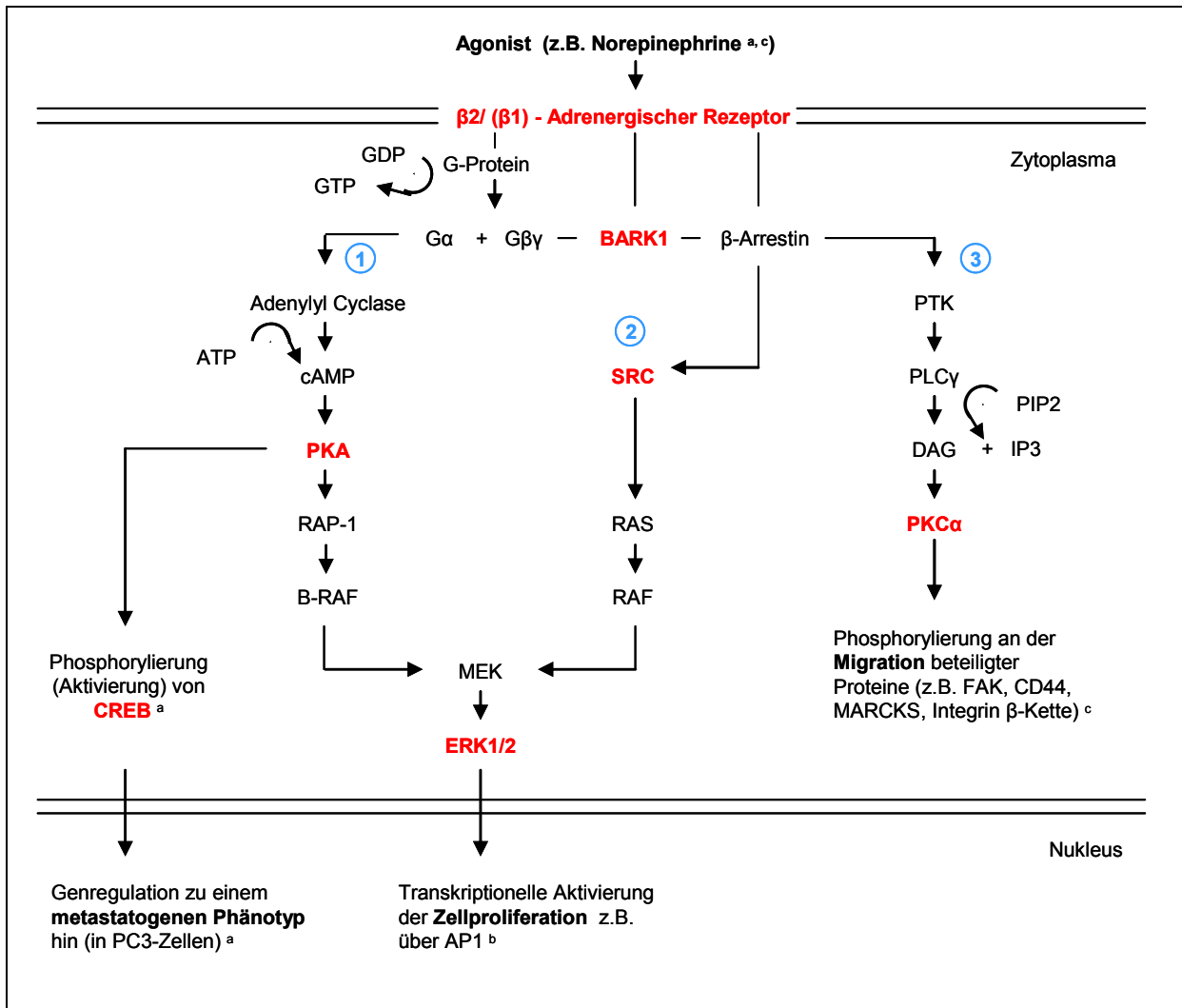


Abb. 17 Schema der Signaltransduktionswege, deren Aktivierung über die β_1 - und β_2 -Adrenergischen Rezeptoren zur androgenunabhängigen Proliferation oder zur Migration von Prostatakrebszellen führen könnte (Lang et al., 2004^a; Schuller, 2002^b; Masur et al., 2001^c). Die Bindung eines Agonisten (z. B. Norepinephrin ^{a, c}) an den β_2 - oder β_1 -Adrenergischen Rezeptor führt zur Spaltung des heterotrimeren G-Proteins. (1): Die G_{α_s} -Untereinheit aktiviert die Adenylyl Cyclase. In Folge steigt die Konzentration an cyclischem AMP (cAMP) und die Protein Kinase A (PKA) wird aktiviert. Diese aktiviert den Transkriptionsfaktor cAMP Response Element Binding Protein (CREB), welcher Zellproliferation induzieren kann ^b und in PC-3 Prostatakrebszellen Gene zur Ausbildung eines metastatogenen Phänotyps reguliert ^a. Alternativ kann PKA in einigen Zelltypen das kleine G-Protein RAP-1 aktivieren, was zur Aktivierung der Serin/Threonin Kinase B-RAF und der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Kaskade über die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase MEK und die Extracellulär-Signal-Regulierten Kinasen ERK1, ERK2 sowie zur anschließenden transkriptionellen Aktivierung der Zellproliferation (z. B. über AP1) führen kann ^b. Des Weiteren phosphoryliert und deaktivieren PKA und PKC α die Adrenergischen Rezeptoren (negative Rückkopplung). (2, 3): Die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des G-Proteins aktiviert die β -Adrenergische Rezeptor Kinase 1 (BARK1). Diese phosphoryliert und desensibilisiert spezifisch Agonist-gebundene Rezeptoren. β -Arrestin bindet BARK1 und den Rezeptor und verhindert so die G-Protein-Bindung an den Rezeptor. Somit wird eine Umschaltung der Signaltransduktionswege induziert. (2) β -Arrestin bindet zum einen die Kinase c-SRC, welche über RAS und RAF wiederum die MAPK Kaskade aktiviert, was zur Zellproliferation führen kann ^b. Zum anderen rekrutiert β -Arrestin die Protein Thyrosin Kinase (PTK) und aktiviert so die Phospholipase C γ (PLC γ), welche Phosphatidyl-Inositol-Bisphosphat (PIP₂) in Inositol-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. DAG aktiviert die Protein Kinase C α (PKC α), die Proteine phosphoryliert, welche an der Zellmigration beteiligt sind (FAK: Focal Adhesion Kinase; Actin-Capping Proteine MARCKS) ^c.

3.5.1 Wirkung von Stimulatoren und Inhibitoren der β -Adrenergischen Rezeptoren auf die Proliferation von Prostatazellen

Der mögliche Einfluss pharmakologisch wirksamer Inhibitoren und Stimulatoren der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren auf die Proliferation von fünf Prostata-Zelllinien (BPH1, LNCAP, PC-3, DU-145, 22RV1) und die Zelllinien HEK und Jurkat wurde mit Hilfe eines Proliferations-Assays untersucht. Die Zellen wurden alle 24h mit einer der pharmakologisch wirksamen Substanzen in den Konzentrationen 0nM, 10nM, 100nM, 1 μ M und 10 μ M behandelt. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurde die Zellkonzentration bestimmt, sodass die Proliferation behandelter und unbehandelter Zellen in einer Zeitreihe verglichen werden konnte.

Die Gabe hoher Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M) der pharmakologischen Substanzen äußerte sich z. T. in einer Reduktion der Zellzahlen und ist im Allgemeinen auf unspezifische toxische Effekte zurückzuführen. Die Gabe niedriger Konzentrationen sollte dagegen eine spezifische Wirkung auf die Rezeptoren ausüben. Eine spezifische Beeinflussung der Zellproliferation durch geringere Konzentrationen der Effektoren (10nM, 100nM) war während des 5-tägigen Untersuchungszeitraumes jedoch bei keiner der untersuchten Zelllinien festzustellen, wie am Beispiel von PC-3 dargestellt (Abb. 18).

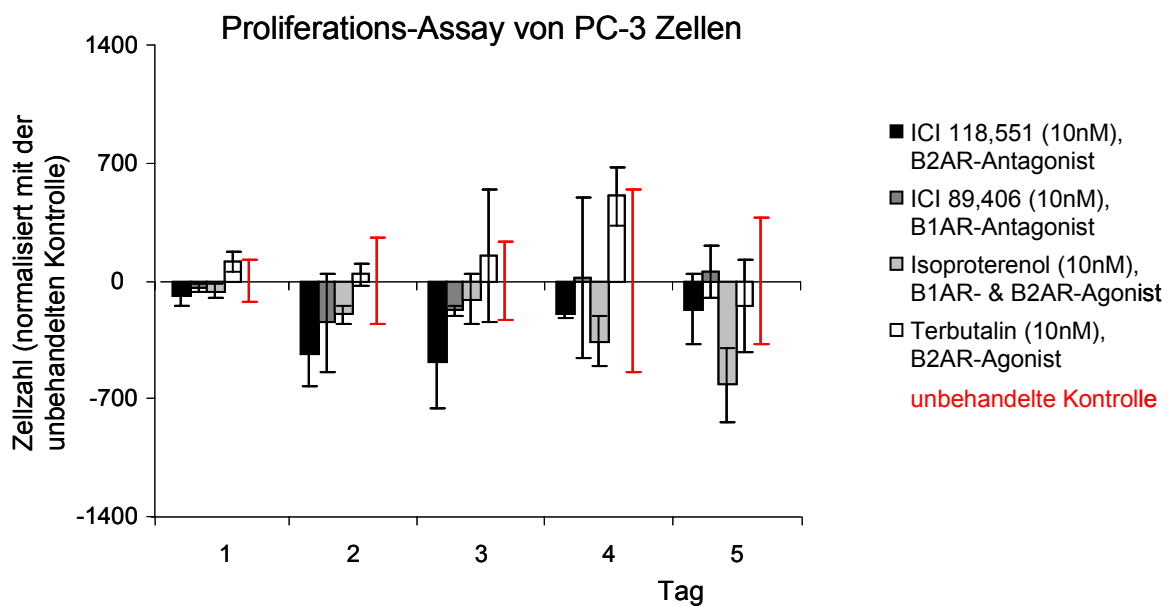


Abb. 18 Die Proliferation von PC-3 Zellen wird durch Agonisten und Antagonisten der β -Adrenergischen Rezeptoren B1AR und B2AR nicht beeinflusst. Die Zellzahl der behandelten Proben wurde mit der unbehandelten Kontrolle normalisiert.

Die Beobachtung, dass weder die Inhibition noch die Stimulation der β -Adrenergischen Rezeptoren ARB1 und ARB2 die Proliferation der untersuchten Zelllinien beeinflusste, deutet darauf hin, dass die Bedeutung dieser Rezeptoren nicht primär in der Regulation der Zellproliferation liegt.

3.5.2 Expressionsanalyse der Gene aus den Signaltransduktionswegen der β -Adrenergischen Rezeptoren

Mittels RQ-PCR wurde die Genexpression der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase BARK1 (Gensymbol ADRBK1), der β -Adrenergischen Rezeptoren B1AR (ADRB1) und B2AR (ADRB2), der Kinasen PKA α (PRKACA), PKC α (PRKCA), ERK1 (MAPK3), ERK2 (MAPK1) und c-SRC (SRC), welche Bestandteile der den β -Adrenergischen Rezeptoren potentiell nachgeschalteten Signaltransduktionswege sind (Abb. 17), sowie des Transkriptionsfaktors CREB (CREB1), der durch einen dieser Signaltransduktionswege aktiviert wird, untersucht. Die relative Expression dieser Gene wurde in Zelllinien einer gutartigen Prostatahyperplasie (BPH-1) und verschiedener Prostatakarzinom-Stadien (22RV1, LNCaP, PC-3, DU-145) verglichen (Tabelle 21). Die geringe Expression der β -Adrenergischen Rezeptor Gene in der nicht-malignen, humanen embryonalen Nieren-Zelllinie HEK diene als Negativkontrolle, die hohe BARK1-Expression der leukämischen Zelllinie Jurkat diene als Positivkontrolle. Die Expression aller untersuchten Gene wurde mit der mittleren Expression der Haushaltsgene HPRT1 und Alpha-Tubulin (TUBA1B) normalisiert. Diese beiden Gene sind im Vergleich zu anderen „Haushaltsgenen“ am besten zur Normalisierung der Genexpression in Prostatakarzinomen geeignet (Ohl et al., 2005).

In Abb. 19 sind die relativen Genexpressionen der unbehandelten Zelllinien dargestellt (n = 8 pro Zelllinie). Um herauszufinden, ob sich die Genexpressionen signifikant zwischen den Zelllinien unterscheiden, wurde für jedes Gen eine Varianzanalyse (ANOVA) mit integrierter *P*-Wert-Korrektur durchgeführt (Tabelle 22). Signifikante Ergebnisse ($P < 0,05$) sind in Abb. 19 und Tabelle 22 gekennzeichnet. Die als Positivkontrolle verwendete Genexpression der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 in der Zelllinie Jurkat ist, wie erwartet, erhöht, die Expression der β -Adrenergischen Rezeptoren in der Negativkontrolle HEK ist, wie erwartet, niedrig.

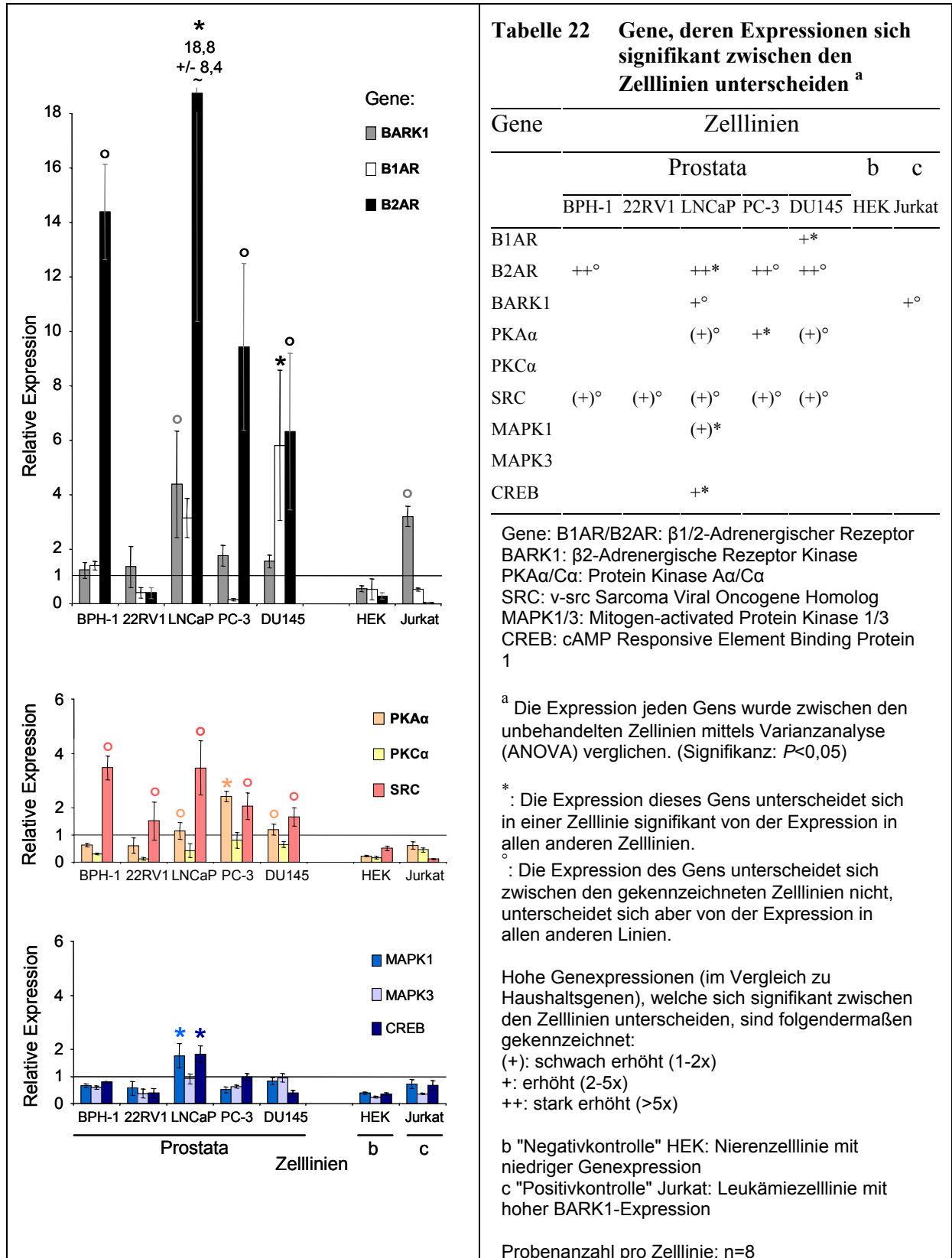


Abb. 19 Relative Genexpression in unbehandelten Prostata-Zelllinien, normalisiert mit den Haushaltsgenen HPRT1 und Alpha-Tubulin. Der mittlere Expressionwert der Haushaltsgene wurde auf „1“ gesetzt (links). Die Expression jeden Gens wurde zwischen den unbehandelten Zelllinien mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Nach Korrektur für multiples Testen wurden P -Werte $< 0,05$ als signifikant erachtet und gekennzeichnet (*, °; Definitionen rechts).

Die Expression des β 2-Adrenergischen Rezeptors ist in allen prostatistischen Zelllinien außer 22RV1 stark hochreguliert (ca. 6-19-fach). Der β 1-Adrenergische Rezeptor B1AR ist vor allem in DU145 (Hirn-Metastase) verstärkt exprimiert (6-fach), während PC-3 (Knochenmarks-Metastase) die geringste B1AR-Expression in den untersuchten Zelllinien aufweist.

Deutlich geringer differentiell exprimiert als die Gene der β -Adrenergischen Rezeptoren sind die Gene, welche für Proteine aus den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen kodieren. Mit zunehmender Entfernung der Kinasen in den Signaltransduktionswegen von den Rezeptoren ist eine abnehmende Expression der entsprechenden Gene festzustellen. Die Kinase BARK1, welche direkt mit den Rezeptoren interagiert, weist in LNCaP eine erhöhte Expression auf (4-fach). Diese Tendenz ist auch in den anderen Prostatazelllinien zu beobachten. Das Onkogen SRC, welches insbesondere vom β 2-Adrenergischen Rezeptor aktiviert werden könnte (Schuller, 2002), wird in allen Prostatazelllinien leicht, aber signifikant erhöht exprimiert (1,5-3,5-fach). Die Zelllinien, welche von Metastasen abstammen, zeigen zudem eine leicht erhöhte PKA α -Expression. Abgesehen von der leicht erhöhten MAPK1- und CREB-Expression in LNCaP weisen alle weiteren untersuchten Gene in allen Zelllinien niedrige Expressionswerte auf.

Eine herunter-regulierte BARK1-Genexpression ist in keiner der Prostata-Zelllinien festzustellen. Somit wird die Untergruppe fortgeschrittener Prostatakarzinome (Gleason Score 7-9), welche durch einen Verlust der BARK1-Immunfärbung gekennzeichnet war (Tabelle 18), durch keine der untersuchten Prostatazelllinien repräsentiert. Dass der β 2-Adrenergische Rezeptor allein oder in Kombination mit dem β 1-Adrenergischen Rezeptor (in DU145) insbesondere in den Prostatazelllinien aus Metastasen stark exprimiert wird, deutet jedoch darauf hin, dass β -Adrenergische Rezeptoren in Prostatakarzinomen eine bedeutende Rolle spielen.

3.5.3 Änderung der Genexpression nach spezifischer Stimulation und Inhibition der β -Adrenergischen Rezeptoren

Um die Rolle der β -Adrenergischen Rezeptoren in Prostatakarzinomen weiter zu analysieren, wurde die Auswirkung spezifischer Inhibitoren und Stimulatoren der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren auf die Genexpression untersucht. Eine Stimulation sollte ähnliche Auswirkungen haben wie die Abwesenheit der desensibilisierend wirkenden

BARK1, welche eine Gruppe fortgeschrittener Prostatakarzinome charakterisierte (IHC-Analyse, Tabelle 18). Prostatakarzinome weisen zudem erhöhte Konzentrationen endogener Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf (Nelson et al., 2003; Porter et al., 2001). Führt die Stimulation β -Adrenergischer Rezeptoren zu einer erhöhten Genexpression, könnte dies zu einem metastatogenen Phänotyp oder androgenunabhängiger Proliferation beitragen, während sich die Gabe spezifischer β -Blocker gegenteilig auswirken könnte.

Zur Untersuchung der Auswirkungen vier spezifischer Stimulatoren und Inhibitoren auf die Genexpression der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren sowie der sechs Kinasen aus den potentiell nachgeschalteten Signaltransduktionswegen und des Transkriptionsfaktors CREB wurden die fünf Prostata-Zelllinien sowie die beiden Kontroll-Zelllinien zu zwei Zeitpunkten (2h, 4h) mit jeweils einer der vier Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (0nM, 1nM, 10nM) behandelt und die relativen Genexpressionen mittels RQ-PCR bestimmt (Tabelle 23). Unbehandelte Zellen (0nM Effektor) dienten zur Bestimmung der normalen Genexpression in den jeweiligen Zelllinien (Abb. 19).

Tabelle 23 Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses spezifischer Stimulatoren und Inhibitoren der β -Adrenergischen Rezeptoren auf die Genexpression

	Effektoren	Zeitpunkte	Konzentrationen	Zelllinien	Gene
	ICI 89,406	2h	(0nM)	BPH-1	B1AR
	ICI 118,551	4h	1nM	22RV1	B2AR
	Isoproterenol		10nM	LNCaP	BARK1
	Terbutalin			PC-3	PKA α
				DU145	PKC α
				HEK	SRC
				Jurkat	MAPK1
					MAPK3
					CREB
					(HPRT1, TUBA1B)
Anzahl ^a	4	2	2 (+ 4x 0nM (Kontrollen))	7	9 (+ 2 Haushaltsgene)

Anzahl der Meßwerte ^a: $4 \times 2 \times 4 \times 7 \times 11 = 2016$

Anzahl der auszuwertenden Versuche ^b: $4 \times 2 \times 2 \times 7 \times 9 = 1008$

Effektoren: Isoproterenol: β 1/ β 2-AR Agonist (=Stimulator); Terbutalin: β 2-AR Agonist; ICI 89,406: β 1-AR Antagonist (=Inhibitor); ICI 118,551: β 2-AR Antagonist

Gene: B1AR/B2AR: β 1/2-Adrenergischer Rezeptor; BARK1: β 2-Adrenergische Rezeptor Kinase; PKA α /Ca: Protein Kinase A α /Ca; SRC: v-src Sarcoma Viral Oncogene Homolog; MAPK1/3: Mitogen-activated Protein Kinase 1/3; CREB: cAMP Responsive Element Binding Protein 1; HPRT1: Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan Syndrom); TUBA1B: Tubulin, alpha 1b.

^a hinzu kommen die Messwiederholungen zur Verifizierung aller Messergebnisse

^b ohne Kontrollen (0nM), Haushaltsgene (HPRT1, TUBA1B) und Messwiederholungen

Um den Einfluss der verschiedenen Faktoren (4 Effektoren in 2 Konzentrationen zu 2 Zeitpunkten) auf die jeweilige Genexpression in den verschiedenen Zelllinien beurteilen zu können und gleichzeitig mögliche Wechselwirkungen zu berücksichtigen, wurden multivariate Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Da die Stimulation oder die Inhibition eines Rezeptors nicht zwangsläufig dessen Transkription beeinflusst, wurde zunächst untersucht, ob die verschiedenen Effektoren Auswirkungen auf die Genexpression des β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptors (B1AR, B2AR) haben. Dazu wurde unter Einbeziehung aller untersuchten Faktoren (Effektor, Zeit, Konzentration, Zelllinie) ein Gesamtmodell erstellt, innerhalb dessen die *P*-Werte für multiples Testen korrigiert wurden. Die Varianzanalyse ergab, dass die vier Effektoren die Genexpression des β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptors signifikant unterschiedlich beeinflussen, wobei der Einfluss sowohl zeit-, als auch konzentrationsabhängig ist (*P*-Werte jeweils $<0,001$). Zudem wird die Genexpression in den verschiedenen Zelllinien signifikant unterschiedlich beeinflusst. Während die Genexpression in den meisten Zelllinien herunterreguliert wird (<1), bewirken die Effektoren in den androgenunabhängigen Prostata-Zelllinien aus Fern-Metastasen eine Erhöhung der Genexpression: In PC-3 wird B1AR, in DU145 wird B2AR verstärkt exprimiert (Abb. 20).

Beeinflussung der Genexpression von B1AR und B2AR durch spezifische Effektoren

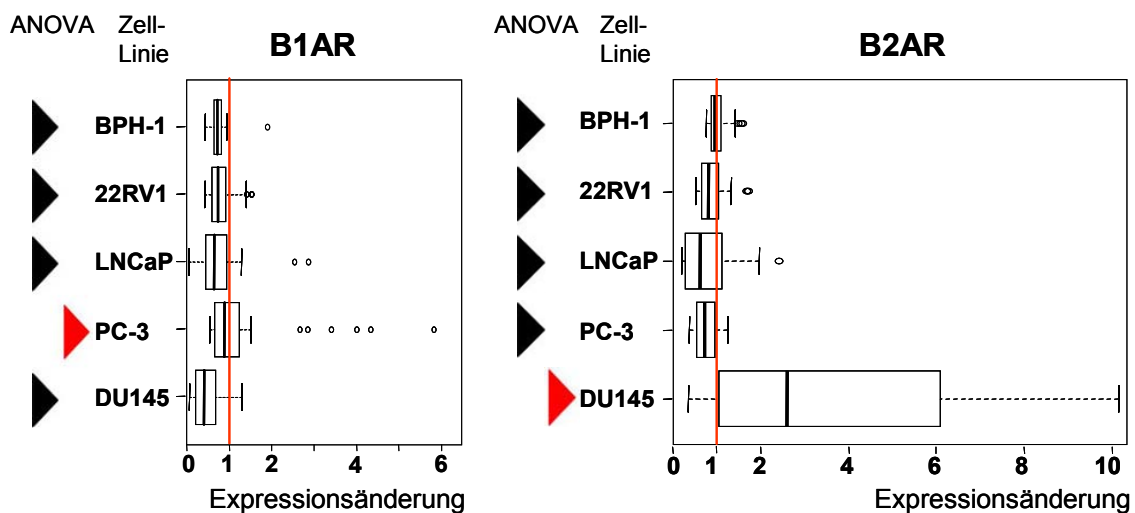


Abb. 20 Expressionsänderung der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptor Gene (B1AR, B2AR) in Prostata-Zelllinien nach Einwirkung spezifischer Stimulatoren und Inhibitoren der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren (Isoproterenol, Terbutalin, ICI 118,551, ICI 89,406; Konzentrationen: je 0nM, 1nM, 10nM, Zeitpunkte: je 2h, 4h) gegenüber unbehandelten Kontrollen (Expression=1) (Boxplot-Darstellung). Eine multivariate Varianzanalyse (ANOVA) ergab eine signifikant unterschiedliche Beeinflussung der B1AR-Expression in PC-3- und der B2AR-Expression in DU145-Zellen im Vergleich zur Expression in den anderen Zelllinien, symbolisch dargestellt durch ein rotes Dreieck. (Symbol-Erklärungen in Abb. 21 und Kapitel 2.2.7.5.)

Welche der β 1- bzw. β 2-spezifischen Effektoren für diese Genexpressionsänderungen verantwortlich sind, ist in Tabelle 24 zusammengefasst. Dabei scheinen die Änderungen der Genexpressionen weder von der Spezifität der Effektoren für die jeweiligen Rezeptoren abhängig zu sein noch davon, ob Inhibitoren oder Stimulatoren eingesetzt wurden. In der Zelllinie PC-3, welche unbehandelt eine sehr niedrige relative B1AR-Expression aufweist (0,15 bezüglich der Haushaltsgenexpression, siehe Abb. 19), führen drei der Effektoren (Terbutalin, ICI 118,551 und ICI 89,406) zu einer Expressionssteigerung um das maximal 4- bis 6-fache und somit zu einer maximalen relativen Expression von 0,9. Da der Medianwert der B1AR-Expressionsänderung nach Einwirkung dieser drei Effektoren bei ~ 1 liegt, wird die Expression der Hälfte der Proben nicht (1) oder negativ (<1) beeinflusst. In DU145-Zellen führen alle vier Effektoren zu einer verstärkten B2AR-Expression, wobei die Inhibitoren die stärksten Effekte aufweisen: ICI-118,551 bewirkt eine bis zu 18-fache, ICI-89,406 eine bis zu 58-fache Expressionssteigerung (Medianwert: ca. 7-fache Steigerung) (Abb. 21). Bei einer relativen B2AR-Expression von ca. 6 in unbehandelten DU145-Zellen können diese Effektoren somit hohe relative Expressionswerte bewirken (bis zu 100 bzw. 350, Medianwert: 42).

Die B1AR- und B2AR-Expression in den anderen Zelllinien wird dagegen nicht oder negativ beeinflusst (Tabelle 24).

Tabelle 24 Einfluss β 1- und β 2-spezifischer Effektoren auf die Genexpression der β -Adrenergischen Rezeptoren (B1AR, B2AR) in Prostata-Zelllinien ^a

Gene	Effektoren	Prostata-Zelllinien				
		BPH-1	22RV1	LNCaP	PC-3	DU145
B1AR	Isoproterenol	-	-	0/+*	-	- ^o
	Terbutalin	-	-	0*	+ ^o	- ^o
	ICI 118	-	-	-	+ ^o	0
	ICI 89	-	-	-	+ ^o	0
B2AR	Isoproterenol	-	- ^o	0	-	+ ^o
	Terbutalin	-/0	-/0	0	-	+ ^o
	ICI 118	-/0	- ^o	0	-	+++*
	ICI 89	-/0	-/0	-	-	+++*

Effektoren: Isoproterenol: β 1/ β 2-AR Agonist (=Stimulator); Terbutalin: β 2-AR Agonist; ICI 89,406: β 1-AR Antagonist (=Inhibitor); ICI 118,551: β 2-AR Antagonist
Gene: B1AR/B2AR: β 1/2-Adrenergischer Rezeptor

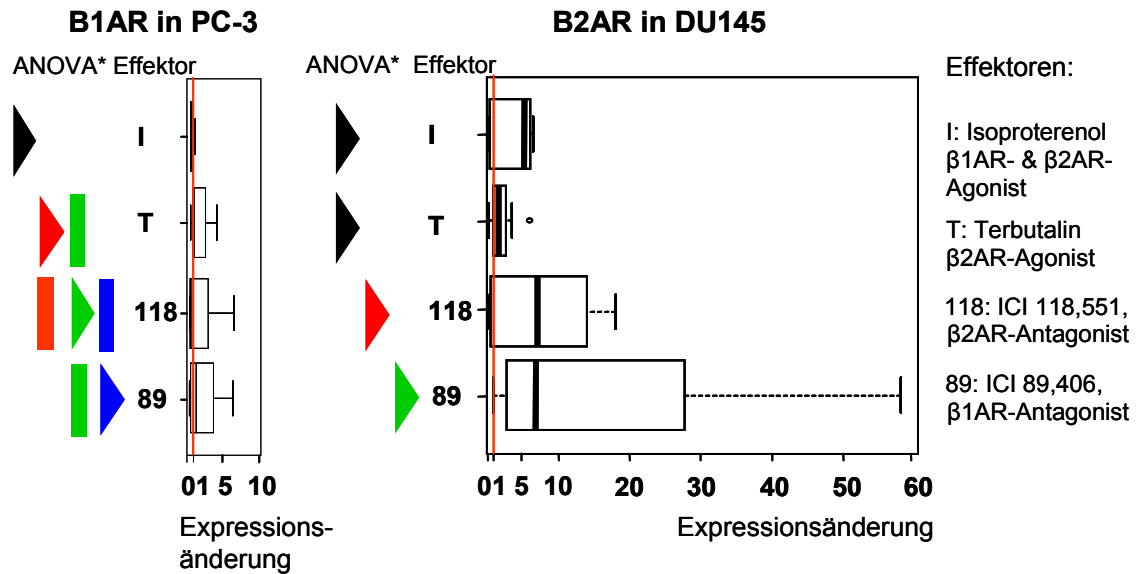
^a Die Auswirkungen der verschiedenen Effektoren auf die Genexpression von B1AR bzw. B2AR wurde innerhalb jeder Zelllinie mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. (Signifikanzniveau: $P < 0,05$).

* : Die Beeinflussung der Expression durch den verwendeten Effektor unterscheidet sich signifikant von der Beeinflussung durch andere Effektoren.

^o : Die Beeinflussung der Genexpression unterscheidet sich zwischen diesen Effektoren nicht, ist aber signifikant unterschiedlich zum Einfluss der anderen Effektoren.

Wirkung der Effektoren auf die Genexpression: -: negativer Effekt (Herunterregulation der Genexpression); 0: kein Effekt; +: Expression erhöht (<5x); ++ : stark erhöht (<20x); +++ : sehr stark erhöht (bis 58x)

Beeinflussung der Genexpression von B1AR in PC-3 und B2AR in DU145 durch spezifische Effektoren



* Optische Darstellung signifikanter Ergebnisse ($P < 0,05$) der multivariaten Varianzanalyse (ANOVA)

▷ Dieser Effektor unterscheidet sich signifikant von einem weiteren Effektor.

▷ Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Effektoren.

▷ Zwischen beiden Effektoren gibt es keine signifikanten Unterschiede. Gegenüber anderen Effektoren weisen sie dieselben signifikanten Unterschiede auf.

Abb. 21 Einfluss spezifischer Effektoren der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren auf die Expression der Rezeptorgene B1AR bzw. B2AR in den Prostatazelllinien metastatischen Ursprungs, PC-3 bzw. DU145. Während alle Effektoren außer Isoproterenol in PC3-Zellen eine leicht erhöhte B1AR-Expression bewirken können (bis zu 6-fach), führen alle Effektoren in DU145 zu einer stark erhöhten Expression des B2AR-Gens (bis zu 58-fach) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Expression=1) (Boxplot-Darstellung). Ob sich der Einfluss der einzelnen Effektoren signifikant unterscheidet, wurde in einer multivariaten Varianzanalyse (ANOVA) überprüft und in der Abbildung in einer Farbsymbolik dargestellt (siehe Kapitel 2.2.7.5). So wird ersichtlich, dass sich der Einfluss von Isoproterenol (schwarz) auf die Expression von B1AR in PC-3 Zellen signifikant von dem Einfluss aller anderen Effektoren (andere Farben) unterscheidet. In DU145 unterscheiden sich die Einflüsse von ICI 89,406 (grün) und ICI 118,551 (rot) signifikant voneinander sowie von Isoproterenol und Terbutalin, welche sich ihrerseits nicht voneinander unterscheiden (beide Dreiecke schwarz).

Welchen Einfluss die Effektoren auf die Expression der anderen untersuchten Gene haben, deren Produkte in den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen involviert sind, wurde sekundär in Einzelmodellen für jede Zelllinie geklärt. Innerhalb der Einzelmodelle, aber nicht zwischen verschiedenen Modellen, wurde für multiples Testen korrigiert. Ebenso wie der Versuchsaufbau hatte die Analyse dieser Fragestellungen somit explorativen Charakter. In allen Modellen galten *P*-Werte <0,05 als signifikant.

Tabelle 25 Einfluss der Effektoren der β 1-/ β 2-Adrenergischen Rezeptoren auf die Genexpression in Prostata-Zelllinien^a

Gene	Prostata-Zelllinien				
	BPH-1	22RV1	LNCaP	PC-3	DU145
B1AR	-	-°	0/-	+	-
B2AR	0/-	-°	0/-	-	+
BARK1	0/-	0	0/-	-	0/-
PKA α	0/-	0	0/-	-	0
PKC α	0/-	0	0/-	-	0
SRC	0/-	0	0/-	-	0/-
MAPK1	0	0	0/-	0/-	0/-
MAPK3	0/-	0	0/-	-	0
CREB	0/-	0	0/-	-	0

Gene: B1AR/B2AR: β 1/2-Adrenergischer Rezeptor; BARK1: β 2-Adrenergische Rezeptor Kinase; PKA α /Ca: Protein Kinase A α /Ca; SRC: v-src Sarcoma Viral Oncogene Homolog; MAPK1/3: Mitogen-activated Protein Kinase 1/3; CREB: cAMP Responsive Element Binding Protein 1

^a Der Einfluss der 4 Effektoren der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren (Isoproterenol, Terbutalin, ICI118,551, ICI 89,406) in je 3 Konzentrationen (0, 1, 10nM) zu je 2 Zeitpunkten (2h, 4h) auf die Expression der 9 Gene wurde in je einem multivariaten Modellen pro Zelllinie mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen (Signifikanz: $P < 0,05$).

* : Die Expression dieses Gens unterscheidet sich signifikant von der Expression aller anderen Gene innerhalb derselben Zelllinie.

° : Keine signifikant unterschiedliche Expression der Gene untereinander, aber signifikant unterschiedliche Expression im Vergleich zu allen anderen Genen innerhalb derselben Zelllinie.

Einfluß der Effektoren auf die Genexpression:
-: negativer Einfluss; 0/-: kein bis negativer Einfluss; 0: kein Einfluss; +: positiver Einfluss

Zusätzlich zur erhöhten Expression von B1AR in PC-3 und B2AR in DU145 waren diese beiden β -Adrenergischen Rezeptor Gene in der Zelllinie 22RV1 gegenüber den anderen untersuchten Genen signifikant herunterreguliert (Tabelle 25). Im Vergleich zur teilweise starken Beeinflussung der Genexpression der Rezeptoren hatten die Effektoren jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der Komponenten der potentiell nachgeschalteten Signaltransduktionswege.

4 Diskussion

Prostatakarzinome stellen die zweithäufigste Krebsart und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern in Europa dar. Im Gegensatz zu Tumoren, bei denen im Wesentlichen ein zentrales Gen für die Entstehung des Tumors verantwortlich ist (z. B. RB1 beim Retinoblastom, BCR/ABL-Fusionsgen bei der chronisch-myeloischen Leukämie), handelt es sich bei der Prostatakarzinogenese um einen mehrstufigen Prozess, bei dem viele Gene involviert sind. Nur von wenigen Genen ist eine Beteiligung an der Tumorprogression zum metastasierten Karzinom (möglicherweise PTEN) oder an der Entwicklung androgen-unabhängiger Rezidive (Androgen-Rezeptor) bekannt. Welche Gene bei der Initiation des Prostatakarzinoms und der Progression von frühen, oft jahrelang latenten Stadien (organbegrenzt, hoch- bis mäßig differenziert) zu aggressiven, undifferenzierten, organüberschreitenden Stadien beteiligt sind, ist weitgehend noch unbekannt.

Bei der Suche nach Genen, welche bei der Initiation und Progression des Prostatakarzinoms beteiligt sein könnten, stellen Mikroarray Technologien hocheffektive Werkzeuge zur Untersuchung numerischer Veränderungen der Gene, Transkripte und Proteine dar. Numerische chromosomale Aberrationen wurden beim Prostatakarzinom mittels „Vergleichender Genomischer Hybridisierung“ (CGH) und Matrix-CGH untersucht (Paris et al., 2003; Ribeiro et al., 2006b). Die Unterschiede im Transkriptom von benignem Prostatagewebe (meist BPH) und Karzinomen wurden in einer Meta-Analyse von vier unabhängigen Expressions-Mikroarray Studien analysiert (Rhodes et al., 2002). Diese Studien liefern bei einer begrenzten Anzahl an Tumorproben eine große Anzahl an Kandidatengenen, deren potentielle Beteiligung an der Prostatakarzinogenese bisher größtenteils ungeklärt ist. Um herauszufinden, ob die einzelnen Kandidatengene bei der Prostatakarzinogenese eine Rolle spielen könnten, ist es erforderlich, die Kandidaten in einem großen Tumorkollektiv zu untersuchen. Die in dieser Studie eingesetzte Gewebe-Mikroarray Technologie gewährleistet dabei gleichbleibende experimentelle Bedingungen und somit eine Vergleichbarkeit der Analyse-Ergebnisse. Welche numerischen Chromosomenaberrationen sowie Änderungen von Transkriptmengen zu Änderungen der Proteinexpression führen und somit neben einer potentiellen Anwendbarkeit in der Diagnostik auch funktionell biologisch von Bedeutung sein könnten, wurde in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie an Gewebe-Mikroarrays untersucht. Proteine, deren Expression mit der Tumorprogression korrelieren, wurden als Progressionsmarker identifiziert. Einer dieser Marker, die β -Adrenergische Rezeptor Kinase 1

(BARK1), wurde in dieser Studie erstmals in Tumoren analysiert. Die Rolle dieses Proteins in der Tumorentwicklung wurde in funktionellen Analysen an Zelllinien weiter untersucht.

4.1 Identifikation von Kandidatengen durch den Vergleich publizierter Daten von Genom- und Transkriptom-Profilen

In dieser Arbeit wurden bei Prostatakarzinomen neue Kandidatengene, welche für die Prostatakarzinogenese relevant sein könnten, erstmals durch einen systematischen Vergleich rekurrenter genomischer Veränderungen mit Veränderungen des Expressionsprofils identifiziert. Dazu wurden die chromosomalen Veränderungen von 145 primären Prostatakarzinomen aus sechs genomischen Studien (CGH-Studien) (Akers et al., 2001; Sattler et al., 1999; Steiner et al., 2002; Verdorfer et al., 2001; Wolter et al., 2002; Zitzelsberger et al., 2001) und von 16 primären Karzinomen aus der ersten Array-CGH Studie, welche an Prostatakarzinomen durchgeführt wurde (Paris et al., 2003), verglichen. Um Kandidatengene zu identifizieren, welche direkt von diesen chromosomalen Imbalancen betroffen sein könnten, wurden die minimal überlappenden Regionen mit den chromosomalen Lokalisationen der 500 bei Prostatakarzinomen versus gutartigem Prostatagewebe am stärksten differentiell exprimierten Genen verglichen. Letztere entstammten einer Meta-Analyse, die vier unabhängige Expressions-Mikroarray Datensätze von insgesamt 61 nicht-metastasierten Prostatakarzinomen verglich (Rhodes et al., 2002). Diese explorative Analyse identifizierte 60 Kandidatengene. Sechs dieser Kandidaten wurden in dieser Studie auf Gewebe Mikroarrays weiter analysiert. Dabei handelte es sich um diejenigen Kandidaten, für welche zum einen Antikörper zur Anwendung in Formalin-fixiertem Gewebe verfügbar waren, und die zum anderen vornehmlich in den zu analysierenden benignen und malignen Drüsenzellen exprimiert werden, und nicht im umgebenden fibromuskulären Gewebe (Stroma). Diese Voraussetzungen waren bei fünf in Prostatakarzinomen versus benignem Gewebe stärker exprimierten Kandidaten (FASN, MYC, BARK1, PP1 α und NM23-H1), aber nur bei einem der schwächer exprimierten Kandidaten (PP2A) erfüllt. Viele der Gene, welche in der Expressions-Mikroarray Meta-Analyse (Rhodes et al., 2003) als in Prostatakarzinomen versus benignem Gewebe stärker exprimierten Gene identifiziert worden waren, darunter FASN, MYC, PP1 α und NM23-H1, wurden später in einer Expressions-Mikroarray-Analyse an 88 Prostataprobe, welche neben malignen und benignen Drüsen auch Stroma-Anteile berücksichtigte, bestätigt (Stuart et al., 2004). Es stellte sich jedoch heraus, dass insbesondere

einige der Gene, welche in der Expressions-Mikroarray Meta-Analyse von Rhodes et al. als in Tumoren gegenüber benignem Gewebe als vermindert exprimiert detektiert worden waren, Stroma-spezifische Proteine kodiert (Stuart et al., 2004). Die unterschiedliche Expression dieser Gene spiegelte die geringeren Anteile an Bindegewebe in Tumoren im Vergleich zu benignem Gewebe wider. Auch einige der Gene, welche in die Liste der Kandidatengene eingegangen waren (Anhang Tabelle 27), werden im Wesentlichen im Stroma exprimiert, darunter Lamin alpha 4 (LAMA4) (6q12), welches in der Expressions-Array Meta-Analyse von Rhodes et al. als dritt-schwächstes in Tumoren exprimiertes Gen identifiziert worden war, oder die Peptidylglycine alpha-amidating Monooxygenase (PAM) (Stuart et al., 2004). Die Protein Phosphatase 2A gehörte jedoch nicht zu den Stroma-spezifisch exprimierten Genen, sondern wies eine geringere Expression in malignen gegenüber benignen Zellen auf und wurde somit als Kandidat ebenfalls bestätigt.

Die explorative Datenanalyse an Genom- (cCGH, aCGH) und Transkriptom- (Expressions-Mikroarray) Datensätzen lieferte somit Kandidaten auf numerisch rekurrent veränderten Chromosomenbanden, welche zusätzlich in Prostatakarzinomen im Vergleich zu benignem Prostatagewebe differentiell exprimiert werden. Von diesen eigneten sich diejenigen Kandidaten zur weiteren Analyse auf Gewebe-Mikroarrays, welche spezifisch in benignen bzw. malignen Drüsenzellen exprimiert werden. Diese Voraussetzung ist für die mittels IHC untersuchten sechs Kandidaten erfüllt, wie die Lokalisation der Immunfärbungen der entsprechenden Antikörper im Gewebe (Abb. 10) zeigte und durch eine Expressions-Analyse, welche benigne Drüsenzellen, maligne Drüsenzellen und Stroma-Anteile differentiell betrachtete, bestätigt wurde.

4.2 Immunhistochemische Analyse differentiell exprimierter Proteine in Prostatakarzinomen mittels Gewebe-Mikroarrays

Ziel dieser Studie war die Identifizierung von Proteinen, die beim Prostatakarzinom von biologischer oder klinischer Relevanz sein könnten. Sechs der identifizierten Kandidaten, für welche geeignete Antikörper zur IHC-Analyse verfügbar waren, wurden detailliert an einem großen Tumorkollektiv unter Verwendung der Gewebe-Mikroarray-Technologie untersucht: FASN, PP1 α , PP2A, NM23-H1, MYC und BARK1.

Die Fettsäuresynthase (FASN) ist ein Androgen-reguliertes Enzym, welches für die de-novo Synthese von Fettsäuren erforderlich ist. Die Hochregulation der FASN mRNA- und Protein-Expression ist eines der frühesten und häufigsten Ereignisse in der Entwicklung von Prostata Karzinomen und mit der Tumorinitiation assoziiert (Rossi et al., 2003; Swinnen et al., 2002). Dementsprechend wurde in der vorliegenden Studie eine deutlich stärkere Proteinexpression in Tumoren als in benignen Prostatahyperplasien festgestellt. Des Weiteren korrelierte die FASN-Expression in der multivariaten Analyse mit hohen Gleason Scores, was mit früheren Berichten übereinstimmt (Shurbaji et al., 1996). Diese Ergebnisse demonstrieren die Validität unseres experimentellen Ansatzes und unterstreichen zusätzlich die potentielle Bedeutung der Fettsäuresynthase als molekularer Marker und therapeutisches Zielmolekül in Prostatakrebs wie zuvor vorgeschlagen (Baron et al., 2004).

Die Protein-Phosphatasen PP1 α und PP2A stellen zwei der neuen Kandidaten dar, die in dieser Studie untersucht wurden. Sie regulieren tumorrelevante Zellfunktionen wie Signaltransduktion, Apoptose, Synthese und intrazellulären Transport von Proteinen, RNA-Splicing und die Kontrolle des Zellzyklus (Garcia et al., 2003; Janssens, Goris, 2001). Das Gen PPP1CA, welches die katalytische Untereinheit von PP1 α kodiert, ist auf der Chromosomenbande 11q13 lokalisiert, welche insbesondere in Array-CGH-Analysen bei Prostatatumoren rekurrente chromosomale Zugewinne aufweist (Paris et al., 2003). Entsprechend wiesen in der vorliegenden Studie Tumoren im Vergleich zu benignen Prostatahyperplasien (BPH) eine verstärkte zytoplasmatische PP1 α -Immunfärbung auf. Die Korrelation der zytoplasmatischen PP1 α -Immunfärbung mit hohen Gleason Scores (8-9) spricht für eine Rolle dieser Phosphatase in der verminderten Differenzierung der Drüsenzellen während der Tumorprogression.

Im Gegensatz zu PP1 α korrelierte die zytoplasmatische und nukleäre Immunfärbung der Protein Phosphatase PP2A mit dem zytologischen „Grading“ der Tumoren. Dieses „Grading“-System basiert zwar ebenso wie das Einteilungssystem nach Gleason auf der Differenzierung des Tumors, stellt im Gegensatz zum Gleason Score jedoch keinen international anerkannten prognostischen Parameter dar.

Protein Phosphatasen werden auf Grund ihrer Beteiligung an zahlreichen tumorrelevanten Zellfunktionen zunehmend als molekulare Angriffspunkte für neue Therapeutika diskutiert. Inhibitoren der Protein Phosphatasen wurden bereits in der Behandlung maligner Hepatome sowie von Karzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes eingesetzt (McCluskey et al., 2002). In Anbetracht der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse könnten solche Inhibitoren

insbesondere unter Berücksichtigung des Expressionsstatus der Protein Phosphatasen in zukünftigen therapeutischen Strategien zur Behandlung von Prostatakarzinomen Anwendung finden.

Ein weiterer Kandidat, welcher in dieser Studie analysiert wurde, ist das bei der Metastasierung eine Rolle spielende Tumorsuppressorgen NM23-H1, dessen Proteinprodukt an der Synthese von Desoxynukleotiden beteiligt ist (Steeg, 2003). In Prostatakarzinomen wurde eine inverse Beziehung zwischen NM23-H1 Expression und Metastasierungs-Status beschrieben (Konishi et al., 1993). Eine Korrelation mit der Progression primärer Prostatatumoren wird dagegen kontrovers diskutiert (Igawa et al., 1994; Konishi et al., 1993). In der vorliegenden Studie wurde keine Korrelation der NM23-H1-Immunfärbung mit klinisch-pathologischen Parametern festgestellt.

Im Gegensatz dazu wurde der fünfte Kandidat, MYC, nicht nur zwischen Tumoren und benignen Prostatahyperplasien differentiell exprimiert, sondern korrelierte auch mit beiden zur Verfügung stehenden prognostischen Parametern, d. h. sowohl mit dem Gleason Score als auch mit dem pT-Stadium. Interessanterweise nahm die MYC-Immunfärbung dabei mit zunehmender Tumorprogression ab.

Das MYC-Gen ist auf Chromosom 8q lokalisiert. Zugewinne des Chromosomenarms 8q stellen ein frühes Ereignis in der Prostatakarzinogenese dar (Alers et al., 2001). Die Amplifikation der Chromosomenbande 8q24, auf welcher das MYC-Gen lokalisiert ist, ist mit hohen Gleason Scores (Qian et al., 2002) und einer schlechten Prognose assoziiert (Sato et al., 1999; Tsuchiya et al., 2002). Bezüglich der MYC-Protein-Expression lagen für Prostatagewebe erst zwei Studien vor (Jenkins et al., 1997; Royuela et al., 2000). Royuela et al. beschrieben eine positive MYC-Immunfärbung sowohl in Prostatatumoren als auch in benignen Prostatahyperplasien, was mit den Beobachtungen in der vorliegenden Studie übereinstimmt. Die zweite Studie deutete darauf hin, dass die zytoplasmatische Immunfärbung von MYC (unter Verwendung des gleichen Antikörpers wie in der vorliegenden Studie) mit dem Zugewinn an Kopien des Chromosoms 8 zunahm, was wiederum mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korrelierte (Jenkins et al., 1997). Obwohl eine Zunahme der Kopienzahl von Chromosomenarm 8q auch für einen Teil der Tumoren, die in der vorliegenden Studie analysiert wurden, anzunehmen ist, war keine positive, sondern eine negative Korrelation der MYC-Immunfärbung mit der Tumorprogression festzustellen.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Protein Expression von MYC nicht primär von der Kopienzahl des Chromosomenarms 8q bzw. des MYC-Locus auf 8q24 abhängt. Diese Annahme wird durch folgende Beobachtungen unterstützt: Obwohl in benignen Prostatahyperplasien ebenso wie in gesunder Prostata ein numerisch unveränderter Chromosomensatz vorliegen sollte, wurde im gesundem Prostatagewebe junger Männer eine negative, in BPH jedoch eine positive MYC-Immunfärbung beobachtet (Royuela et al., 2000). Des Weiteren wiesen verschiedene Prostatakrebszelllinien ähnliche MYC-Transkriptlevel auf, obwohl das MYC-Gen in einigen Zellen amplifiziert war und in anderen nicht (Tsuchiya et al., 2002). Schließlich wurde in einer anderen Tumorentität, dem humanen hepatozellulären Karzinom, eine ähnliche Diskrepanz zwischen MYC-Amplifikation und Immunfärbung beschrieben wie in der vorliegenden Studie: trotz einer Amplifikation des MYC-Gens wiesen humane hepatozelluläre Karzinome eine geringere nukleäre und zytoplasmatische MYC-Immunfärbung auf als nicht-karzinomäses Lebergewebe ohne MYC-Amplifikation (Chan et al., 2004).

Diese Beobachtungen implizieren, dass die MYC-Expression in Prostatakarzinomen nicht durch einen Gen-Dosis-Effekt reguliert wird. Vermutlich ist eine verstärkte MYC-Expression für die Proliferation benigner hyperplastischer Zellen förderlich, während sie für die Aufrechterhaltung und Progression des Tumors nicht notwendig zu sein scheint. Zudem ist bekannt, dass MYC nicht nur in der Zellproliferation, sondern auch in der Apoptose eine Rolle spielt (Chan et al., 2004). Die in der vorliegenden Studie beobachtete abnehmende MYC-Proteinexpression während der Tumorprogression könnte also einen Mechanismus zur Inhibition MYC-vermittelter Apoptose darstellen.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die Immunfärbung von MYC sowohl mit dem Gleason Score als auch mit dem pT-Stadium von Prostatakarzinomen korreliert ist. Dabei handelt es sich um die beiden klinisch-pathologischen Faktoren, welche ihrerseits am besten mit dem Prostatakrebs-spezifischen Überleben korrelieren (Roehl et al., 2004). Die exakte Rolle von MYC in der Progression des Prostatakarzinoms bedarf jedoch der weiteren Klärung.

Die β -Adrenergische Rezeptor Kinase 1 (BARK1), der sechste Kandidat aus der vorliegenden Studie, ist bei Prostatakarzinomen bisher nicht untersucht worden. Diese Kinase desensibilisiert spezifisch Agonist-gebundene Adrenergische Rezeptoren. Eine verstärkte Signaltransduktion über Adrenergische Rezeptoren kann zu einer Androgen-unabhängigen Proliferation der primär androgenabhängigen Prostatakrebszelllinie LNCaP sowie zu einer

erhöhten Motilität von PC-3 Prostatakrebszellen *in vitro* und *in vivo* führen (Kasbohm et al., 2005; Lang et al., 2004; Palm et al., 2006). In der vorliegenden Studie waren negative BARK1-Immunfärbungen charakteristisch für eine Gruppe von Fällen mit hohen Gleason Scores (GS7-9). In Anbetracht der Funktion der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 würde ein Verlust dieser Kinase folglich zu einer verringerten Desensibilisierung Agonist-gebundener Rezeptoren und somit zu einer verstärkten Signaltransduktion führen. Somit könnte die verringerte BARK1-Expression zur Progression des Prostatakarzinoms beitragen.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene kombinierte Analyse von genomischen und Expressionsprofil-Studien ließ eine verstärkte Expression von FASN, BARK1, MYC, PP1 α und NM23-H1 sowie eine verminderte der PP2A-Expression in Prostatakarzinomen erwarten. Tatsächlich entsprachen FASN und PP1 α diesen Erwartungen, was auf eine Änderung der Expression durch einen Gen-Dosis-Effekt hindeutet, während die Expression aller weiteren untersuchten Kandidaten Proteine offenbar über andere Mechanismen bestimmt wird. Da multiple Mechanismen zur Initiation und Progression des Prostatakarzinoms beitragen, könnten beispielsweise numerische genomische Veränderungen anfänglich zwar zu einer veränderten Proteinexpression führen. Während späterer Phasen der Tumorentwicklung könnte dieser Effekt jedoch durch andere Mechanismen ersetzt werden.

In dieser Studie wurde ein neuer Ansatz vorgestellt, der Kandidatengene von möglicher klinischer und biologischer Relevanz lieferte. Immunhistochemische Analysen deckten mehrere Kandidaten auf, die mit klinisch-pathologischen Faktoren korrelieren, welche ihrerseits Marker für Prostatakarzinom-spezifisches Überleben darstellen (Prowatke et al., 2007).

4.3 Automatisierte Immunfluoreszenz-Analyse von Prostata-Gewebe-Mikroarrays

Zum Nachweis von Proteinen in pathologisch verändertem Gewebe wird die Immunhistochemie (IHC) eingesetzt, deren Ergebnisse generell durch eine doppel-blinde Auswertung am Mikroskop validiert werden. Auswerteverfahren zur automatisierten Quantifizierung von Immunfärbungen befinden sich in der Entwicklung. Ein Verfahren zur Auswertung digitaler Immunfluoreszenz-Abbildungen wurde unter Verwendung eines

Fluoreszenz-Scanners (Prototyp Aruba, Zeiss) in Kombination mit einer anschließenden Auswertung durch das Programm GenePix 5.0 (Axon, USA) entwickelt (Göttel, Dissertation 2007). Mit dieser Methode werden Immunfärbungen auf Gewebe-Mikroarrays analysiert, welche durch die regelmäßige Probenanordnung sowie die Behandlung aller sich auf dem Mikroarray befindenden Gewebeproben unter einheitlichen Versuchsbedingungen zur automatisierten Auswertung prädestiniert sind. Ob und unter welchen Voraussetzungen diese Methode zur quantitativen Auswertung von Immunfärbungen an Prostatagewebe geeignet sein könnte, wurde im vorliegenden Projekt untersucht.

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte digitale Bildanalyse der zytoplasmatischen Immunfluoreszenzfärbungen der Fettsäuresynthase (FASN) zeigte ebenso wie die anhand derselben Methode durchgeführte Analyse an Kolon Karzinomen (Volp et al., 2006), dass die Verwendung eines einzelnen Fluoreszenzfarbstoffes mit anschließender Mittelwertbildung der gemessenen Immunfluoreszenzintensitäten (oberhalb eines Hintergrundschwellenwertes) innerhalb einer Biopsie ausreichend sein kann, um benignes und malignes Gewebe zu unterscheiden. Voraussetzungen dafür sind neben einer spezifischen Färbung des Antikörpers insbesondere ein sehr deutlicher Unterschied der Färbungsintensitäten in den zu unterscheidenden Gruppen. Diese Voraussetzungen sind bei FASN gegeben, wie in der vorhergehenden konventionellen IHC-Analyse ebenso wie in anderen Studien gezeigt wurde (Swinnen et al., 2002).

Die mit konventioneller IHC untersuchte zytoplasmatische Immunfärbung von MYC unterscheidet weniger deutlich, aber ebenfalls signifikant zwischen Prostatakarzinomen und BPH. Mit der digitalen IF-Bildanalyse konnten diese Unterschiede jedoch nicht festgestellt werden. Eine Ursache dafür stellt die Heterogenität des Prostatagewebes dar, welches neben den zu analysierenden Drüsenzellen auch einen variablen Anteil an Bindegewebe und Drüsenlumen enthält, welcher im Allgemeinen in benignen Prostatahyperplasien hoch ist und in Tumorgewebe mit abnehmender Drüsendifferenzierung abnimmt. Da auch nach Abzug der IF-Hintergrundfärbung nicht alle Bindegewebsstrukturen von der Analyse ausgeschlossen waren, wurde eine Maske erstellt, welche gewährleisten sollte, dass ausschließlich die Intensitätswerte in dem gewünschten Zelltyp, d. h. in den Drüsenzellen, gemessen werden. Dazu wurden der Gewebe-Mikroarray-Chip mit einem Antikörper gegen das Prostataspezifische Antigen (PSA) inkubiert, welches ausschließlich in prostatistischen Drüsenzellen (benignen und malignen) exprimiert wird, und mit einem Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen. Innerhalb des fluoreszenzmarkierten Bereiches, d. h. innerhalb der Maske,

wurde die Intensität eines zweiten Fluoreszenzfarbstoffes, welcher das zu analysierende Protein (MYC) markierte, pixelgenau ermittelt.

Während die Immunfärbung von MYC nach der visuellen IHC-Auswertung sowohl benignes und malignes Gewebe als auch frühe und fortgeschrittene Karzinome unterscheidet (Prowatke et al., 2007), zeigten die Ergebnisse der digitalen IF-Bildanalyse jedoch weder eine Korrelation mit diesen klinisch-pathologischen Parametern noch mit den Daten der visuellen IHC-Auswertung (Übereinstimmung <15%), während die doppel-blinde visuelle Auswertung der IHC-Färbung eine Übereinstimmung von >85% erreicht hatte.

Eine Ursache für die unerwartet geringe Übereinstimmung der Ergebnisse der visuellen ausgewerteten IHC und der digitalen IF-Auswertung dürfte vor allem bei der Maskenerstellung liegen, welche durch mehrere Faktoren erschwert wird:

Da die Vergrößerung des Aruba Fluoreszenz Scanners (20x) im Vergleich zu dem bei der konventionellen IHC-Auswertung verwendeten Mikroskop (Vergrößerung 100x oder 200x) geringer und somit die Auflösung niedriger ist, sinkt das Verhältnis von spezifischem Signal zu Hintergrund deutlich, was sowohl bei der Immunfärbung von MYC, FASN und BARK1 (vgl. IF, Abb. 12 und IHC, Abb. 10) als auch beim Maskenantikörper PSA zu beobachten war. Zum einen ist eine spezifische Abgrenzung der PSA-Drüsenfärbung anhand eines einzigen Schwellenwertes daher nicht für alle Drüsenzellen in allen Biopsien desselben Gewebe-Mikroarrays möglich. Zum anderen hat die deutliche MYC-Immunfluoreszenzfärbung von Strukturen außerhalb der Drüsenzellen (Zellkerne im fibromuskulären Gewebe, Blutzellen, Gefäße, entzündetes Gewebe) (vgl. IF, Abb. 12 im Gegensatz zu IHC, Abb. 10) Auswirkungen auf die Maskenbildung, da Immunfärbungen im anderen Kanal durchscheinen, auch wenn der Übertragungseffekt (spill-over) nur bei wenigen Prozent liegt (bei Cy5: ca. 4% Cy7, bei Cy7: <2% Cy5) (Fluorescence Spectrum Viewer, BDBiosciences).

Des Weiteren bindet der Masken-Antikörper PSA zwar spezifisch benigne und maligne prostatiche Drüsenzellen, scheint aber zur Maskengenerierung dennoch nicht gut geeignet zu sein, da PSA ein sekretorisches Protein ist, welches in den Drüsenlumen als Bestandteil des häufig vorhandenen Drüsensekrets sowie im Blut ebenfalls angefärbt wird.

Diese unerwünschten Färbungen können daher in die Maskenbildung eingehen. Die Höhe des gesetzten Schwellenwertes entscheidet schließlich darüber, ob ein Großteil der Drüsenzellen in die Maske mit eingeschlossen wird (hohe Sensitivität) bzw. die ungewollt angefärbten Strukturen ausgeschlossen werden (hohe Spezifität).

Möglicherweise würde die Verwendung eines Antikörpers gegen ein nicht-sekretorisches Protein (z. B. Cytokeratin AE1 oder AE3) die Generierung einer digitalen Maske zur Markierung der Drüsenzellen verbessern. Da Drüsenzellen ihren apikalen Teil, welcher neben dem angesammelten Sekret auch Membranbestandteile, Organellen und Zytoplasma enthält, ins Drüsenlumen abschnüren (apokrine Extrusion), werden nicht nur die sekretorischen Proteine wie PSA, sondern auch andere Proteine im Drüsenlumen detektiert, was die Maskengeneration wiederum beeinträchtigen könnte.

Zusammenfassend stellt die automatisierte digitale Bildanalyse von IF-Färbungen eine neue Methode zur schnellen Quantifizierung von IF-Intensitäten dar. Mit dieser Methode kann malignes von benignem Gewebe unterschieden werden, wenn sich die Färbungsintensitäten sehr deutlich unterscheiden (Volp K et al., 2006). Entsprechend konnte in der vorliegenden Studie auch die Immunfärbung der Fettsäuresynthase in benignem und malignem Prostatagewebe unterschieden werden. Des Weiteren ermöglicht diese Methode die Verwendung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. Cy5, Cy7), sodass beispielsweise eine Co-Lokalisation von zwei Proteinen in denselben Zellen untersucht werden kann (Göttel, Dissertation 2007). Bei Untersuchungen in heterogenem Gewebe kann dagegen einer der beiden Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung des zu analysierenden Bereichs verwendet werden, innerhalb dessen die Immunfärbung eines Proteins untersucht werden soll, um die Analyse von Immunfärbungen, welche sich weniger stark zwischen zwei untersuchten Gruppen unterscheiden, zu ermöglichen. Zur Markierung der prostatistischen Drüsenzellen könnte die Verwendung eines Antikörpers gegen ein nicht-sekretorisches Protein dabei jedoch besser geeignet sein als der in dieser Studie verwendete PSA-Antikörper.

Möglicherweise stellt ein automatisiertes, digitales Bildanalyseverfahren in Zukunft auch in Prostatakarzinomen eine schnelle „Screening“-Methode zur quantitativen Auswertung von Immunfärbungen dar.

4.4 Untersuchung der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 sowie der β -Adrenergischen Rezeptoren in Zelllinien

Die in der immunhistochemischen Analyse an Prostata-Gewebe-Mikroarrays beobachtete negative Immunfärbung der β -Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 (BARK1) in einer Untergruppe fortgeschrittener Prostatakarzinome deutete darauf hin, dass der Verlust dieser Kinase eine Rolle in der Tumorprogression spielen könnte. Da die Funktion dieser Kinase in der transienten Desensibilisierung stimulierter β -Adrenergischer Rezeptoren (B1AR, B2AR) besteht (Pierce 2002), würde die Abwesenheit der Kinase zu einer anhaltenden Aktivität stimulierter Rezeptoren führen. Eine Beteiligung stimulierter β -Adrenergischer Rezeptoren an der Androgen-unabhängigen Proliferation und der Migration von Prostatakrebszellen wird diskutiert (Kasbohm et al., 2005; Lang et al., 2004; Palm et al., 2006). In dieser Studie wurde an Prostatazelllinien verschiedener Prostatakarzinom-Stadien untersucht, welche Rolle eine Stimulation oder Inhibition β -Adrenergischer Rezeptoren bei der Progression des Prostatakarzinoms spielen könnte.

4.4.1 Untersuchung der Auswirkung von Stimulatoren und Hemmern der β -Adrenergischen Rezeptoren auf die Zellproliferation

Während in Adenokarzinomen der Lunge und der Pankreas eine Stimulation der β -Adrenergischen Rezeptoren zur Aktivierung der Zellproliferation führen kann (Schuller, 2002), war in den fünf untersuchten Prostatazelllinien BPH-1, 22RV1, LNCaP, PC-3 und DU145 weder ein Einfluss der spezifischen Agonisten noch ein Einfluss der Antagonisten der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren auf die Zellproliferation festzustellen. Da eine negative BARK1-Immunfärbung in der IHC-Analyse an Prostata-Gewebe-Mikroarrays mit dem Differenzierungsgrad (zytologisches „Grading“, Gleason Score), nicht jedoch mit der Ausdehnung (pT-Stadium) des Prostatakarzinoms korrelierte, ist anzunehmen, dass BARK1 im Zusammenhang mit den β -Adrenergischen Rezeptoren in Prostatazellen eher eine Rolle bei der Zelldifferenzierung zu einem aggressiveren Phänotyp als in der Regulation der Zellproliferation und des Tumorwachstums spielt. Dies bestätigt frühere Untersuchungen, in denen der Neurotransmitter Norepinephrin, ein β 1/ β 2-Agonist, und der β 1/ β 2-Blocker

Propranolol die Migration von PC-3 Zellen *in vitro* und *in vivo* stimulierten bzw. inhibierten, während die Zellproliferation in keinem Fall beeinflusst wurde (Palm et al., 2006).

4.4.2 Genexpression β -Adrenergischer Rezeptoren in Prostatazellen

Neben der endogenen oder exogenen Konzentration von Liganden verleihen bestimmte genetische und genomische Veränderungen sowie Änderungen der Genexpression den Zellen einen aggressiven Phänotyp. Entsprechend weisen primäre Karzinome und Metastasen jeweils charakteristische genetische Veränderungen und Expressionsmuster auf. Die Genexpression der beiden in Prostata exprimierten Subtypen der β -Adrenergischen Rezeptoren B1AR und B2AR, der BARK1 sowie zentraler Kinasen aus den in Prostatakarzinomen potentiell nachgeschalteten Signaltransduktionswegen (Abb. 17) wurde in der vorliegenden RQ-PCR-Studie in fünf Prostatazelllinien analysiert, welche die verschiedenen Stadien der Prostatakarzinogenese repräsentieren. Hinweise auf die Regulation der untersuchten Gene in der Progression des Prostatakarzinoms können die numerischen Veränderungen der korrespondierenden chromosomalen Bereiche (Anhang Abb. 22) sowie die veränderte Anzahl der entsprechenden Chromosomen in den Zelllinien (Anhang Tabelle 28) liefern.

Der in der IHC-Analyse an Gewebe-Mikroarrays festgestellte Verlust der BARK1-Protein-Expression in einer Untergruppe fortgeschrittener Karzinome spiegelte sich in keiner der Prostatazelllinien in der BARK1-Transkriptmenge wider. Die Zelllinie LNCaP wies sogar eine leicht erhöhte BARK1-Transkriptmenge auf, welche möglicherweise zur Regulation des in dieser Linie stark exprimierten β 2-Adrenergischen Rezeptors dienen könnte. Auch in Prostatakarzinomen ist eine erhöhte BARK1-Expression festgestellt worden (Rhodes et al, 2003). Zudem weist die chromosomale Bande 11q13, welche den BARK1-Genlocus enthält, in Prostatakarzinomen Zugewinne auf (Tabelle 17, Anhang Abb. 22). In metastasierten und rekurrenten Karzinomen jedoch sind neben Zugewinnen auch ebenso viele Verluste auf 11q festzustellen. Die Zelllinien stellen zwar Modelle der Prostatakarzinogenese dar, können jedoch nicht die gesamte Breite der Heterogenität von Prostatakarzinomen repräsentieren. Möglicherweise trägt sowohl ein Verlust, als auch eine verstärkte Expression der Kinase BARK1 zur Prostataprogression bei: Bei BARK1 Verlust würde ein stimulierter Adrenergischer Rezeptor nicht gehemmt, BARK1-Überexpression dagegen würde nach der Desensibilisierung über β -Arrestin-Bindung zur Rezeptor-Internalisierung führen, welche bei β 2-Adrenergischen Rezeptoren zu einem raschen Rezeptor-Recycling und letztlich ebenfalls

zu einer Verstärkung der Signaltransduktion führen könnte (Pierce et al, 2002). In der später diskutierten explorativen RQ-PCR-Analyse kann der Einsatz spezifischer Stimulatoren und Inhibitoren der β -Adrenergischen Rezeptoren als Simulation der Wirkung einer differentiell regulierten BARK1-Expression verstanden werden.

Die wichtigsten Komponenten der β -Adrenergischen Signaltransduktion sind die β -Adrenergischen Rezeptoren selbst. Das β 2-Adrenergische Rezeptor-Gen gehörte in einer Expressions-Mikroarray Meta-Analyse zu den 500 in Prostatakarzinomen gegenüber benignem Gewebe (BPH) am stärksten exprimierten Genen (Rhodes et al., 2003), und auch die Proteinexpression scheint in Prostatakarzinomen gegenüber benignem Gewebe erhöht zu sein (7 von 10 Prostatakarzinomen exprimierten den β 2-Adrenergischen Rezeptor, nicht jedoch eine benigne Kontrolle) (Palm et al., 2006). Obwohl durch Verwendung spezifischer stimulierender und inhibierender Liganden in drei Prostatakrebszelllinien (LNCaP, PC-3, DU145) die Aktivität β -Adrenergischer Rezeptoren nachgewiesen wurde (Nagmani et al., 2003; Lang et al., 2004; Ramos-Jimenez et al., 2007), lagen zur Genexpression dieser Rezeptoren in Prostatazelllinien bisher keine Daten vor.

Die vorliegende RQ-PCR-Studie wies eine starke B2AR-Expression in allen drei Zelllinien aus Prostatakarzinom-Metastasen nach. Somit wird die Beobachtung, dass der β 2-Adrenergische Rezeptor in diesen Zelllinien aktiv ist, unterstützt (Nagmani et al., 2003, Lang et al., 2004, Ramos-Jimenez et al., 2007). In 22RV1, der Zelllinie aus einem primären Prostatakarzinom, ist B2AR nur gering exprimiert, wogegen BPH-1, die Zelllinie aus einer benignen Prostatahyperplasie, eine unerwartet hohe B2AR-Expression zeigt. Allerdings weist der Chromosomensatz von BPH-1 im Gegensatz zu 22RV1 etliche numerische Chromosomenaberrationen auf, darunter auch eine zusätzliche Kopie des Chromosoms 5, auf dem das B2AR-Gen lokalisiert ist (www.dsmz.de; Anhang Tabelle 28). Dieses zusätzliche Chromosom könnte über einen Gen-Dosis-Effekt für die ungewöhnlich hohe B2AR-Expression verantwortlich sein.

Da die Beteiligung des β 2-Adrenergischen Rezeptors an der Migration von PC3-Zellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde (Lang et al., 2004; Palm et al., 2006), kann vermutet werden, dass die in primären Prostatakarzinomen erhöhte B2AR Expression (Rhodes et al, 2003) Tumoren kennzeichnet, welche zur Metastasierung prädestiniert sind, insbesondere, wenn gleichzeitig eine erhöhte Konzentration potentieller Liganden vorliegen sollte.

Auch wenn der β 2-Adrenergische Rezeptor in Rezeptor-Aktivitäts-Messungen in den Zelllinien LNCaP, PC-3 und DU145 gegenüber dem β 1-Adrenergischen Rezeptor eine vorherrschende Aktivität aufwies (Nagmani et al., 2003; Lang et al., 2004; Ramos-Jimenez et al., 2007), ist die Signaltransduktion über den β 1-Adrenergischen Rezeptor vermutlich dennoch am Migrationsverhalten von PC-3 Zellen mitbeteiligt (Lang et al., 2004). Entsprechend weisen PC-3-Zellen in der vorliegenden RQ-PCR-Studie eine Expression des B1AR-Gens auf. Die Beobachtung, dass die B1AR-Expression deutlich niedriger ausfällt als bei den anderen vier Prostatazelllinien, könnte durch den für diese Zelllinie beschriebenen vierfachen Verlust des Chromosoms 10 im hypotetraploiden Chromosomensatz in Kombination mit einem in dieser Zelllinie häufig auftretenden Chromosomen-Rearrangement oder der Expression dieses Gens in den 3% Zellen dieser Zelllinie, welche mehr als vier Chromosomen besitzen (www.dszm.de; Anhang Tabelle 28), erklärt werden. In den beiden anderen untersuchten Zelllinien, welche von Metastasen abstammen, ist zudem eine erhöhte B1AR-Expression trotz ein- bzw. zweifachen Verlustes des Chromosoms 10 festzustellen. Möglicherweise gleicht die deutlich erhöhte B1AR Expression in DU145 die im Vergleich zu den anderen Zelllinien metastatischen Ursprungs niedrige B2AR Expression aus.

Von den untersuchten Genen der Kinasen aus den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen (SRC, PKA α , PKC α , ERK1, ERK2) und des Transkriptionsfaktors CREB wird SRC in allen Prostatazelllinien am stärksten exprimiert. Dieses Onkogen wird z. B. durch den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor aktiviert und vermittelt Signale, welche zu Zellproliferation und Zellmotilität führen können. In Prostatazellen scheint diese Kinase in Zusammenhang mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren unter Aktivierung des MAPK-Weges bei der Androgen-unabhängigen Proliferation von PC-3 und DU145 Zellen eine Rolle zu spielen (Rishu et al., 2006).

Mit zunehmender Entfernung zum Rezeptor scheinen die Kinasen aus den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen jedoch schwächer und weniger differentiell exprimiert zu werden. Da die Kinasen an der Signaltransduktion verschiedenster Rezeptoren beteiligt sind, erfolgt ihre Regulierung primär über ihre Aktivierung nach Rezeptorstimulation und erst sekundär über die Genexpression. Die MAP-Kinasen weisen als Endglieder der Signaltransduktionskette in dieser Studie die niedrigsten Expressionswerte auf. Ein in PC-3 Zellen beobachteter Verlust der MAPK-Aktivität wurde mit deren neoplastischer unkontrollierter Zellproliferation in Zusammenhang gebracht (Moro et al., 2007). MAPK3 zählt zudem in einer Expressions-Mikroarray Meta-Analyse zu den 500 in

Prostatakarzinomen gegenüber gutartigem Prostatagewebe am schwächsten exprimierten Genen, während das in der vorliegenden Studie am stärksten exprimierte Gen B2AR zu den 500 in Prostatakarzinomen am stärksten exprimierten Genen zählt (Rhodes et al., 2003). Die Expression der Gene der β -Adrenergischen Signaltransduktion in Prostatakarzinom-Zelllinien scheint somit im Wesentlichen deren Expression in Prostatakarzinomen widerzuspiegeln, was zum einen die Ergebnisse dieser RQ-PCR-Studie unterlegt und zum anderen die Verwendung der Prostatakarzinom-Zelllinien als Modelle zur Untersuchung der möglichen Rolle dieser Rezeptoren in der Progression des Prostatakarzinoms unterstützt.

Die hohe Expression und Aktivität des β 2-Adrenergischen Rezeptors in Prostatakarzinomzellen sowie das durch die Zugabe von Norepinephrin ausgelöste Migrationsverhalten von PC-3 Zellen (Lang et al., 2004) sprechen für eine bedeutende Rolle dieses Rezeptors in der Progression des Prostatakarzinoms. Die Tatsache, dass die Genexpression des β 1-Adrenergische Rezeptors trotz häufiger Chromosomenverluste in den Zelllinien, welche von Metastasen abstammen, ebenfalls erhöht ist, deutet darauf hin, dass die Expression dieses Gens aktiv hochreguliert wird. Die Chromosomenarme 10q und 5q, auf denen die Gene der β -Adrenergischen Rezeptoren lokalisiert sind, weisen im Laufe der Prostatakarzinom-Progression ebenfalls zunehmend Verluste auf (10q: 25%, 5q: 35%; Anhang Abb. 22) (Ribeiro et al., 2006). Somit könnte eine Bedeutung des β 1-Adrenergischen Rezeptors darin bestehen, bei Verlust des B2AR-Gens die Funktion dieses Rezeptors aufrecht zu erhalten, zumal das Spektrum an aktivierbaren Signaltransduktionswegen bei beiden β -Adrenergischen Rezeptoren überlappt (Schuller, 2002).

4.4.3 Änderung der Expression der β -Adrenergischen Rezeptoren in Prostatazellen durch spezifische Agonisten und Antagonisten

Zur weiteren Klärung der möglichen Rolle der β -Adrenergischen Rezeptoren und der BARK1 in der Progression des Prostatakarzinoms wurden die Auswirkungen einer spezifischen Hemmung bzw. Stimulation der β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren auf die Expression der Rezeptoren sowie der Kinasen aus den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen in Kulturzellen verschiedener Prostatakarzinom-Stadien untersucht. Die verwendeten Agonisten (Stimulatoren) und Antagonisten (Inhibitoren) simulierten dabei den Einfluss einer erhöhten bzw. erniedrigten endogenen Stimulierung bzw. Inhibition der β -Adrenergischen Rezeptoren.

Eine erhöhte Stimulation könnte zum einen durch eine erhöhte GPCR-Ligandenkonzentration (Daaka 2004) ausgelöst werden, zum anderen aber auch durch die Abwesenheit der β -Adrenergischen Rezeptore Kinase 1, wie sie in der IHC-Studie an Prostata-Gewebe-Mikroarrays bei einer Untergruppe fortgeschrittener Prostatakarzinome beobachtet wurde, erfolgen. Ob die Hemmung der Rezeptoren neben dem direkten Einfluss auf die Signaltransduktion (Bookout et al., 2003) auch Auswirkungen auf die Genexpression der an der Signaltransduktion beteiligten Rezeptoren und Kinasen hat, wurde in der vorliegenden RQ-PCR-Analyse ermittelt.

Um die Auswirkungen der vier verschiedenen, β 1- bzw. β 2-spezifischen Inhibitoren und Stimulatoren auf die Expression der 9 untersuchten Gene in den 5 Prostatazelllinien und den beiden nicht-prostatistischen Zelllinien objektiv beurteilen zu können und gleichzeitig die Auswirkungen zweier verschiedener Konzentrationen und Einwirkungszeiten der Effektoren zu berücksichtigen, wurden die Ergebnisse der RQ-PCR-Studie in einem multivariaten Modell zusammengefasst, mittels multivariater Varianzanalyse ausgewertet und zweidimensional grafisch dargestellt. Die Verwendung einer multivariaten Methode der explorativen Statistik zur Auswertung der experimentell explorativ angelegten RQ-PCR-Studie ermöglichte es, den Einfluss sämtlicher in die Analyse eingegangenen Faktoren adäquat zu berücksichtigen, was bei der Verwendung univariater Auswerteverfahren nicht möglich gewesen wäre.

Während die vier Effektoren die Genexpression der β -Adrenergischen Rezeptoren sowie der Kinasen aus den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen zumeist nicht oder negativ beeinflussten, bewirkten sowohl die beiden Stimulatoren als auch die beiden Inhibitoren eine erhöhte Expression des B1AR- bzw. B2AR-Gens in PC-3- bzw. DU145-Zellen. Trotz ihrer spezifischen Wirkung auf die β 1- und β 2-Adrenergischen Rezeptoren wirkten die Agonisten und Antagonisten somit nicht β 1- und β 2-selektiv auf die Expression der Gene B1AR und B2AR. Dieser wechselseitige Einfluss auf die Genexpression hängt vermutlich damit zusammen, dass beide Rezeptoren teilweise die gleichen Signaltransduktionswege aktivieren. Auch die Migration von PC-3 Zellen wird nicht nur durch die Aktivierung des β 2-, sondern teilweise auch durch die Aktivierung des β 1-Adrenergischen Rezeptors stimuliert, d. h. die Wirkung der β 1- und β 2-spezifischen Effektoren überlappt (Lang et al., 2004).

Die deutlich erhöhte Genexpression der β -Adrenergischen Rezeptoren in den Prostatazelllinien, welche von Metastasen abstammen (LNCaP, PC-3, DU145), sowie die durch Zugabe spezifischer Effektoren bewirkte verstärkte Expression der β -Adrenergischen

Rezeptor Gene in den Prostatazelllinien aus Fernmetastasen (PC-3, DU145) unterstützen die Hypothese, dass β -Adrenergische Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Metastasierung von Prostatakarzinomen spielen können. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass eine Stimulation der β -Adrenergischen Rezeptoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Migration von PC-3 Zellen auslöst, welche durch die Gabe von Inhibitoren (β -Blockern) gestoppt werden konnte (Palm et al., 2006). Entsprechend wurde vorgeschlagen, β -Blocker, welche bereits für andere klinische Anwendungen zugelassen sind, in der Therapie fortgeschrittener Prostatakarzinome einzusetzen. Auch wenn noch keine epidemiologischen Studien zur Analyse der Rolle von β -Blockern in der Tumorprogression durchgeführt wurden, deckten Studien eine Korrelation zwischen der Einnahmedauer von β -Blockern, welche z.B. zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen verschrieben werden, und einer reduzierten allgemeinen Krebs-Inzidenz (Algazi et al., 2004) bzw. einer reduzierten Prostatakarzinom-Inzidenz (Perron et al., 2004) auf.

In der RQ-PCR-Analyse hatten Inhibitoren in den Zelllinien, welche von einer benignen Prostatahyperplasie (BPH-1), einem primären Prostatakarzinom (22RV1) oder einer Lymphknoten-Metastase (LNCaP) abstammten, keinen Einfluss oder sogar einen negativen Einfluss auf die Expression der ansonsten verstärkt exprimierten Gene der β -Adrenergischen Rezeptoren. Das deutet darauf hin, dass β -Blocker in der Therapie von lokalen Prostatakarzinomen eingesetzt werden könnten, ohne möglicherweise über einen Rückkopplungseffekt zu einer unerwünschten verstärkten Expression dieser Rezeptor-Gene beizutragen.

Ob β -Blocker die Ausbildung von Metastasen hemmen können und insbesondere zur Therapie von Prostatakarzinomen mit erhöhter Expression der β -Adrenergischen Rezeptoren, erhöhter endogener Ligandenkonzentration oder aber fehlender BARK1-Expression, wie sie in der IHC-Studie bei einigen fortgeschrittenen Karzinomen beobachtet worden war, geeignet sind, sollte in zukünftigen Studien geklärt werden.

Obwohl immer mehr Prostatakarzinome bereits in frühen Stadien diagnostiziert werden, ist die Prostatakarzinom-spezifische Sterblichkeit nicht entsprechend zurückgegangen, da eine Heilung bereits metastasierter Prostatakarzinome bisher nicht möglich ist (Perron et al., 2002). Es ist daher essentiell, die vielfältigen molekularen Mechanismen der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms aufzuklären, um zum einen neue Progressionsmarker zu

finden und zum anderen molekulare Therapeutika zur Prävention der Tumorprogression entwickeln zu können.

In der IHC-Studie an Prostata-Gewebe-Mikroarrays wurde die β -Adrenergischen Rezeptor Kinase 1 als neuer molekularer Progressions-Marker identifiziert. Der in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen beobachtete BARK1-Verlust könnte eine verstärkte Signaltransduktion der β -Adrenergischen Rezeptoren ermöglichen. Die stark erhöhte Expression der β -Adrenergischen Rezeptor Gene in Prostatazelllinien metastatischen Ursprungs sowie die nach Stimulation dieser Rezeptoren beobachtete erhöhte Genexpression in den Zelllinien aus Fern-Metastasen spricht für eine Rolle dieser Rezeptoren in der Metastasierung, während in allen anderen Prostatazelllinien die Zugabe von Liganden keine oder eine negative Expressionsänderung dieser Gene bewirkte. Diese Ergebnisse unterstützen den Vorschlag, klinisch etablierte β -Blocker einzusetzen, um eine Progression des primären Prostatakarzinoms zum unheilbaren metastasierenden Karzinom aufzuhalten.

5 Literaturverzeichnis

- Albertsen, P.C., Hanley, J.A., Fine, J. (2005). 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *Jama*, **293**, 2095-101.
- Albertsen, P.C., Hanley, J.A., Penson, D.F., Fine, J. (2004). Validation of increasing prostate specific antigen as a predictor of prostate cancer death after treatment of localized prostate cancer with surgery or radiation. *J Urol*, **171**, 2221-5.
- Alers, J.C., Krijtenburg, P.J., Vis, A.N., Hoedemaeker, R.F., Wildhagen, M.F., Hop, W.C., van Der Kwast, T.T., Schroder, F.H., Tanke, H.J., van Dekken, H. (2001). Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies : early cancers may contain aggressive genetic features. *Am J Pathol*, **158**, 399-406.
- Alers, J.C., Rochat, J., Krijtenburg, P.J., Hop, W.C., Kranse, R., Rosenberg, C., Tanke, H.J., Schroder, F.H., van Dekken, H. (2000). Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest*, **80**, 931-42.
- Algazi, M., Plu-Bureau, G., Flahault, A., Dondon, M.G., Lê, M.G. (2004). Could treatments with beta-blockers be associated with a reduction in cancer risk? *Rev Epidemiol Sante Publique*, **52**, 53-65.
- Baron, A., Migita, T., Tang, D., Loda, M. (2004). Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*, **91**, 47-53.
- Berndt, N., Dohadwala, M., Liu, C.W. (1997). Constitutively active protein phosphatase 1alpha causes Rb-dependent G1 arrest in human cancer cells. *Curr Biol*, **7**, 375-86.
- Bethel, C.R., Faith, D., Li, X., Guan, B., Hicks, J.L., Lan, F., Jenkins, R.B., Bieberich, C.J., De Marzo, A.M. (2006). Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res*, **66**, 10683-90.
- Bookout, A.L., Finney, A.E., Guo, R., Peppel, K., Koch, W.J., Daaka, Y. (2003). Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth. *J Biol Chem*, **278**, 37569-73.
- Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H.J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T.C., Koivisto, P., Lack, E.E., Kononen, J., Kallioniemi, O.P., Gelmann, E.P. (2000). Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res*, **60**, 6111-5.
- Boyle, P., Ferlay, J. (2005). Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol*, **16**, 481-8.
- Bubendorf, L., Kononen, J., Koivisto, P., Schraml, P., Moch, H., Gasser, T.C., Willi, N., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallioniemi, O.P. (1999). Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res*, **59**, 803-6.

- Bubendorf, L., Schopfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T.C., Mihatsch, M.J. (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*, **31**, 578-83.
- Catz, S.D., Johnson, J.L. (2003). BCL-2 in prostate cancer: a minireview. *Apoptosis*, **8**, 29-37.
- Chan, K.L., Guan, X.Y., Ng, I.O. (2004). High-throughput tissue microarray analysis of c-myc activation in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*, **35**, 1324-31.
- Chen, C.S., Weng, S.C., Tseng, P.H., Lin, H.P., Chen, C.S. (2005). Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem*, **280**, 38879-87.
- Choo, R., DeBoer, G., Klotz, L., Danjoux, C., Morton, G.C., Rakovitch, E., Fleshner, N., Bunting, P., Kapusta, L., Hruby, G. (2001). PSA doubling time of prostate carcinoma managed with watchful observation alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **50**, 615-20.
- Cote, R.J., Shi, Y., Groshen, S., Feng, A.C., Cordon-Cardo, C., Skinner, D., Lieskovosky, G. (1998). Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 916-20.
- Daaka, Y. (2004). G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci STKE*, **2004**, re2.
- de la Rosa, A., Williams, R.L., Steeg, P.S. (1995). Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *Bioessays*, **17**, 53-62.
- Dhanasekaran, S.M., Barrette, T.R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K.J., Rubin, M.A., Chinnaiyan, A.M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, **412**, 822-6.
- Djakiew, D. (2000). Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *Prostate*, **42**, 150-60.
- du Manoir, S., Speicher, M.R., Joos, S., Schröck, E., Popp, S., Döhner, H., Kovacs, G., Robert-Nicoud, M., Lichter, P., Cremer, T. (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet*, **90**, 590-610.
- Edwards, J., Bartlett, J.M. (2005). The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor. *BJU Int*, **95**, 1320-6.
- Edwards, S.M., Kote-Jarai, Z., Meitz, J., Hamoudi, R., Hope, Q., Osin, P., Jackson, R., Southgate, C., Singh, R., Falconer, A., Dearnaley, D.P., Ardern-Jones, A., Murkin, A., Dowe, A., Kelly, J., Williams, S., Oram, R., Stevens, M., Teare, D.M., Ponder, B.A., Gayther, S.A., Easton, D.F., Eeles, R.A. (2003). Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *Am J Hum Genet*, **72**, 1-12.
- Fang, J., Metter, E.J., Landis, P., Carter, H.B. (2002). PSA velocity for assessing prostate cancer risk in men with PSA levels between 2.0 and 4.0 ng/ml. *Urology*, **59**, 889-93; discussion 893-4.

- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*.
- Forus, A., D'Angelo, A., Henriksen, J., Merla, G., Maelandsmo, G.M., Florenes, V.A., Olivieri, S., Bjerkehagen, B., Meza-Zepeda, L.A., del Vecchio Blanco, F., Muller, C., Sanvito, F., Kononen, J., Nesland, J.M., Fodstad, O., Reymond, A., Kallioniemi, O.P., Arrigoni, G., Ballabio, A., Myklebost, O., Zollo, M. (2001). Amplification and overexpression of PRUNE in human sarcomas and breast carcinomas-a possible mechanism for altering the nm23-H1 activity. *Oncogene*, **20**, 6881-90.
- Garcia, A., Cayla, X., Guernon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M.P., Fleischer, A., Rebollo, A. (2003). Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie*, **85**, 721-6.
- Gleason, D.F., Mellinger, G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological Grading and clinical staging. *J Urol*, **111**, 58-64.
- Göttel, D. (2007). Entwicklung und Anwendung automatisierter Analyseverfahren von GewebeMicroArrays zur Identifikation und quantitativen Bestimmung tumor-biologisch relevanter Proteine. Dissertation. Ruprecht-Karls Universität Heidelberg.
- Gregory, C.W., Fei, X., Ponguta, L.A., He, B., Bill, H.M., French, F.S., Wilson, E.M. (2004). Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *J Biol Chem*, **279**, 7119-30.
- Harden, S.V., Guo, Z., Epstein, J.I., Sidransky, D. (2003). Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol*, **169**, 1138-42.
- Harris, L.N., You, F., Schnitt, S.J., Witkiewicz, A., Lu, X., Sgroi, D., Ryan, P.D., Come, S.E., Burstein, H.J., Lesnikoski, B.A., Kamma, M., Friedman, P.N., Gelman, R., Iglehart, J.D., Winer, E.P. (2007). Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res*, **13**, 1198-207.
- Henrique, R., Jeronimo, C., Teixeira, M.R., Hoque, M.O., Carvalho, A.L., Pais, I., Ribeiro, F.R., Oliveira, J., Lopes, C., Sidransky, D. (2006). Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis. *Mol Cancer Res*, **4**, 1-8.
- Horwich, A. (2004). Prostate cancer management. *Ann Oncol*, **15 Suppl 4**, iv307-12.
- Horwich, A., Parker, C.C., Huddart, R.A., Dearnaley, D.P. (2002). Management of early prostate cancer. *Ann Oncol*, **13 Suppl 4**, 83-7.
- Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., O'Leary, J. (2005). Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol*, **58**, 673-84.
- Igawa, M., Rukstalis, D.B., Tanabe, T., Chodak, G.W. (1994). High levels of nm23 expression are related to cell proliferation in human prostate cancer. *Cancer Res*, **54**, 1313-8.

- Janssens, V., Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, **353**, 417-39.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M.J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, **56**, 106-30.
- Jenkins, R.B., Qian, J., Lieber, M.M., Bostwick, D.G. (1997). Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*, **57**, 524-31.
- Jenster, G. (1999). The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. *Semin Oncol*, **26**, 407-21.
- Joos, S., Bergerheim, U.S., Pan, Y., Matsuyama, H., Bentz, M., du Manoir, S., Lichter, P. (1995). Mapping of chromosomal gains and losses in prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, **14**, 267-76.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, **258**, 818-21.
- Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F.M., Gray, J.W., Pinkel, D. (1994). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, **10**, 231-43.
- Kasbohm, E.A., Guo, R., Yowell, C.W., Bagchi, G., Kelly, P., Arora, P., Casey, P.J., Daaka, Y. (2005). Androgen receptor activation by G(s) signaling in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, **280**, 11583-9.
- Konishi, N., Nakaoka, S., Tsuzuki, T., Matsumoto, K., Kitahori, Y., Hiasa, Y., Urano, T., Shiku, H. (1993). Expression of nm23-H1 and nm23-H2 proteins in prostate carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, **84**, 1050-4.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Bärklund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallioniemi, O.P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, **4**, 1998.
- Lang, K., Drell, T.L.t., Lindecke, A., Niggemann, B., Kaltschmidt, C., Zaenker, K.S., Entschladen, F. (2004). Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs. *Int J Cancer*, **112**, 231-8.
- Lei, Q., Jiao, J., Xin, L., Chang, C.J., Wang, S., Gao, J., Gleave, M.E., Witte, O.N., Liu, X., Wu, H. (2006). NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer Cell*, **9**, 367-78.
- Lichter, P., Joos, S., Bentz, M., Lampel, S. (2000). Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol*, **37**, 348-57.
- Lu-Yao, G.L., Yao, S.L. (1997). Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised prostate cancer. *Lancet*, **349**, 906-10.

- Luboldt, H.J., Bex, A., Swoboda, A., Husing, J., Rubben, H. (2001). Early detection of prostate cancer in Germany: a study using digital rectal examination and 4.0 ng/ml prostate-specific antigen as cutoff. *Eur Urol*, **39**, 131-7.
- Luo, J., Zha, S., Gage, W.R., Dunn, T.A., Hicks, J.L., Bennett, C.J., Ewing, C.M., Platz, E.A., Ferdinandusse, S., Wanders, R.J., Trent, J.M., Isaacs, W.B., De Marzo, A.M. (2002). Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res*, **62**, 2220-6.
- McCluskey, A., Sim, A.T., Sakoff, J.A. (2002). Serine-threonine protein phosphatase inhibitors: development of potential therapeutic strategies. *J Med Chem*, **45**, 1151-75.
- McMenamin, M.E., Soung, P., Perera, S., Kaplan, I., Loda, M., Sellers, W.R. (1999). Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res*, **59**, 4291-6.
- Moro, L., Arbini, A.A., Marra, E., Greco, M. (2007). Constitutive activation of MAPK/ERK inhibits prostate cancer cell proliferation through upregulation of BRCA2. *Int J Oncol*, **30**, 217-24.
- Nagmani, R., Pasco, D.S., Salas, R.D., Feller, D.R. (2003). Evaluation of beta-adrenergic receptor subtypes in the human prostate cancer cell line-LNCaP. *Biochem Pharmacol*, **65**, 1489-94.
- Nakamura, N., Ramaswamy, S., Vazquez, F., Signoretti, S., Loda, M., Sellers, W.R. (2000). Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol*, **20**, 8969-82.
- Navone, N.M., Troncoso, P., Pisters, L.L., Goodrow, T.L., Palmer, J.L., Nichols, W.W., von Eschenbach, A.C., Conti, C.J. (1993). p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 1657-69.
- Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B., Nisen, P. (2003). The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 110-6.
- Nowell, P.C., Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*, **25**, 85-109.
- Ohl, F., Jung, M., Xu, C., Stephan, C., Rabien, A., Burkhardt, M., Nitsche, A., Kristiansen, G., Loening, S.A., Radonic, A., Jung, K. (2005). Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J Mol Med*, **83**, 1014-24.
- Ohuri, M., Goad, J.R., Wheeler, T.M., Eastham, J.A., Thompson, T.C., Scardino, P.T. (1994). Can radical prostatectomy alter the progression of poorly differentiated prostate cancer? *J Urol*, **152**, 1843-9.
- Palm, D., Lang, K., Niggemann, B., Drell, T.L.t., Masur, K., Zaenker, K.S., Entschladen, F. (2006). The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer*, **118**, 2744-9.
- Paris, P.L., Albertson, D.G., Alers, J.C., Andaya, A., Carroll, P., Fridlyand, J., Jain, A.N., Kamkar, S., Kowbel, D., Krijtenburg, P.J., Pinkel, D., Schroder, F.H., Vissers, K.J., Watson, V.J.,

- Wildhagen, M.F., Collins, C., Van Dekken, H. (2003). High-resolution analysis of paraffin-embedded and formalin-fixed prostate tumors using comparative genomic hybridization to genomic microarrays. *Am J Pathol*, **162**, 763-70.
- Partin, A.W., Mangold, L.A., Lamm, D.M., Walsh, P.C., Epstein, J.I., Pearson, J.D. (2001). Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology*, **58**, 843-8.
- Perron L., Bairati I., Harel F., Meyer F. (2004). Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada). *Cancer Causes Control*, **15**, 535-41.
- Perron, L., Moore, L., Bairati, I., Bernard, P.M., Meyer, F. (2002). PSA screening and prostate cancer mortality. *Cmaj*, **166**, 586-91.
- Phillips, S.M., Barton, C.M., Lee, S.J., Morton, D.G., Wallace, D.M., Lemoine, N.R., Neoptolemos, J.P. (1994). Loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB1) is a frequent and early event in prostatic tumorigenesis. *Br J Cancer*, **70**, 1252-7.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 639-50.
- Porkka, K.P., Tammela, T.L., Vessella, R.L., Visakorpi, T. (2004). RAD21 and KIAA0196 at 8q24 are amplified and overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, **39**, 1-10.
- Porkka, K.P., Visakorpi, T. (2004). Molecular mechanisms of prostate cancer. *Eur Urol*, **45**, 683-91.
- Porter, A., Ben-Josef, E., Crawford, E.D., Garde, S., Huhtaniemi, I., Pontes, J.E. (2001). Advancing perspectives on prostate cancer: multihormonal influences in pathogenesis. *Mol Urol*, **5**, 181-8.
- Prowatke, I., Devens, F., Benner, A., Grone, E.F., Mertens, D., Grone, H.J., Lichter, P., Joos, S. (2007). Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *Br J Cancer*, **96**, 82-8.
- Qian, J., Hirasawa, K., Bostwick, D.G., Bergstralh, E.J., Slezak, J.M., Anderl, K.L., Borell, T.J., Lieber, M.M., Jenkins, R.B. (2002). Loss of p53 and c-myc overrepresentation in stage T(2-3)N(1-3)M(0) prostate cancer are potential markers for cancer progression. *Mod Pathol*, **15**, 35-44.
- Ramos-Jimenez, J., Soria-Jasso, L.E., Lopez-Colombo, A., Reyes-Esparza, J.A., Camacho, J., Arias-Montano, J.A. (2007). Histamine augments beta2-adrenoceptor-induced cyclic AMP accumulation in human prostate cancer cells DU-145 independently of known histamine receptors. *Biochem Pharmacol*, **73**, 814-23.
- Rhodes, D.R., Barrette, T.R., Rubin, M.A., Ghosh, D., Chinnaiyan, A.M. (2002). Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res*, **62**, 4427-33.

- Ribeiro, F.R., Diep, C.B., Jeronimo, C., Henrique, R., Lopes, C., Eknaes, M., Lingjaerde, O.C., Lothe, R.A., Teixeira, M.R. (2006a). Statistical dissection of genetic pathways involved in prostate carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 154-63.
- Ribeiro, F.R., Henrique, R., Hektoen, M., Berg, M., Jeronimo, C., Teixeira, M.R., Lothe, R.A. (2006b). Comparison of chromosomal and array-based comparative genomic hybridization for the detection of genomic imbalances in primary prostate carcinomas. *Mol Cancer*, **5**, 33.
- Roehl, K.A., Han, M., Ramos, C.G., Antenor, J.A., Catalona, W.J. (2004). Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. *J Urol*, **172**, 910-4.
- Rossi, S., Graner, E., Febbo, P., Weinstein, L., Bhattacharya, N., Onody, T., Bubley, G., Balk, S., Loda, M. (2003). Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res*, **1**, 707-15.
- Royuela, M., de Miguel, M.P., Ruiz, A., Fraile, B., Arenas, M.I., Romo, E., Paniagua, R. (2000). Interferon-gamma and its functional receptors overexpression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: parallelism with c-myc and p53 expression. *Eur Cytokine Netw*, **11**, 119-27.
- Sakr, W.A., Partin, A.W. (2001). Histological markers of risk and the role of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*, **57**, 115-20.
- Sato, K., Qian, J., Slezak, J.M., Lieber, M.M., Bostwick, D.G., Bergstralh, E.J., Jenkins, R.B. (1999). Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1574-80.
- Sattler, H.P., Rohde, V., Bonkhoff, H., Zwergel, T., Wullich, B. (1999). Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *Prostate*, **39**, 79-86.
- Savinainen, K.J., Linja, M.J., Saramaki, O.R., Tammela, T.L., Chang, G.T., Brinkmann, A.O., Visakorpi, T. (2004). Expression and copy number analysis of TRPS1, EIF3S3 and MYC genes in breast and prostate cancer. *Br J Cancer*, **90**, 1041-6.
- Schulz, W.A., Burchardt, M., Cronauer, M.V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod*, **9**, 437-48.
- Schwaenen, C., Nessling, M., Wessendorf, S., Salvi, T., Wrobel, G., Radlwimmer, B., Kestler, H.A., Haslinger, C., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Bentz, M., Lichter, P. (2004). Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1039-44.
- Shurbaji, M.S., Kalbfleisch, J.H., Thurmond, T.S. (1996). Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum Pathol*, **27**, 917-21.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T., Lichter, P. (1997). Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, **20**, 399-407.

- Steeg, P.S. (2003). Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer*, **3**, 55-63.
- Steineck, G., Helgesen, F., Adolfsson, J., Dickman, P.W., Johansson, J.E., Norlen, B.J., Holmberg, L. (2002). Quality of life after radical prostatectomy or watchful waiting. *N Engl J Med*, **347**, 790-6.
- Steiner, T., Junker, K., Burkhardt, F., Braunsdorf, A., Janitzky, V., Schubert, J. (2002). Gain in chromosome 8q correlates with early progression in hormonal treated prostate cancer. *Eur Urol*, **41**, 167-71.
- Sun, M., Srikantan, V., Ma, L., Li, J., Zhang, W., Petrovics, G., Makarem, M., Strovel, J.W., Horrigan, S.G., Augustus, M., Sesterhenn, I.A., Moul, J.W., Chandrasekharappa, S., Zou, Z., Srivastava, S. (2006). Characterization of frequently deleted 6q locus in prostate cancer. *DNA Cell Biol*, **25**, 597-607.
- Swinnen, J.V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W., Verhoeven, G. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer*, **98**, 19-22.
- Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Kochli, O.R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M., Kallioniemi, O.P., Sauter, G. (2001). Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, **159**, 2249-56.
- Tsuchiya, N., Slezak, J.M., Lieber, M.M., Bergstralh, E.J., Jenkins, R.B. (2002). Clinical significance of alterations of chromosome 8 detected by fluorescence in situ hybridization analysis in pathologic organ-confined prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 363-71.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Rubin, M.A., Chinnaiyan, A.M. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, **419**, 624-9.
- Verdorfer, I., Hobisch, A., Culig, Z., Hittmair, A., Bartsch, G., Erdel, M., Duba, H.C., Utermann, G. (2001). Combined study of prostatic carcinoma by classical cytogenetic analysis and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol*, **19**, 1263-70.
- Volp, K., Brezniceanu, M.L., Bosser, S., Brabletz, T., Kirchner, T., Gittel, D., Joos, S., Zornig, M. (2006). Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut*, **55**, 234-42.
- Wolter, H., Trijic, D., Gottfried, H.W., Mattfeldt, T. (2002). Chromosomal changes in incidental prostatic carcinomas detected by comparative genomic hybridization. *Eur Urol*, **41**, 328-34.
- Zhang, D., Salto-Tellez, M., Putti, T.C., Do, E., Koay, E.S. (2003). Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol*, **16**, 79-84.

6 Anhang

6.1 Tabellen im Anhang

Tabelle 26 Anhang: In Prostatakarzinomen hoch-regulierte Gene auf Chromosomenbanden mit häufigen (>5%) Zugewinnen

Gen ^a	Gen Name; Alias ^a	Chromosomale Lokalisation	CGH ^b	Array CGH ^c	Expressions Mikroarray ^d
			(n=145)	(n=16)	(n=61)
			Zugewinne		Rang Nr. ^e
ARMET	arginine-rich, mutated in early stage tumours; ARP	3q21.1	7.6%	2/16	2
PDIA5	protein disulfide isomerase-associated 5; PDIR	3q21.1	7.6%	2/16	7
ATP2C1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, type 2C, member 1	3q21.3	7.6%	2/16	245
MRPL3	mitochondrial ribosomal protein L3; RPML3	3q21-q23	8.3%	2/16	123
EIF3S9	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa	7p22.3	8.9%	1/16	242
ABHD11	abhydrolase domain containing 11	7q11.23	11.7%	1/16	197
TBL2	transducin (beta)-like 2, WBSCR13; WS-betaTRP	7q11.23	11.7%	1/16	233
STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	7q21	13.8%	1/16	150
GUSB	glucuronidase beta	7q21.11	13.8%	1/16	116
SND1	staphylococcal nuclease domain containing 1; p100	7q31.3	12.4%	2/16	69
IMPDH1	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1	7q31.3-q32	13.1%	2/16	144
RAB2	member RAS oncogene family	8q12.1	10.3%	0/16	106
TPD52	tumour protein D52, N8L; hD52	8q21	19.9%	0/16	20
PVT1	Pvt-1 oncogene homolog, MYC activator (mouse)	8q24	15.2%	0/16	250
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	8q24.12-q24.13	15.2%	0/16	44
TOR1B	torsin family 1, member B (torsin B)	9q34	6.2%	1/16	241
KIAA0310	KIAA0310	9q34.3	6.2%	1/16	199
ADRBK1	adrenergic, beta, receptor kinase 1; GRK2; BARK1	11q13	6.9%	3/16	131
PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	11q13	6.9%	3/16	236
LIG3	ligase III, DNA, ATP-dependent	17q11.2-q12	15.9%	3/16	17
MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3; MEK3; MKK3	17q11.2	15.9%	3/16	212
ACACA	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	17q21	15.2%	2/16	196
JUP	junction plakoglobin	17q21	15.2%	2/16	204

Anhang

<i>NME1</i>	<i>non-metastatic cells 1, protein (NM23a) expressed in; NM23-H1</i>	17q21.3	15.2%	2/16	4
<i>SLC35B1</i>	<i>solute carrier family 35, member B1; UGTREL1</i>	17q21-q32	19.3%	2/16	54
<i>FASN</i>	<i>fatty acid synthase; FAS, OA-519</i>	17q25	18.6%	18.6%	6
<i>STRA13</i>	<i>stimulated by retinoic acid 13</i>	17q25.3	18.6%	18.6%	30
<i>ARHGDI</i>	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha; RHOGDI</i>	17q25.3	18.6%	18.6%	113
<i>AHCY</i>	<i>S-adenosylhomocysteine hydrolase</i>	20cen-q13.1	9,0%	9,0%	21
<i>TOP1</i>	<i>topoisomerase (DNA) I</i>	20q12-q13	9,0%	9,0%	194
<i>MYBL2</i>	<i>v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2; BMYB</i>	20q13.1	6.2%	6.2%	91
<i>UBE2C</i>	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2C</i>	20q13.11	6.2%	6.2%	129

IHC = Immunhistochemie; CGH = Vergleichende genomische Hybridisierung.

^a offizielle Genbezeichnungen der Humanen Genom Organisation (HUGO).

^b (Alers et al., 2001; Sattler et al., 1999; Steiner et al., 2002; Verdorfer et al., 2001; Wolter et al., 2002; Zitzelsberger et al., 2001).

^c (Paris et al., 2003).

^d Expressions Mikroarray Meta-Analyse (Rhodes et al., 2002).

^e Rang in der Liste der 250 am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Gene in Prostatakarzinomen gegenüber gutartigem Prostatagewebe.

Tabelle 27 Anhang: In Prostatakarzinomen herunter-regulierte Gene auf Chromosomenbanden mit häufigen (>5%) Verlusten

Gen^a	Gen Name; Alias^a	Chromosomale Lokalisation	CGH^b (n=145) Verluste	Array CGH^c (n=16)	Expressions Mikroarray^d (n=61) Rang Nr.^e
<i>PAM</i>	<i>peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase</i>	5q14-q21	9.0%	1/16	87
<i>PJA2</i>	<i>praja 2, RING-H2 motif containing; KIAA0438</i>	5q21.3	9.0%	2/16	199
<i>ITGA2</i>	<i>integrin alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)</i>	5q23-q31	5.5%	2/16	152
<i>FAM46A</i>	<i>family with sequence similarity 46, member A; FLJ20037</i>	6q14	13.1%	2/16	119
<i>NT5E</i>	<i>5' nucleotidase, ecto (CD73)</i>	6q14-q21	17.2%	6/16	244
<i>LAMA4</i>	<i>laminin, alpha 4</i>	6q21	15.2%	2/16	3
<i>FYN</i>	<i>FYN oncogene related to SRC, FGR, YES</i>	6q21	15.2%	2/16	88
<i>GJA1</i>	<i>gap junction protein alpha 1, 43kDa (connexin 43)</i>	6q21-q23.2	15.9%	4/16	9
<i>PLN</i>	<i>phospholamban</i>	6q22.1	12.4%	4/16	223
<i>AKAP12</i>	<i>A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12</i>	6q24-q25	9.0%	0/16	39
<i>PLAGL1</i>	<i>pleiomorphic adenoma gene-like 1</i>	6q24-q25	9.0%	0/16	53
<i>TACC1</i>	<i>transforming acidic coiled-coil containing protein 1</i>	8p11	17.2%	2/16	13
<i>RBPM5</i>	<i>RNA binding protein with multiple</i>	8p12-p11	20.0%	5/16	86

Anhang

	<i>splicing</i>				
PPP2CB	<i>protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform</i>	8p12-p11.2	20.0%	5/16	67
CLU	<i>clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)</i>	8p21-p12	22.8%	6/16	200
DPYSL2	<i>dihydropyrimidase-like 2</i>	8p22-p21	22.1%	6/16	98
GTF3A	<i>general transcription factor IIIA</i>	13q12.3-q13.1	7.6%	0/16	162
SPG20	<i>spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome); KIAA0610</i>	13q13.1	7.6%	0/16	205
AKAP11	<i>A kinase (PRKA) anchor protein 11</i>	13q13.3	7.6%	0/16	239
FOXO1A	<i>forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)</i>	13q14.1	12.4%	3/16	69
ESD	<i>esterase D/formylglutathione hydrolase</i>	13q14.1-q14.2	12.4%	3/16	92
CYLD	<i>cylindromatosis (turban tumour syndrome)</i>	16q12.1	9.7%	0/16	158
ARL2BP	<i>ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein; BART1</i>	16q12.2	9.7%	0/16	248
ALDOA	<i>aldolase A fructose-bisphosphate</i>	16q22-q24	14.5%	4/16	222
FOXF1	<i>forkhead box F1</i>	16q24	9.0%	4/16	157
SLC14A1	<i>solute carrier family 14 (urea transporter) member 1 (Kidd blood group)</i>	18q11-q12	8.3%	1/16	124
MAPRE2	<i>microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2</i>	18q12.1	8.3%	1/16	212
ZNF516	<i>zink finger protein 516; KIAA0222</i>	18q23	9.7%	0/16	207

IHC = Immunhistochemie; CGH = Vergleichende genomische Hybridisierung; Gains = Zugewinne.

^a offizielle Genbezeichnungen der Humanen Genom Organisation (HUGO).

^b (Alers et al., 2001; Sattler et al., 1999; Steiner et al., 2002; Verdorfer et al., 2001; Wolter et al., 2002; Zitzelsberger et al., 2001).

^c (Paris et al., 2003).

^d Expressions Mikroarray Meta-Analyse (Rhodes et al., 2002).

^e Rang in der Liste der 250 am stärksten hoch- bzw. herunterregulierten Gene in Prostatakarzinomen gegenüber gutartigem Prostatagewebe.

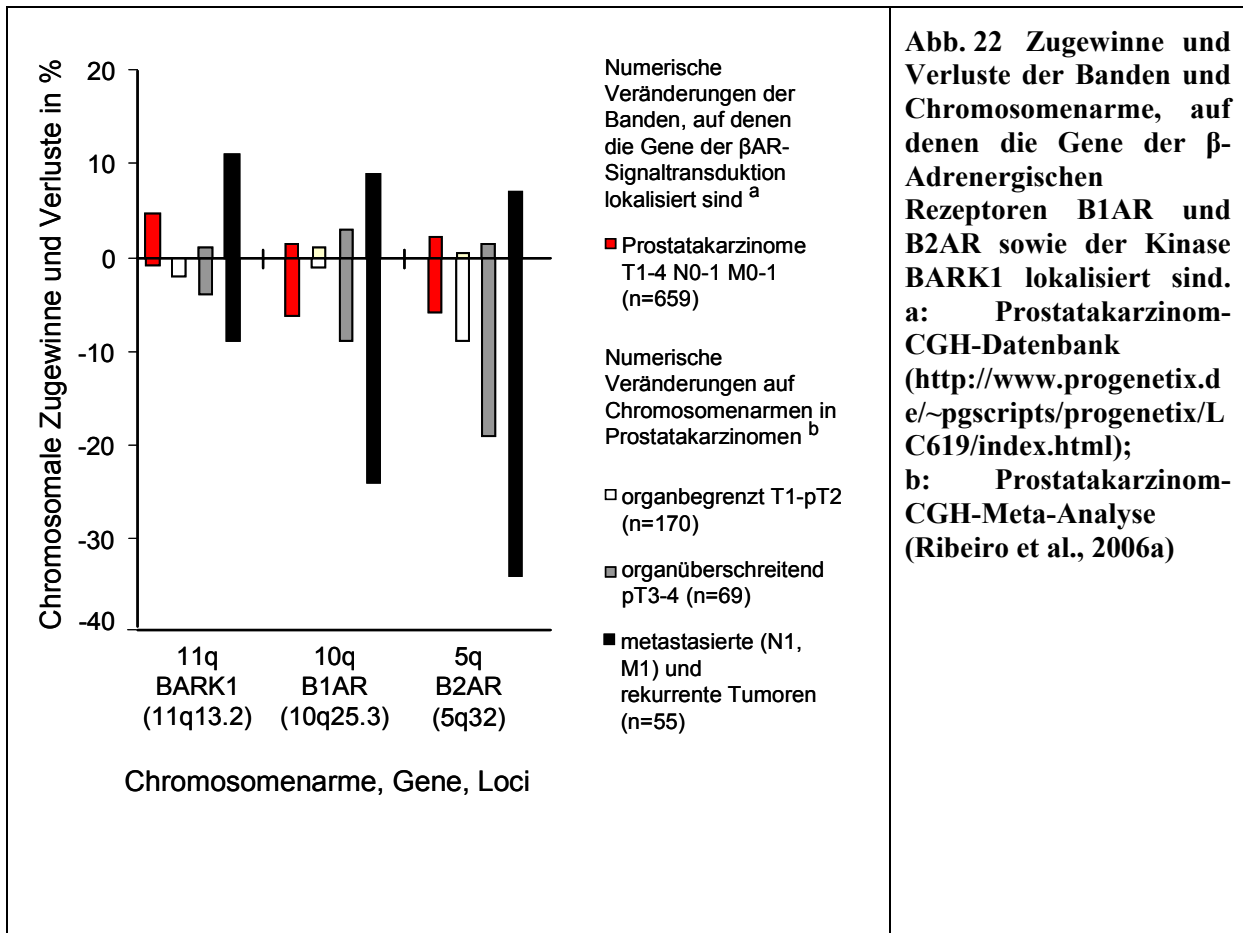


Tabelle 28 Aneuploidie der Chromosomen 11, 10 und 5 in Prostatezelllinien ^c

Zelllinie	Ploidiestatus	Chromosomen		
		11	10	5
BPH-1	hypertriploid	+11	-10	+5
22RV1	hyperdiploid			
LNCaP	hypotatraploid		-10-10	
PC-3	hypotatraploid		-10-10-10-10	
DU145	hypotriploid		-10	+5

Genloci: BARK1 (11q13.2) B1AR (10q25.3) B2AR (5q32)

Zugewinne: +; Verluste: -

c: <http://www.dsmz.de/>

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aCGH	array CGH (Matrix-CGH)
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
BPH	benigne Prostata-Hyperplasie
BSA	bovine serum albumin (Rinderserum Albumin)
cCGH	chromosomale CGH
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CGH	comparative genomic hybridization (Vergleichende Genomische Hybridisierung)
Cy	Cyanin
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calw serum (Fötales Kälberserum)
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung (9,81m/s ²)
GS	Gleason Score
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
M	Molar
min	Minute (n)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
OD	Optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pT-Stadium	pathologisches Tumor-Stadium im TNM-Klassifikationssystem
rpm	rotations per minute (Umdrehungen /min)
RQ-PCR	Real-time (Echtzeit) quantitative PCR
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SSC	Sodiumchlorid Sodiumcitrat Lösung
STS	sequence tagged sites
TAE	Tris Acetat EDTA (Tris: Tris-Hydroxymethylaminomethan)
TMA	Tissue Microarray (Gewebe-Mikroarray)
ü.N.	über Nacht
vs.	versus (im Vergleich zu)

SI-Einheitenzeichen wurden für alle Einheiten verwendet, die nicht aufgelistet sind.

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel

Prowatke, I., Devens, F., Benner, A., Grone, E.F., Mertens, D., Grone, H.J., Lichter, P., Joos, S. (2007). Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *Br J Cancer*, **96**, 82-8.

Vorträge

Prowatke, I., Gröne, H.J., Benner, A., Lichter, P., Joos, S., BARK1 and MYC, novel markers for prostate cancer progression as revealed by tissue microarrays. 10th DKFZ graduate seminar, Weil-der-Stadt, Mai 2005.

Poster

Prowatke, I., Sticht, C., Gröne, H.J., Lichter, P., Joos, S., Protein expression in prostate cancer analyzed on tissue microarrays. 9th DKFZ graduate seminar, Weil-der-Stadt, Mai 2004.

Prowatke, I., Gröne, H.J., Benner, A., Lichter, P., Joos, S., Novel markers of potential diagnostic/ prognostic relevance in prostate cancer, revealed by tissue microarrays. DKFZ graduate forum, Heidelberg, November 2004.

Göttel D., **Prowatke I.**, Devens F., Neben K., Lichter P. Freier K., Joos, S., High throughput analyses of large tumor collections and protocoll development towards automated image aquisition and evaluation. NGFN Meeting, Heidelberg, Juni 2006.

6.3 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Buselmaier für die Bereitschaft, das Erstgutachten anzufertigen und den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Ich bedanke mich bei den Herren Professoren Dr. Peter Lichter und Dr. Stefan Joos für die Überlassung des Themas, für die Möglichkeit, meine Dissertation in einem konstruktiven Umfeld durchführen zu dürfen, sowie für die Freiheit, die mir bei der Organisation, Durchführung und Auswertung der Experimente zugestanden wurde. Herrn Prof. Dr. Peter Lichter danke ich besonders für wegweisende Entscheidungen und konstruktive Tipps zur bildlichen Darstellung von Ergebnissen („Der Mensch ist ein Augentier.“). Herrn Prof. Dr. Stefan Joos danke ich für das fachliche Korrekturlesen des Manuskriptes und der Dissertation.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Hans-Josef Gröne, der die Tumorproben zur Verfügung stellte und eine reibungslose Kooperation ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Axel Benner, Felix Engel und Dr. Carsten Sticht für die engagierte Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. So macht interdisziplinäre Kooperation Spass!

Bei Daniel „Junior“ Göttel bedanke ich mich für die Computer-Schnellhilfe und die Zusammenarbeit bei der automatisierten digitalen IF-Analyse.

Frauke Devens danke ich für die Einführung in die Immunhistochemie sowie die doppelblinde Auswertung („Ich will nach Hause!“).

Frau Dr. „Berg-und-weg“ Cordula Tschuch, Dr. Karl Knöpfle und Dr. Martina Seifert danke ich für die Einführung in die Taqman-Analyse.

Dr. Snjezana Janjetovic danke ich für die Einführung in die Zellkultur und die Bestellung von Reagenzien, wenn ich aus 500 km Entfernung Versuche vorbereitete.

Sibylle Ohl danke ich für die Lokalisation von FISH-Sonden auf Metaphasen.

Dr. Christof Schläger danke ich für die gemeinsame RNA-Aufreinigung mittels CsCl. („Alles andere ist primär!“)

Bei Dr. Corinna Weidt aus Witten bedanke ich mich für das ausführliche Korrekturlesen des englischsprachigen Manuskripts („for the sake of clarity“), während sich unsere Kinder im Garten eine Schlacht mit den Wasserpistolen lieferten oder im Freibad tobten.

Dr. Daniel Mertens und Dr. Irina Idler danke ich für die Unterstützung in scheinbar eingefahrenen Situationen und für die Gespräche rund um das Thema „Frau, Familie, Promotion“.

Felix Engel danke ich für Diskussionen quer Beet durch die Naturwissenschaften und das Geheimrezept, wie man während des Labor-Endspurts ununterbrochen arbeiten kann (eeffak nud edalokohcs).

Für methodische Tipps und die gute Arbeitsatmosphäre im Labor, im Büro, in der Mensa, im Elsaß sowie bei Tanz-, Kletter- und Rutschpartien danke ich des Weiteren PD Dr. Karsten Rippe, Dr. Sabine Görisch, Dr. Snjezana Janjetovic, Dr. Otto Mannherz, Dr. Markus Scheuermann, Dr. Ute Schmidt, Natalia Becker, Frederic Blond, Nicolas Delhomme, Verena Fleig, Daniel Göttel, Felix Engel und Grischa Tödt.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Schwiegereltern aus Rostock, Dres. habil. Gerd und Christa Prowatke für das Korrekturlesen der Dissertation, die „Care-Pakete“ und vor allem für die moralische Unterstützung und das Verständnis für alles rund um Familie und Promotion.

Bei meinen Eltern, Dipl. Ing (FH) Peter Bruch und Sigrid Bruch bedanke ich mich für alles, was sie für mich getan haben. Mit dem „Welt der Tiere“- Bildband, ein Geschenk im Alter von 4 Jahren, dem Beobachten des Vogelhäuschens mit dem „Pareys Vogelbuch“ in der Hand, der Suche nach Tierfährten im Wald, Reisen in viele Länder Europas, bei denen auf Alpenhängen, in Sumpfgeländen oder in Vulkankratern Pflanzen bestimmt wurden, haben sie mein Interesse an der Biologie geweckt und aufrechterhalten (auch heute noch folgt nach der Begrüßung als erstes ein Gang durch den Garten). Insbesondere bedanke ich mich zudem für die liebevolle Betreuung meiner Söhne während der Schulferien, die mir arbeitsintensive Wochen mit entsprechenden Fortschritten in meiner Doktorarbeit ermöglichten.

„Last but not least“ bedanke ich mich ganz besonders bei meinem Mann, Dr. Stefan Prowatke, Mitglied der „Erfolgsgruppe 2000“, und unseren beiden Rackern, den Judovereinsmeistern Björn und Aaron. Vor 2 Jahren schallte ein „HoldudieHeidelberger-diö“ über die Nordkette und rief zur „Entwicklung bunter Kristalle“ in Wattens, Tirol. Meinem Mann danke ich, dass er in diesen beiden Jahren neben seiner Arbeit 1-2 Wochen pro Monat alleine für unsere Kinder gesorgt hat, damit ich am DKFZ meine Promotion beenden konnte. Trotz dieser anstrengenden „Doppelbelastung“ hat er mich immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt. Vielen, vielen Dank! Was wäre mein Leben ohne ihn und unsere beiden Kinder, die mit ihrer ungezwungenen Art für Spaß und gute Laune sorgen, auch dafür herzlichen Dank.

Bei Euch allen möchte ich mich herzlich bedanken. Die „zwei Jobs“ Familie und Doktorarbeit waren zwar oft sehr anstrengend, aber dafür interessant und abwechslungsreich. Eine Herausforderung, die anzunehmen ich niemals bereut habe, eine Zeit, die ich nicht missen möchte.

6.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ilka Prowatke (geb. Bruch), geboren am 13.12.1972 in Unna, NRW, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt habe, dass ich diese Dissertation weder in dieser noch in einer anderen Form anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet und sie an keiner anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 7.1.2008

Ilka Prowatke