

Aus der Urologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kommissarischer Direktor: Dr. med. Volker Müller-Mattheis

Aberrationen von Chromosom 8p im Prostatakarzinom:
Von Gendosis- über Expressionsveränderungen
zu neuen Kandidatengenen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Max Ernst Hornstein

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. A. Schulz

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Rieder

*„Keine größere Chance, Verantwortung oder Verpflichtung
kann einem Menschen auferlegt sein als jene, Arzt zu werden.
In der Fürsorge für die Leidenden bedarf es technischer Fertigkeiten,
wissenschaftlichen Denkens und menschlichen Verständnisses.
Von einem Arzt werden Feingefühl, Empathie und Verständnis erwartet,
denn der Patient ist keine bloße Ansammlung von Symptomen und Zeichen,
abweichenden Funktionen, geschädigten Organen und gestörten Emotionen.
Er ist ein Mensch, voller Furcht und voller Hoffnung,
auf der Suche nach Trost, Hilfe und Gewissheit.“*

- Harrison`s Principles of Internal Medicine, 1950

meinen Eltern

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Aufbau der Prostata und Klassifikation des Prostatakarzinoms	- 1 -
1.2	Epidemiologie	- 3 -
1.3	Diagnose, Staging und Therapie des Prostatakarzinoms	- 4 -
1.3.1	Prognostische und diagnostische Faktoren beziehungsweise Marker	- 6 -
1.3.2	Kombination prognostischer Faktoren (Indizes)	- 7 -
1.4	Ätiologie des Prostatakarzinoms	- 9 -
1.5.1	Chromosomale Veränderungen im Prostatakarzinom	- 14 -
1.5.1.1	Chromosom 8p	- 14 -
1.5.1.2	Chromosom 8q	- 17 -
1.5.2	NKX3.1: Die Geschichte eines potentiellen Tumorsuppressors	- 18 -
1.6	Weitere Kandidatengene auf Chromosom 8p	- 19 -
1.6.1	CSMD1 (CUB and Sushi Multiple Domains 1 Gene)	- 20 -
1.6.2	DLC1 (Deleted in Liver Cancer Gene 1)	- 20 -
1.6.3	FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene)	- 21 -
1.6.4	MSR1 (Macrophage Scavenger Receptor 1 Gene)	- 22 -
1.6.5	ANGPT2 (Angiopoetin 2 Gene)	- 22 -
1.6.6	PPP2CB (Protein Phosphatase 2, Catalytic Subunit, Beta Isoform)	- 23 -
1.6.7	PPP3CC (Protein Phosphatase 3, Catalytic Subunit, Gamma isoform)	- 25 -
1.6.8	TRAIL-Rezeptoren (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptors)	- 26 -
1.7	Zielsetzung der Arbeit	- 27 -
2	MATERIAL UND METHODEN	- 29 -
2.1	Gewebeproben	- 29 -
2.2	Chemikalien	- 32 -
2.3	Enzyme	- 33 -
2.4	Medien, Puffer und Lösungen	- 33 -
2.4.1	Standardlösungen	- 33 -
2.4.2	Lösungen für Polyacrylamidgele	- 33 -
2.5	Molekularbiologische Kits	- 34 -
2.6	Spezielle Materialien und Geräte	- 34 -
2.7	Software	- 35 -
2.8	Oligonukleotidprimer	- 35 -
2.9	Mikrosatelliten-Analyse von Chromosom 8p und 13q	- 38 -
2.9.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 38 -
2.9.2	Standardprotokoll	- 38 -
2.9.3	Mikrosatellitenanalyse	- 39 -
2.10	Reverse Transkription	- 40 -
2.11	Quantitative Real-Time-PCR (QRT-PCR) mit SYBR Green-Detektion am LightCycler	- 41 -
2.12	Quantitative Real-TimePCR (QRT-PCR) mit Taqman-Sonden	- 47 -
2.13	Clusteranalyse mit Genesis	- 51 -
2.14	Microarray Expressionsanalyse und biostatistische Auswertung	- 51 -
2.15	DNA-Methylierungs-Analyse mittels Bisulfit	- 52 -
2.15.1	Bisulfitumwandlung	- 52 -

2.15.2 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)	- 53 -
2.16 Bisulfitsequenzierung des DcR2-Promotors	- 54 -
2.17 Gelelektrophoretische Methoden	- 55 -
2.17.1 DNA-Agarosegelelektrophorese	- 55 -
2.17.2 Polyacrylamidgelelektrophorese	- 56 -
2.17.2.1 Native Polyacrylamidgele	- 56 -
2.17.2.2 Gele zur Mikrosatellitenanalyse	- 56 -
2.18 Zelllinienexperimente und Zellkultur	- 57 -
2.18.1 Anzucht von Zellen	- 57 -
2.18.2 Passagieren der Zellen	- 57 -
2.18.3 Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) und Suberoylanilid-Hydroxamic-Acid (SAHA)	- 58 -
2.18.4 CellTiter-Glo [®] Lumineszenz-Test	- 58 -
2.18.5 Caspase-Glo [®] 3/7 Test	- 59 -
3 ERGEBNISTEIL	- 61 -
3.1 LOH-Analyse von Veränderungen der Chromosomen 8p und 13q	- 61 -
3.1.1 Chromosom 8p	- 64 -
3.1.1.1 Statistische Auswertung	- 66 -
3.1.1.2 Zusammenfassung	- 68 -
3.1.2 Chromosom 13q	- 69 -
3.1.2.1 Statistische Auswertung	- 71 -
3.1.2.2 Zusammenfassung	- 72 -
3.2 CGH-Analyse von Chromosom 8-Veränderungen	- 72 -
3.3 Statistische RNA Microarray-Auswertung	- 75 -
3.4 Expressionsanalyse ausgewählter Gene	- 82 -
3.4.1 DLC1 (Deleted in Liver Cancer Gene 1)	- 85 -
3.4.2 FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene)	- 85 -
3.4.3 CSMD1 (CUB and Sushi Multiple Domains 1 Gene)	- 88 -
3.4.4 MSR1 (Macrophage Scavenger Receptor 1 Gene)	- 90 -
3.4.5 ANGPT2 (Angiopoietin 2 Gene)	- 92 -
3.4.6 PPP2CB (Protein Phosphatase 2, Catalytic Subunit, Beta Isoform)	- 94 -
3.4.7 PPP3CC (Protein Phosphatase 3, Catalytic Subunit, Gamma Isoform)	- 96 -
3.4.8 TRAIL-Rezeptoren (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptors)	- 98 -
3.4.8.1 DR4/TRAIL R1/Apo2/TNFRSF10A	- 98 -
3.4.8.2 DR5/TRAIL R2/TNFRSF10B	- 98 -
3.4.8.3 DcR1/TRAIL R3/LIT/TRID/TNFRSF10C	- 98 -
3.4.8.4 DcR2/TRAIL R4/TRUNDD/TNFRSF10D	- 99 -
3.4.8.5 OPG/TNFRSF11B	- 99 -
3.4.9 Expressionsanalyse von NKX3.1 und SPRY2	- 105 -
3.4.9.1 Statistische Auswertung	- 106 -
3.4.10 Überlebenszeit-Analyse mittels Kaplan Meier-Verfahren	- 109 -
3.4.11 Übersichtstabelle	- 112 -
3.5 Clusteranalyse der Genexpressionsveränderungen mittels Genesis	- 113 -
3.6 Spezifische Expressionsanalyse an AZA und SAHA behandelten Prostatakarzinom-Zelllinien	- 118 -

3.6.1	PPP2CB	- 119 -
3.6.2	TRAIL R1/DR4	- 120 -
3.6.3	TRAIL R2 / DR5	- 121 -
3.6.4	TRAIL R3 / DcR1	- 122 -
3.6.5	TRAIL R4 / DcR2	- 123 -
3.6.6	OPG	- 124 -
3.6.7	Übersichtstabelle	- 125 -
3.7	MS-PCR-Analyse der TRAIL-Decoyrezeptor-Gene	- 126 -
3.7.1	DcR1	- 127 -
3.7.2	DcR2	- 128 -
3.8	Bisulfitsequenzierung von DcR2	- 129 -
3.9	Funktionelle Analyse / Zellkultur	- 132 -
3.9.1	MTT-Assay	- 132 -
3.9.2	Apoptose-Assay	- 134 -
4	DISKUSSION	- 137 -
4.1	Veränderungen der Expression von Chromosom 8 Genen im Prostatakarzinom	- 138 -
4.1.1	PPP2CB	- 138 -
4.1.2	PPP3CC	- 141 -
4.1.3	TRAIL-Rezeptorfamilie	- 145 -
4.1.3.1	Expression und klinische Parameter	- 145 -
4.1.3.2	Apoptoseinduktion durch TRAIL und seine Rezeptoren	- 146 -
4.1.3.3	Apoptose-Inhibition durch TRAIL und Überlebensfaktoren	- 150 -
4.1.3.4	Genetische und Epigenetische Regulation der DcR1- und DcR2-Expression	- 152 -
4.1.3.5	In-vitro Wirkung von TRAIL	- 154 -
4.1.3.6	Resümee	- 155 -
4.1.4	NKX3.1	- 156 -
4.1.5	DLC1	- 160 -
4.1.6	CSMD1	- 162 -
4.2	Von chromosomalen Aberrationen über Gendosis- und Expressionveränderungen zur Transformation eines malignen Phänotyps: Chromosom 8p im Prostatakarzinom	- 163 -
4.2.1	Chromosomale Aberrationen im Prostatakarzinom	- 163 -
4.2.2	Gendosisveränderungen im Prostatakarzinom	- 163 -
4.2.3	Genotypveränderungen im Prostatakarzinom	- 165 -
4.2.4	Beziehung zwischen Gendosis und Genexpression	- 167 -
4.2.4.1	Dosis-Balance in der Genregulation	- 174 -
4.2.5	Methodische Limitierungen	- 175 -
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN	- 177 -
6	LITERATUR	- 178 -
7	ABKÜRZUNGEN	- 203 -
8	ERGÄNZENDE DATEN	- 204 -
8.1	CGH-Analyse	- 204 -
9	DANKSAGUNG	- 206 -

1 EINLEITUNG

Die Auswirkungen genetischer und epigenetischer Veränderungen, die während der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms auftreten, auf die Expression betroffener Gene sind zur Zeit nur unzureichend bekannt. In diesem Kapitel sollen die Folgen dieser Problematik für Diagnose und Therapie des Prostatakarzinoms erläutert, sowie, mit Fokus auf Chromosom 8p, die genetischen Grundlagen kurz zusammengefasst werden.

1.1 Aufbau der Prostata und Klassifikation des Prostatakarzinoms

Die Prostata gliedert sich in vier anatomische Zonen. Die periphere Zone ist der posterior-inferiore Anteil der Drüse und macht 70% des Prostatavolumens aus. Hier entstehen 60-70% der Prostatakarzinome. Die zentrale Zone bildet 25% des Drüsenvolumens und umschließt den Ductus ejaculatorius. In dieser Zone spielen sich bevorzugt entzündliche Prozesse, wie zum Beispiel eine Prostatitis, ab. Die Übergangszone bildet nur 5% des Prostatavolumens und besteht aus zwei lateralen Lappen und den periurethralen Drüsen. Hier entsteht typischerweise die benigne Prostatahyperplasie, aber auch 25% der Adenokarzinome gehen von diesem Bereich aus. Die vordere Kommissur besteht hauptsächlich aus fibromuskulären Anteilen und enthält keine Drüsenstrukturen.

Prostatakarzinome entstehen zu 98% aus dem Drüsenepithel der Prostata, es handelt sich also um Adenokarzinome. Selten findet man Sonderformen wie das Kleinzellige Prostatakarzinom, das Muzinöse Adenokarzinom oder das Prostataduktkarzinom. Plattenepithelkarzinome oder Übergangsepithelkarzinome, die meist von der Blasenschleimhaut ausgehen und die Prostata infiltrieren, sind ebenfalls selten [Hautmann, 2000].

Das Prostatakarzinom breitet sich durch infiltrierendes Wachstum zunächst innerhalb der Prostata aus, befällt dann periprostatitisches Weichteilgewebe und wächst in Nachbarorgane wie Samenblase und relativ selten auch Rektum, Harnblase oder Urethra ein. Die Metastasierung erfolgt lymphogen in iliakale, retroperitoneale und paraaortale Lymphknoten, hämatogen vor allem in Skelett, Leber und Lunge.

Das Tumorstadium wird mittels der TNM-Klassifikation (Staging-System) bestimmt. Es werden vier Primärtumorstadien unterschieden, die das Ausmaß der lokalen Tumorausbreitung angeben,

des Weiteren wird der Lymphknotenbefall und das Vorliegen von Metastasen, als Anhalt für die systemische Ausbreitung, beschrieben (siehe *Tabelle 1.1-1* und *Abbildung 1.1-1*)

Tabelle 1.1-1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms

Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der TNM-Klassifikation, 6.Aufl. UICC 2002	
T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist T1a Tumor zufälliger histologischer Befund (inzidenzielles Karzinom) in 5% oder weniger des resezierten Gewebes T1b Tumor zufälliger histologischer Befund (inzidenzielles Karzinom) in mehr als 5% des resezierten Gewebes T1c Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhtem PSA)
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt T2a Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappens oder weniger T2b Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappens T2c Tumor infiltriert beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel T3a Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig) T3b Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Blasenhal, Sphinkter externus, Rektum, Levator-Muskulatur, Beckenwand)
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen M1a Nicht regionärer Lymphknotenbefall M1b Knochenmetastasen M1c andere Manifestation

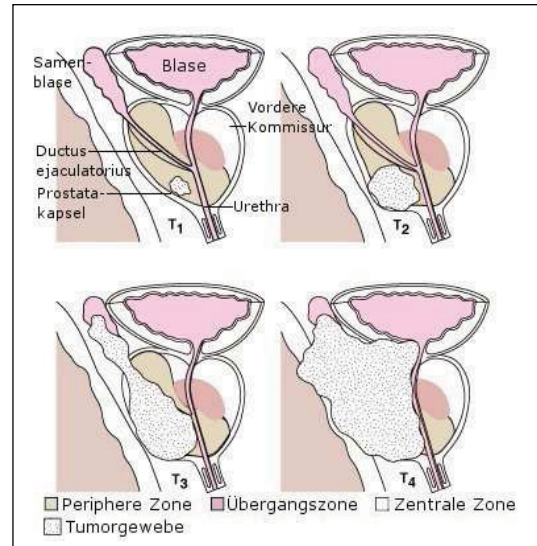


Abbildung 1.1-1: Schematische Darstellung von Topografie und Anatomie des Prostatakarzinoms [www.prostateline.com].

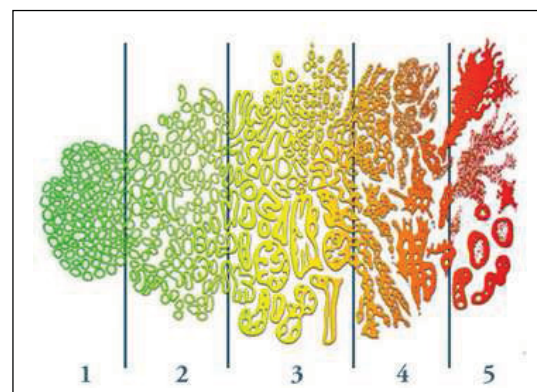


Abbildung 1.1-2: Schematische Darstellung der histologischen Gleason-Grade 1 bis 5 [www.stjohn.org]

Neben dem Tumorstadium (Stage) ist der Differenzierungsgrad (Grade) ein wichtiger Prognosefaktor. Erschwert wird die Beurteilung des Differenzierungsgrades beim Prostatakarzinom durch das häufige Nebeneinander von verschiedenen histologischen Mustern,

die eine einheitliche, prognostisch orientierte Klassifizierung erschweren [Böcker, 2000]. Histologisches Wachstumsmuster und Differenzierungsgrad reichen von hoch- bis niedrigdifferenziert über kribriform (siebförmig) bis anaplastisch (Drüsenarchitektur nicht mehr erkennbar).

Beim System nach Gleason wird der histologisch vorherrschende Drüsentyp und der zweithäufigste Drüsentyp des Biopsiematerials je mit einem Wert zwischen 1 (sehr gut differenziert) und 5 (entdifferenziert, keine Drüsenmuster erkennbar) bezeichnet. Die Addition dieser beiden Zahlen ergibt den Gleason-Score, Gleason-Grad beziehungsweise die Gleason-Summe: 2 bis 4 bedeutet gut differenziert, 5 bis 7 mäßig differenziert und 8 bis 10 undifferenziert (siehe *Abbildung 1.1-2*).

1.2 Epidemiologie

Weltweit ist das Prostatakarzinom der dritthäufigste Tumor bei Männern – mit einer halben Millionen neuer Fälle pro Jahr und einem Anteil von 10% an allen männlichen Tumoren [Parkin, 1988; Parkin, 1999; Parkin, 2001; Quinn, 2002a; , 2002b]. In den Vereinigten Staaten von Amerika belegt das Prostatakarzinom sogar Platz eins bei den Krebsneuerkrankungen (33%) und Platz zwei bei den durch maligne Erkrankungen verursachten Todesfällen (10%) [ACS, 2005].

Die Einführung des PSA-Screenings Anfang der 90er Jahre (zu Einzelheiten siehe unten) führte zu der Diagnose immer früherer Stadien [Hankey, 1999] von Prostatakarzinomen bei immer jüngeren Männern [Newcomer, 1997] und einem sprunghaften Anstieg der Inzidenz um das Jahr 1995 sowie einem milden Absinken der Mortalitätsraten. Dabei zeigen Inzidenz und Mortalität große Variationsbreiten, abhängig von Ländern und ethnischen Bevölkerungsgruppen ([Campbell, 2007] siehe auch *Kapitel 1.4*), während die Prävalenz vor allem subklinisch verlaufender Karzinome weltweit relativ homogen erscheint [Breslow, 1997]. So können in Autopsiestudien bei bis zu 75% der Männer in der Altersgruppe 85 und älter mikroskopische Prostatakarzinom-Läsionen nachgewiesen werden [Sakr, 1993; Gronberg, 2003]. In den USA und Europa werden von diesen 15 - 30% klinisch diagnostiziert, während „nur“ 4 - 7% an dieser Erkrankung sterben [Jemal, 2004; Wilson, 2004]. So ist denn auch das Lebenszeitrisko an einem Prostatakarzinom zu erkranken mindestens dreimal höher als das Risiko in seinem Leben an einem solchen zu versterben [Schalken, 2005].

Damit wird das Dilemma deutlich: Zwar hat die Einführung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) als Screening-Parameter das Management des Prostatakarzinoms in Bezug auf Früherkennung und somit eine möglichst kurative Therapie revolutioniert, jedoch ohne eine Differenzierung zwischen der großen Gruppe der latent verlaufenden und der kleineren Gruppe der sich klinisch manifestierenden Karzinome zu ermöglichen. Ferner sind die Auswirkungen des PSA-Screenings auf die Mortalitätsrate des Prostatakarzinoms, und damit der prognostische Wert der Untersuchung, noch vollkommen unklar und zurzeit Thema großer Studien (PLCO USA, ESRPC Europa bis 2008).

1.3 Diagnose, Staging und Therapie des Prostatakarzinoms

Die digitale rektale Untersuchung (DRU) der Prostata und die Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum sind die beiden primären Mittel zur Diagnose eines Prostatakarzinoms.

Über die letzten 15 Jahre hat sich das Serum-PSA als wichtiger und unabhängiger prognostischer Marker für Diagnose und Verlaufskontrolle beim lokalisierten wie auch metastatischen Prostatakarzinom etabliert [Fossa, 1992; Eisenberger, 1994]. Jedoch ist diese Serinprotease hoch organ-, aber wenig karzinomspezifisch. Erhöhte PSA-Konzentrationen ($> 4\text{ ng/ml}$) finden sich ebenfalls bei der Benigen Prostatahyperplasie (BPH), Prostatischen Intraepithelialen Neoplasie (PIN), der akuten und chronischen Prostatitis und anderen nichtmalignen Prostataerkrankungen [Bunting, 1995] und die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse aus Biopsien, die aufgrund erhöhter PSA-Werte durchgeführt werden, liegt bei bis zu 60-80% [Stephan, 2007].

Prognostisch entscheidend ist die Differenzierung zwischen organbegrenzten (T1-T2) und fortgeschrittenen (T3-T4) Stadien. Sowohl die DRU als auch der Transurethrale Ultraschall (TRUS) können nur unzureichend zwischen T2- und T3-Stadien differenzieren. Die Wahrscheinlichkeit eines Kapseldurchbruches und/oder eines Samenblasenbefalls wird am besten mittels einer Kombination von DRU, PSA und systemischer Sextantenbiopsie (Anzahl befallener Stanzzyylinder, histologischer Grad) abgeschätzt. Wenn die Behandlung entscheidend vom N-Status abhängt, kommt man um eine offene oder laparoskopische pelvine Lymphadenektomie nicht herum. Das wichtigste Verfahren zur Erfassung von Fernmetastasen ist, wegen des Tropismus, die Skelettszintigraphie [Schmid, 1999].

Zu Details der stadienabhängigen Therapie des Prostatakarzinoms siehe *Tabelle 1.3-1*.

Tabelle 1.3-1: Stadienabhängige Therapie des Prostatakarzinoms (EAU-Richtlinien 2005, [Neuhausen, 2006])

Stadium	Behandlung	Kommentar
T1a	Abwartendes Verhalten	Standardtherapie für gut bis moderat differenzierte Tumoren und einer Lebenserwartung (LEW) kleiner zehn Jahre. Bei Patienten mit einer LEW größer als zehn Jahre wird ein Re-Staging mit TRUS und Biopsien geraten.
	Radikale Prostatektomie	Optional bei jungen Patienten mit hoher LEW und schlecht differenzierten Tumoren.
	Radiotherapie	Optional bei jungen Patienten mit hoher LEW und schlecht differenzierten Tumoren.
T1b-T2b	Abwartendes Verhalten	Asymptomatische Patienten mit gut bis moderat differenzierten Tumoren und einer LEW kleiner als zehn Jahre und Patienten, die eine Behandlung ablehnen.
	Radikale Prostatektomie	Standardtherapie für Patienten mit einer LEW größer als zehn Jahre.
	Radiotherapie	Für Patienten mit einer LEW größer als zehn Jahre, sowie Patienten mit Kontraindikationen für eine Operation und gesundheitlich eingeschränkte Patienten mit einer LEW zwischen fünf und zehn Jahren und schlecht differenzierten Tumoren.
	Hormontherapie	Symptomatische Patienten die einer symptomatischen/palliativen Therapie bedürfen und aus gesundheitlichen Gründen einer kurativen Therapie nicht zugänglich sind.
	Kombination	NHT+Radikale Prostatektomie: kein Nutzen, NHT+Radiotherapie: bessere lokale Kontrolle, jedoch Verbesserung des Überlebens, Hormontherapie (zwei-drei Jahre)+Radiotherapie: besser als alleinige Radiotherapie für schlecht differenzierte Tumoren.
T3-T4	Abwartendes Verhalten	Optional bei asymptomatischen Patienten mit gut bis moderat differenzierten T3 Tumoren und einer LEW kleiner als zehn Jahre.
	Radikale Prostatektomie	Optional für ausgewählte Patienten mit begrenzten T3a Tumoren, Gleason-Summe 5-6, niedrigen PSA-Werten und einer LEW größer als zehn Jahre.
	Radiotherapie	Für T3 Tumoren mit einer LEW größer als fünf bis zehn Jahre. Eine Dosisanpassung größer als 70 Gy scheint von Nutzen zu sein. Wenn nicht verfügbar, kann eine Kombination mit Hormontherapie versucht werden.
	Hormontherapie	Symptomatische Patienten, ausgedehnte T3-T4 Tumoren, hohe PSA-Werte (größer 25ng/ml), Patienten in schlechtem gesundheitlichen Zustand. Besser als abwartendes Verhalten.
	Kombination	Radiotherapie+Hormontherapie scheint besser Ergebnisse zu liefern, als alleinige Radiotherapie, NHT+radikale Prostatektomie: keine Verbesserung.
N+, M0	Abwartendes Verhalten	Asymptomatische Patienten. Könnte einen negativen Einfluss auf das Überleben haben.
	Hormontherapie	Standardtherapie
M+	Hormontherapie	Standardtherapie. Symptomatischen Patienten sollte eine Behandlung nicht vorenthalten werden.

Hormontherapie=alle Formen der Hormontherapie; Kombination=Hormontherapie vor und/oder nach Radikaler Prostatektomie oder Radiotherapie; NHT=neoadjuvante Hormontherapie; TRUS=transrektale Urosonographie; TURP=transurethrale Resektion der Prostata

1.3.1 Prognostische und diagnostische Faktoren beziehungsweise Marker

Grundsätzlich unterscheidet man diagnostische Marker für das Prostatakarzinom, mit deren Hilfe man maligne tumoröse Erkrankungen von anderen prostatistischen Anomalien unterscheiden kann, und prognostische Marker, welche Untergruppen des unbehandelten Prostatakarzinoms identifizieren, die mit unterschiedlichen Erkrankungsfolgen assoziiert sind.

Prognostische Faktoren sollten verschiedene Eigenschaften erfüllen: Sie sollten signifikant, unabhängig, reproduzierbar und klinisch bedeutsam sein. Sie sollten ferner keine Abhängigkeit von einer bestimmten Population aufweisen, durch adäquate statistische Tests abgesichert werden und optimierte Cut-Off-Werte besitzen. Nicht zuletzt sollte ihre Anwendung im klinischen Alltag von praktischem Nutzen, und ihre Bestimmung finanziell erschwinglich sein.

Im Jahre 1999 wurden auf zwei Konferenzen der WHO (World Health Organisation) und der CAP (College of American Pathologists) prognostische und diagnostische Faktoren des Prostatakarzinom in Kategorien eingeteilt. *Tabelle 1.3.1-1* gibt eine Übersicht.

Tabelle 1.3.1-1: Diagnostische und prognostische Faktoren für das Prostatakarzinom [Bostwick, 1999].

CAP (College of American Pathologists)	WHO (World Health Organisation)
Kategorie I: Faktoren, bei denen in vielen veröffentlichten Untersuchungen ein prognostischer und prädiktiver Wert nachgewiesen werden konnte und die für die Routineanwendung empfohlen werden.	
TNM-Stadium	TNM-Stadium
Histologischer Grad (Gleason-Summe)	Histologischer Grad (Gleason-Summe und WHO nuclear grade)
Status der Resektionsränder	Status der Resektionsränder
Perioperativer PSA-Wert	Perioperativer PSA-Wert
	Pathologischer Effekt der Behandlung
	Ort des Auftretens des Prostatakarzinoms in der Prostata
Kategorie II: Faktoren, die aufgrund vieler veröffentlichter Untersuchungen als vielversprechende prädiktive Faktoren gelten, bei denen jedoch vor einer generellen Empfehlung weitere Auswertungen stattfinden müssen. Oder solche, die trotz inkompletter Datenlage schon als prognostische/diagnostische Marker empfohlen werden.	
DNA-Ploidie	DNA-Ploidie
Histologische Typ	Histologische Typ
Tumervolumen im Biopsiematerial	Tumervolumen im Biopsiematerial
Tumervolumen im Gewebe aus Radikaler Prostatektomie	Tumervolumen im Gewebe aus Radikaler Prostatektomie
Kategorie III: Faktoren, bei denen ein prognostischer/diagnostischer Wert in einigen wissenschaftlichen Untersuchungen bestätigt wurde, die aber zurzeit nicht empfohlen werden. Ebenso solche von zweifelhafter Bedeutung.	
Prostata-Spezifisches-Membranantigen	Prostata-Spezifisches-Membranantigen
Andere Serum-Tests (RT-PCR, PSM, hK2, IGF)	Andere Serum-Tests (RT-PCR, PSM, hK2, IGF)
Perineurale Invasion	Perineurale Invasion
Vaskuläre/lymphatische Invasion	Vaskuläre/lymphatische Invasion
Mirovaskuläre Dichte	Mirovaskuläre Dichte
Stromafaktoren (TGF- β , Integrine)	Stromafaktoren (TGF- β , Integrine)
Proliferationsmarker und Apoptose	Proliferationsmarker und Apoptose
Nukleare Morphometrie und Kariometrische Analyse	Nukleare Morphometrie und Kariometrische Analyse
Androgenrezeptor	Androgenrezeptor
Neuroendokrine Marker	Neuroendokrine Marker
Genetische Marker	Genetische Marker
Alle anderen Faktoren	Alle anderen Faktoren

Wie aus der Tabelle hervorgeht, können bisher allein Tumor-Stadium, Tumor-Grad, der Status der Resektionsränder und perioperativer PSA-Wert für die klinische Routine uneingeschränkt empfohlen werden.

1.3.2 Kombination prognostischer Faktoren (Indizes)

Da alle Einzelfaktoren mit Schwächen behaftet sind, hat sich die kombinierte Beurteilung prognostischer Faktoren hinsichtlich der Abschätzung der individuellen Patientenprognose als entscheidend herausgestellt. Modelle hierfür bieten das Bin-Modell, Kaplan-Meier-Kurven, lineare Regression, Indizes, Nomogramme und viele mehr. Partin-Tabellen sind sehr erfolgreiche

Nomogramme für das Prostatakarzinom, um pathologisches Stadium, Status der Resektionsränder und Beteiligung der Lymphknoten, basierend auf Informationen aus dem Gleason-Grad von Nadelbiopsien, klinischem Stadium und perioperativem PSA, vorherzusagen [Humphrey, 1991; Partin, 1993; Partin, 1997]. Diese Tabellen finden breite Anwendung in der Therapie-Planung und Kommunikation mit individuellen Patienten.

Allerdings erlauben sie nur eine statistische Abschätzung des Risikoprofils mit Grenzen bei Bestimmung des individuellen Patientenzustandes.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

- 1) Bei den lokal begrenzten Prostatakarzinomen (T1-T2), die meist über Screeningverfahren detektiert werden, fehlt es an prognostischen/diagnostischen Markern, die eine Differenzierung zwischen aggressiven und harmlosen Tumoren zulassen. Vielen Patienten könnte eine Operation und alle damit verbundenen Risiken und Nebenwirkungen erspart bleiben. Trotzdem ist eine kurative Therapie unter heutigen Gesichtspunkten mit guten bis sehr guten Ergebnissen möglich [Adolfsson, 1993].
- 2) Beim lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom (T3-T4) fehlt es sowohl an klinischen als auch operativ-histopathologischen Verfahren, um eine nodale/systemische Ausbreitung auszuschließen und so einer selektiven Patientengruppe eine kurative Therapie zukommen zu lassen. Nach Therapieeinleitung besteht auch hier mangels prognostischer Marker das Problem, den Verlauf der Erkrankung vorherzusagen und Patienten mit individuell erhöhtem Rezidivrisiko zu erkennen. Eine kurative individuelle Therapie ist also in vielen Fällen möglich, wird aber durch Probleme beim Staging erschwert. Die Prognose schwankt von sehr gut bis sehr schlecht.
- 3) Im Falle einer systemischen Ausbreitung (N+, M+) fehlt es an wirkungsvollen Therapiemöglichkeiten. Die Prognose der betroffenen Patienten ist in der Regel sehr schlecht [Malmstrom, 2005; Schmidt, 2005].

Um der Lösung dieser Probleme näher zu kommen, ist ein grundlegendes Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Initiation und Progression des Prostatakarzinoms notwendig. Es existieren zwar wirkungsvolle Screening-Verfahren, um das Prostatakarzinom frühzeitig festzustellen und ebenso gibt es Faktoren, anhand derer eine Klassifikation des Tumors und damit

eine Therapieentscheidung durchgeführt werden kann. Doch handelt es sich hierbei um Schablonen, die in vielen Fällen nicht der differenzierten und heterogenen Natur des Prostatakarzinoms gerecht werden.

Die Anwendung molekularer Techniken in der Erforschung des Prostatakarzinoms hat viele Veröffentlichungen und ebenso viele potentielle Marker hervorgebracht, welche aber kaum zur Aufklärung der pathophysiologischen Mechanismen beigetragen haben. Trotz der viel versprechenden Entwicklung sind deswegen bis heute kaum molekulare Marker verfügbar, die für die klinische Anwendung empfohlen werden.

Im Folgenden soll eine Übersicht über bekannte Veränderungen der Ätiologie und Pathogenese des Prostatakarzinoms gegeben werden.

1.4 Ätiologie des Prostatakarzinoms

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist weitgehend ungeklärt. Es sind viele Studien über Ursachen und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms veröffentlicht worden, wobei aber die wirklichen Hintergründe weiter unklar bleiben [Pienta, 1993; Selley, 1997] und es immer noch keine Präventivmaßnahmen gibt, die belegbar das Erkrankungsrisiko minimieren [Mickelson, 2000].

Somit bleiben die einzigen etablierten Risikofaktoren Alter, ethnische Abstammung und die Familiengeschichte [Nomura, 1991]. Weitere Risikofaktoren wie Hormonhaushalt, Ernährung, entzündlich infektiöse Ursachen und viele andere mehr liefern bisher kein einheitliches und vor allem reproduzierbares Maß um sie als Risikoparameter nutzen zu können.

Dies hängt vor allem damit zusammen, dass die Veränderungen auf molekularer Ebene bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms weitgehend unbekannt sind.

Abbildung 1.4-1 spiegelt den aktuellen Wissensstand wieder. Man könnte kritisch anmerken, dass es sich dabei um nicht viel mehr als eine theoretische Übertragung von aus anderen malignen Erkrankungen bekannten Mechanismen auf das Prostatakarzinom handelt. Offensichtlich ist die Vielzahl und vor allem Heterogenität der wissenschaftlichen Ergebnisse das Hauptproblem. So gibt es nur relativ wenige rekurrente und reproduzierbare Veränderungen beziehungsweise Faktoren, welche sich nachhaltig auf Risiko und Progression des Prostatakarzinoms auswirken.

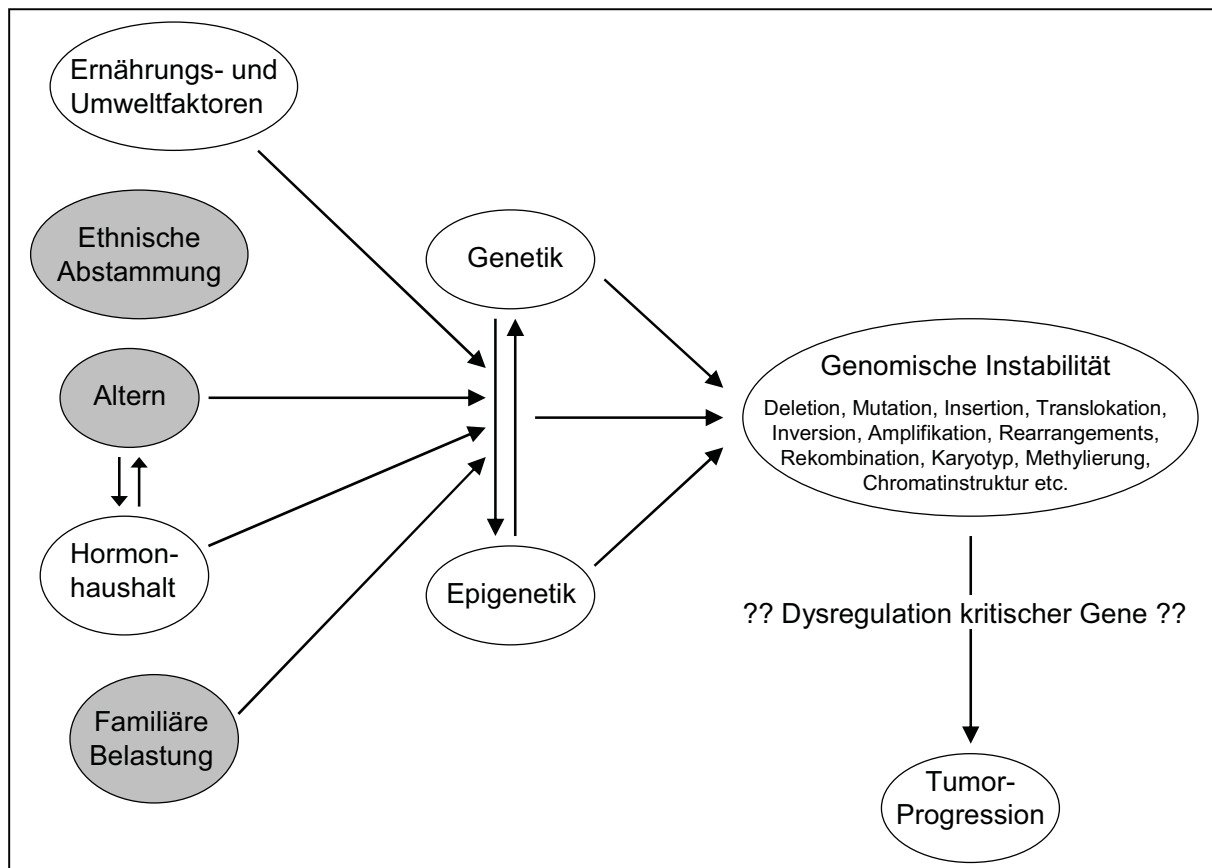


Abbildung 1.4-1: Ätiologie und Pathogenese des Prostatakarzinoms (modifiziert nach [Karan, 2003])

Ein besonderes Merkmal des Prostatakarzinoms ist seine enge Beziehung zum Alterungsprozess (siehe auch *Kapitel 1.2*), und tatsächlich ist das Alter der signifikanteste Risikofaktor [Shen, 2003]. Obwohl präneoplastische Veränderungen wie die Prostatistische Intraepitheliale Neoplasie (PIN) schon bei Zwanzigjährigen gefunden werden und bei Fünfzigjährigen häufig sind [Sakr, 1993], wird das klinisch auffällige Prostatakarzinom selten vor dem 60ten oder 70ten Lebensjahr manifest.

Während das Prostatakarzinom in der westlichen Welt schon eine erhöhte Inzidenz aufweist, ist es in den USA noch häufiger und erreicht hier seine höchsten Raten bei der männlichen afroamerikanischen Bevölkerung. Bei Afroamerikanern in den USA tritt das Prostatakarzinom in früheren Lebensjahren auf [Brawley, 1998a; Brawley, 1998b] und ist mit einer schlechteren Prognose als bei der kaukasischen Bevölkerung verbunden. Im Gegensatz dazu haben Japaner und andere Asiaten das geringste Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken. Interessanterweise ist das Prostatakarzinom-Risiko für in die USA eingewanderte Japaner in der

zweiten Generation fast so hoch wie bei der kaukasischen Bevölkerung [McCracken, 2007], was den besonderen Einfluss von Umwelt- und Ernährungsfaktoren nahe legt.

Epidemiologisch kann man das Prostatakarzinom in hereditäre und sporadische Formen unterteilen [Carter, 1993]. Epidemiologische Studien zeigen, dass etwa 5-10% aller Prostatakarzinome und 30-40% der früh auftretenden Fälle auf hereditäre Faktoren zurückzuführen sind [Bratt, 1999]. Verwandte von Prostatakarzinom-Patienten haben ein klar erhöhtes Krankheitsrisiko, das abhängig von Alter, Anzahl der betroffenen Verwandten und Verwandtheitsgrad um zwei- bis fünffach höher liegt als in der Normalbevölkerung [Bratt, 2002a; Bratt, 2002b]. Erblich bedingte Prostatakarzinome fallen durch ihren im Schnitt 6-7 Jahre früheren Krankheitsdiagnose auf, unterscheiden sich jedoch weder klinisch noch histologisch von den sporadischen Formen [Bastacky, 1995; Keetch, 1996; Valeri, 2000]. Allein die Sterberate ist in der Gruppe des hereditären Prostatakarzinoms höher, wahrscheinlich aufgrund des früheren Krankheitsbeginns [Bratt, 2002a; Bratt, 2002b].

Auf der Suche nach hochpenetranten hereditären Genen wurden verschiedene genomische Regionen definiert, die autosomal-dominant vererbte Prostatakarzinom-Gene enthalten sollen: 1q24-1q25 (HPC1/RNASEL), 1q42-1q43 (PCAP), Xq27-q28 (HPCX), 1q36 (CAPB), 20q13 (HPC20), 17p11 (HPC2/ELAC2), 16q23, 8p22 (MSR1) [Nwosu, 2001; Simard, 2002]. Ebenso wurden Polymorphismen gefunden, die mit einem erhöhten Prostatakarzinom-Risiko verbunden sind, beispielsweise im Bereich von 8q24 [Severi, 2007; Tomlins, 2007].

Ein vergleichbar penetrantes Gen wie das APC-Gen auf Chromosom 5q21 beim hereditären Kolonkarzinom konnte jedoch nicht gefunden werden. Alle Gene erhöhen das Prostatakarzinom-Risiko, wenn überhaupt, nur geringgradig. Die betroffenen Regionen wechseln von Population zu Population und sind kein konstant wiederkehrendes Ziel allelischer Verluste [Schulz, 2003].

Somit lässt die aktuelle Datenlage eher darauf schließen, dass das Erkrankungsrisiko bei familiär gehäuftem Auftreten von einer Anzahl verschiedener Gene moduliert wird, die eventuell zu einer Anfälligkeit gegenüber exogenen Faktoren prädisponieren.

1.5 Pathogenese des Prostatakarzinoms

Auch die Pathogenese des Prostatakarzinoms ist größtenteils unbekannt und die molekularen Mechanismen und Zusammenhänge liegen weitgehend im Dunkeln. Grundlage des aktuellen Wissensstandes sind Theorien, die auch bei anderen Tumorleiden Anwendung finden.

So geht man davon aus, dass maligne Tumorerkrankungen mit der Anhäufung von verschiedenen genetischen Defekten einhergehen, die zum einen auf der Nukleotid-Ebene (Insertion, Deletion, Punktmutation) oder auf chromosomaler Ebene (Verlust oder Zugewinn von Chromosomenteilen) stattfinden können [Karan, 2003]. *Tabelle 1.5-1* gibt hierzu eine Übersicht.

Tabelle 1.5-1: Formen der genetische Instabilität und die bevorzugten Methoden ihrer Detektion

Änderung der DNS-Sequenz auf Nukleotid-Ebene	Strukturelle chromosomale Veränderungen	Numerische chromosomale Veränderungen
Punktmutation (Basenaustausch als nonsense, missense, silent), <i>PCR-Analysen</i>	Sehr große Deletionen (Chr. 8p im Prostatakarzinom), <i>Zytogenetik</i>	Aneuploidie , <i>Zytogenetik</i>
Kleine und große Insertionen , <i>PCR-Analysen</i>	Chromosomale Translokation , <i>Zytogenetik</i>	Chromosomenzugewinne , <i>Zytogenetik</i>
Kleine und große Deletionen , <i>PCR-Analysen</i>	Chromosomale Inversion , <i>Zytogenetik</i>	Chromosomenverluste , <i>Zytogenetik</i>
	Genamplifikation , <i>Zytogenetik</i>	
	Rekombination oder Rearrangements	

Daneben finden sich ebenfalls Unregelmäßigkeiten epigenetischer Art, wie DNA-Hyperbeziehungsweise Hypomethylierung, Abweichungen in Chromatin-Modellierung, Histon-Modifikationen sowie posttranskriptionelle Regulation zum Beispiel durch siRNAs (small interfering RNAs) [Gonzalgo, 2003]. Eine ganze Reihe von Genen, die in die Initiation und Progression des Prostatakarzinoms einbezogen sind, werden so epigenetisch reguliert. Als markantes Beispiel sei hier die sehr häufige Promotorhypermethylierung des GSTP1-Gens erwähnt [Campbell, 2007].

Des Weiteren korreliert der Grad globaler Hypomethylierung im Prostatakarzinom mit der Anzahl chromosomaler Verluste und Zugewinne, besonders in Bezug auf Chromosom 8 [Schulz, 2002; Neuhausen, 2006]. Unterschieden wird hier zwischen der (globalen) Hypomethylierung repetitiver Sequenzen, die eng mit der Tumorprogression zusammenzuhängen scheint [Bedford, 1987; Santourlidis, 2001; Ehrlich, 2002] und selektiver Hypermethylierung kodierender sowie

regulatorischer Sequenzen (Promotorbereiche), die zur Abschaltung betroffener Gene führen kann [Schulz, 2003].

Zusammengefasst kann man von diesen genetischen und epigenetischen Unregelmäßigkeiten als einer genomischen Instabilität sprechen. Dabei ist genomische Instabilität eine Eigenart maligne entarteter Zellen, die generell verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen in sich tragen [Schulz, 2003]. Sie gilt als notwendige Komponente für die Entstehung und Progression des malignen Phänotyps [Loeb, 1991].

Allgemein kommen zwei Haupttypen von Instabilität vor. Die weniger häufige Form ist die Mikrosatelliteninstabilität, welche sich auf Defekte in Genen für die DNA-Reparatur beziehen (siehe auch HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer).

Der andere Typ beschreibt numerische und komplexe strukturelle Veränderungen von ganzen Chromosomen beziehungsweise Chromosomenabschnitten und ist wesentlich häufiger bei soliden Tumoren wie dem Prostatakarzinom [Lapointe, 2004].

Da die Untersuchung von Tumorsuppressor- und Onkogenen aus anderen malignen Erkrankungen (TP53, PTEN, MYC, EGFR, BCL2) und des hereditären Prostatakarzinoms keine wesentliche Erkenntnisse erbrachte, folgte man auf der Suche nach Kandidaten- oder Schlüsselgenen wiederkehrenden chromosomalen Veränderungen im Prostatakarzinom [Cronauer, 2005].

In neuerer Zeit werden ferner zunehmend Hochdurchsatzverfahren, wie die Array-CGH und Expressionsstudien mittels Gen-Chips [Lapointe, 2004; Yu, 2004] sowie Analysen auf Proteom-Ebene [Varambally, 2005] eingesetzt. Auf diese Weise wurde beispielsweise die TMPRSS2-ETS-Genfusion als Ursprung der Überexpression von Mitgliedern der ETS-Genfamilie im Prostatakarzinom entdeckt, die sich als auffällig häufige Veränderung in frühen Entwicklungsstufen des Prostatakarzinoms findet und sich als prognostisch ungünstig erwiesen hat [Lapointe, 2004; Tomlins, 2005; Perner, 2007; Tomlins, 2007].

Trotzdem ist umstritten, in welchem Maße besonders chromosomale Instabilität Ursache oder Effekt der malignen Transformation darstellt [Lamlum, 2000; Li, 2000; Zimonjic, 2001; Marx, 2002; Duesberg, 2003; Gisselsson, 2003].

1.5.1 Chromosomale Veränderungen im Prostatakarzinom

Während frühe Stufen des Prostatakarzinoms euploid verbleiben, häufen sich numerische und strukturelle chromosomale Veränderungen bei fortgeschrittenen Stadien zunehmend an. Zunächst dominieren Deletionen (Verluste) chromosomaler Segmente, während Zugewinne genetischen Materials in fortgeschrittenen Stadien häufiger auftreten [Nupponen, 1999; Dong, 2001a].

Zusammengefasst sind die häufigsten im Prostatakarzinom veränderten Autosomen in abnehmender Folge: 8, 13, 7, 10, 16, 6, und 17. Außerdem finden sich häufig Zugewinne oder Amplifikationen von Teilen des X-Chromosoms, sowie Verluste des Y-Chromosoms [Hyytinen, 1999; Latil, 1999; Schulz, 2003].

In den letzten Jahren hat sich zunehmend das Konzept des einen oder anderen genetischen Pfades der Prostata-Karzinogenese durchgesetzt. Dabei sind deutlich Initiationsergebnisse zu erkennen, nämlich vornehmlich Verluste genetischen Materials der Chromosomen 8p, 13q, 16q und 21q, eventuell auch Verlust von 6q [Lapointe, 2004; Tomlins, 2007]. Bei der Progression des Tumors zeigt das Prostatakarzinom eine erhöhte Komplexität der genomischen Veränderungen, die zu genomischen Imbalancen wie dem Verlust von 6q, aber besonders zu chromosomalen Zugewinnen der Chromosomen 8q, 1q, 7q, und 3q führt [Bova, 1996; Torring, 2007].

1.5.1.1 Chromosom 8p

Unter den wiederkehrend und reproduzierbar nachweisbaren genetischen Veränderungen des Prostatakarzinoms ist mit Abstand am häufigsten Chromosom 8 betroffen – und zwar durch Sequenzverluste des kurzen Arms 8p und Zugewinne des langen Arms 8q [Nupponen, 1998].

Durch alle Studien hindurch sind dabei die beständigsten Abweichungen die Verringerung der Kopienzahl beziehungsweise LOH auf Chromosom 8p, die in durchschnittlich mehr als der Hälfte aller Fälle (66%) auftreten [Latil, 1998; Schulz, 2003].

Besonders häufig sind die Regionen 8p22 [Bova, 1996], 8p21 [Macoska, 1995] und 8p12 [Suzuki, 1995] betroffen, wobei Verluste von 8p12 und 8p21 frühe Ereignisse in der Prostatakarzinogenese zu sein scheinen, da sie sowohl in PIN-Läsionen, als auch in frühen invasiven Karzinomen gefunden werden, während Verluste der 8p22 Region eher in noch weiter fortgeschrittenen Stadien dominieren [Shen, 2003].

Des Weiteren existieren Theorien über Fragile- sowie Bruchstellen auf Chromosom 8p (8p12, 8p22), die zu illegitimen Rekombinationen, Genzerreißungen, Genfusionen, besonders über den breakage-fusion-bridge-(BFB) Mechanismus zu Amplifikationen und anderen Aberrationen führen können und zum Teil auch für die chromosomalen Zugewinne auf 8q verantwortlich sein sollen [Gelsi-Boyer, 2005; Perner, 2007].

Dabei sind die beschriebenen chromosomalen Veränderungen nicht nur von statistischer, sondern auch von klinischer Bedeutung, denn sie zeigen häufig einen signifikanten Zusammenhang mit prognostischen Parametern wie histologischem Grad, Stadium, Krankheitsprogression, Lymphknotenstatus und anderen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zum einen Verluste auf 8p und zum anderen Zugewinne von 8q mit prognostisch ungünstigen Parametern korrelieren (*Tabelle 1.5.1.1-1*).

Tabelle 1.5.1.1-1: Zusammenfassung chromosomaler Veränderungen, die statistisch signifikant mit klinisch-prognostischen Parametern korrelieren (Literaturrecherche via PubMed).

Region	Veränderung	Klinische Parameter	Referenz
8p	Deletion	Histologischer Grad und Stadium	[Cher, 1994]
8	Zugewinn/Aneusomy	Systemisches Fortschreiten	[Takahashi, 1996]
8	Zugewinn	Lymphknotenmetastasen	[Matsuura, 1996]
8p	LOH	Histologischer Grad	[Cunningham, 1996]
8	Zugewinn	Krankheitsprogression, vor allem lokal	[Paris, 2004]
8q 8p21.3	Zugewinn Allelische Imbalance	Knochenmetastasen Tod durch Krankheit	[Jenkins, 1997]
8	Zugewinn mit MYC Anstieg	Gleason Summe	[Sato, 1999]
8p Verlust + 8q Zugewinn	Verlust / Zugewinn	Stadium, hoher prä-OP PSA, post-OP PSA Anstieg	[Macoska, 2000]
8q	Zugewinn	Krankheitsprogression nach RP	[Paris, 2004]
8pter-p23	Verlust	Krankheitsprogression, Gesamtüberleben	[Washburn, 2000]
8p21.3-p22 8p21.1-p21.2	Deletion Deletion	Histologischer Grad Stadium	[Oba, 2001]
8p 8q	Verlust Zugewinn	Tumorzusammenhang, histologischer Grad Tumorzusammenhang, histologischer Grad, Stadium	[Paris, 2004]
8p22 8p22 Deletion + 8q Zugewinn	Deletion Deletion / Zugewinn	Histologischer Grad Krankheitsprogression	[Matsuyama, 2001] [Matsuyama, 2001]
8p21-22	Deletion	Histologischer Grad	[Dong, 2001a]
8q	Zugewinn	Krankheitsprogression	[Steiner, 2002]
8p22 8q24	Verlust Zugewinn	Krankheitsprogression Gleason-Summe	[Tsuchiya, 2002]
8p22	Deletion	Histologischer Grad, Krankheitsprogression	[Matsuyama, 2003a]
8pter-p23	Deletion	Histologischer Grad, Krankheitsprogression	[Matsuyama, 2003b]
8q 8p22 Deletion + 8q Zugewinn	Zugewinn Deletion / Zugewinn	Krankheitsprogression Krankheitsprogression	[Paris, 2004] [Paris, 2004]
8p23.2	Verlust	Stadium	[Paris, 2004]
8p	Allelische Imbalance	Stadium, Gleason Summe, Infiltration der Samenblase	[Zhou, 2004]
8p : 8q (NKX3.1: MYC)	Reduziertes Verhältnis	Stadium, vor allem Kapselpenetration	[Kindich, 2006]
8p22 Fraktion 8p22, 8p21.1-2, 8p12 8p22	Reduziert Verlust Verlust	Krankheitsspezifischer Tod, Krankheitsprogression Krankheitsprogression Krankheitsspezifischer Tod	[Matsuyama, 2007]

1.5.1.2 Chromosom 8q

Fast 90% der hormonrefraktären und fernmetastasierten, aber nur 5% der unbehandelten Prostatakarzinome zeigen Zugewinn von Chromosom 8q. Innerhalb des q-Arms sind mittels CGH zwei unabhängig amplifizierte Subregionen identifiziert worden, die die Präsenz von verschiedenen Zielgenen vermuten lassen: 8q21 und 8q23-24 [Visakorpi, 1995; Cher, 1996; Nupponen, 2000].

Speziell die Amplifikation der 8q24.21 Region, wo das MYC-Onkogen liegt, wurde in verschiedenen Studien als unabhängiger Prognosefaktor prädiktiv für Tumorrezidiv, Metastasen und schlechtes Patienten-Outcome gefunden [Jenkins, 1997; Sato, 1999].

Die unterschiedlichen Arten genetischer Veränderungen können schließlich über verschiedene Mechanismen (Veränderung von Gendosis, Genregulation, Spleißen, Protein-Verkürzung („Trunkation“), Genverlust, Fusionsgene etc.) zu Abweichungen in Genexpression sowie veränderten Genprodukten in den Tumorzellen führen. Dabei sind Veränderungen der Genexpression bei weitem nicht nur auf eine Abweichung der Gendosis oder Genmutationen zurückzuführen. Sekundäre Mutationen in Regulationsgenen sowie epigenetische Mechanismen können ganz ähnliche Konsequenzen haben [Neuhausen, 2006].

So ist es nicht immer offensichtlich, welche Veränderungen für die Tumorentwicklung erforderlich sind, welche zum Tumorphänotyp beitragen, ohne wesentlich zu sein, und welche rein zufällig oder unbedeutend sind.

Wie schwierig häufig der Nachweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen Gendosisveränderungen auf der einen und Abweichungen im Expressionsniveau auf der anderen Seite sind, zeigt folgendes Beispiel.

1.5.2 NKX3.1: Die Geschichte eines potentiellen Tumorsuppressors

Das wohl vielversprechendste Tumorsuppressor-Gen (TSG) auf Chromosom 8p war beziehungsweise ist NKX3.1. Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit DNA-Bindungsstelle (homebox domain).

Das Gen liegt in einer der am häufigsten von Verlusten betroffenen Regionen (auf Chromosom 8p21.2), deren Verlust sich sowohl in Proben aus PIN-Läsionen, als auch aus fortgeschrittenen Stadien findet [Emmert-Buck, 1995; Vocke, 1996]. In der Maus konnte gezeigt werden, dass NKX3.1 in der embryonalen Prostata eine essentielle Rolle für die normale Prostataentwicklung und Differenzierung hat [Gonzalzo, 2003]. Es ist zugleich der früheste nachweisbare Marker der Prostataausbildung und bleibt über alle Stufen der Differenzierung bis ins Erwachsenenalter nachweisbar [Shen, 2003]. Des Weiteren konnten NKX3.1-Expressionsverluste mit der Entwicklung eines hormonrefraktären Zustandes und fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert werden [Voeller, 1997; Bowen, 2000]. Dies sind allesamt Charakteristika, die auf ein Tumorsuppressor-Gen zutreffen könnten.

Das klassische „Two-Hit-Modell“ von Knudson besagt, dass beide Allele eines Tumorsuppressor-Gens ausgeschaltet werden müssen, um einen Funktionsverlust des betroffenen Gens herbeizuführen, da ein verbleibendes Allel in der Lage ist die notwendige Funktion aufrecht zu erhalten oder gar die Dosisreduktion auszugleichen [Knudson, 2001]. Man würde nun also in Analysen des Genlokus die Mutation, Deletion (zum Beispiel in LOH-Analysen) oder Hypermethylierung beider Allele erwarten. Tatsächlich aber findet sich in den meisten Prostatakarzinomen, auch denen mit LOH und Deletionen von 8p, immer mindestens ein funktionstüchtiges Allel und ein Expressionsniveau, das selten um mehr als 50% reduziert ist [Shen, 2003], wobei die Daten verschiedener Arbeitsgruppen teilweise sehr diskrepant sind [Tomlins, 2006].

Trotz der Lage in einer im Prostatakarzinom sehr häufig von Verlusten genetischen Materials betroffenen Region scheint es keinen direkten reproduzierbaren Zusammenhang zwischen der Gendosis und dem Expressionsniveau von NKX3.1 zu geben. Um NKX3.1 trotzdem als Tumorsuppressor-Gen zu akzeptieren, müsste man postulieren, dass die Reduktion seiner Expression um die Hälfte ausreicht, um seine Funktion zu inaktivieren. Die Menge oder Quantität des Genproduktes eines Gens würde dabei in einer von der Gendosis abhängigen Weise reguliert (Gen-Dosis-Effekt) [Matsuyama, 2007]. Diesen Zustand beschreibt der Begriff der

Haploinsuffizienz. Ein Gen, das in dieser Weise an der Tumorentstehung beteiligt ist erfüllt nicht die von Knudson definierten Kriterien eines Tumorsuppressor-Gens. Nach dieser Definition dürfte streng genommen ein (haploinsuffizientes) Tumorsuppressor-Gen keiner Kompensation oder anderweitigen regulatorischen Einflüssen unterliegen. Erschwerend kommt hinzu, dass wegen der Vielzahl von epigenetischen Regulationsmechanismen die vermehrte Expression eines Tumorsuppressor-Gens Ausdruck einer Vielzahl von möglichen Ursachen sein kann. Wegen der Unmöglichkeit der Analyse aller dieser Regulationsmechanismen in menschlichen Tumoren handelt es sich bei der „Diagnose“ Haploinsuffizienz praktisch um eine Ausschlussdiagnose.

Darüber hinaus ist auch die Auswirkung der Verminderung oder des Verlustes der NKX3.1-Expression im Rahmen der Tumorentstehung nicht eindeutig geklärt. So scheint im Mausmodell der NKX3.1-Verlust erst in Kooperation mit der Veränderungen bestimmter anderer Gene, zum Beispiel PTEN, die postulierte onkogene Wirkung zu entfalten (siehe *Kapitel 4.1.4*) [Kim, 2002b; Shen, 2003].

Neben oder gar aufgrund dieser eher theoretischen Überlegungen ist die genaue Funktion von NKX3.1 und seine Rolle im Prostatakarzinom trotz vielversprechender Ansätze weitgehend unbekannt.

1.6 Weitere Kandidatengene auf Chromosom 8p

Einige Gene, die im Kontext von Chromosom 8p bedeutsam sein könnten – und in dieser Arbeit deswegen untersucht wurden - sollen hier kurz vorgestellt werden. Dabei handelt es sich zum einen um bekannte Kandidatengene (NKX3.1, DLC1, FGFR1, CSMD1), zum anderen um Gene, die wegen ihrer chromosomalen Lage und ihrem Expressionsniveau in einer von uns durchgeführten cDNA-Microarraystudie in den Fokus des Interesses rückten.

Die Fragestellung ist dabei, ob in der so häufig von genetischen Veränderungen betroffene Region 8p Tumorgenen (zum Beispiel Onkogene oder Tumorsuppressor-Genen) liegen, die eine relevante Rolle bei Initiation und Progression des Prostatakarzinoms spielen. Des Weiteren, ob diese genetischen Veränderungen zu Abweichungen im Expressionsniveau führen und ob sich daraus eine Rolle als Kandidatengen für das Prostatakarzinom ableiten lässt. Bei den meisten der folgenden Gene sind Veränderungen auf genetischer oder transkriptioneller Ebene in der Literatur beschrieben worden, zum Teil für andere (Tumor-) Erkrankungen als das Prostatakarzinom. Einige werden schon als putative Onko- oder Tumorsuppressor-Gene

gehandelt. Diese Vermutung stützt sich auf die Funktion bei wichtigen zellulären Prozessen wie Metabolismus, Transkription und Translation, Entwicklung und Morphogenese, besonders jedoch Zell-Zyklus-Progression, Zellwachstum, Angiogenese, Immunantwort und Apoptose.

1.6.1 CSMD1 (CUB and Sushi Multiple Domains 1 Gene)

Das CSMD1-Gen ist ein putatives Tumorsuppressor-Gen bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. Das riesige 11,5 kb Transkript kodiert für ein 389-kDa großes Transmembranprotein, das nach seinen wiederholten CUB- und Sushi-Domänen benannt ist. Beide Arten von Domänen werden häufig in Proteinen gefunden und stellen vermutlich Orte der Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Interaktion dar, weswegen angenommen wird, dass CSMD1 als Transmembranrezeptor oder Adhäsionsmolekül agiert [Lau, 2003]. Dabei ist die genaue Funktion dieses Proteins weiter unbekannt. Kürzlich konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass eine verminderte CSMD1-Expression im Prostatakarzinom mit Rezidivwahrscheinlichkeit und Überlebensrate assoziiert ist [Henshall, 2003]. In einer anderen Arbeit wurden Deletionen der 8p23-Region im Prostatakarzinom mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium in Verbindung gebracht, und es konnte gezeigt werden, dass auch hier die Expression des Gens bei Patienten mit fortgeschrittenem Stadium (>pT3) erniedrigt ist [Paris, 2004].

Nach der vollständigen Sequenzierung von Chromosom 8 im Januar 2006 durch das IHGSC (The International Human Genome Sequencing Consortium) wurde als Teil dieses Projektes eine Arbeit veröffentlicht, in der als einzigartige Eigenschaft von Chromosom 8 eine riesige, 15 Megabasen umfassende, auf dem distalen Arm 8p liegende Region gefunden wurde, welche eine außergewöhnlich hohe Variation bei verschiedenen Individuen und Populationen aufweist. Diese Region enthält diverse Gene, die mit der angeborenen Immunität und dem Nervensystem in Zusammenhang stehen, unter anderem auch CSMD1 [Nusbaum, 2006].

1.6.2 DLC1 (Deleted in Liver Cancer Gene 1)

Das DLC1-Gen kodiert für ein Rho GTPase-aktivierendes Protein, das RAS-vermittelte onkogene Prozesse (zum Beispiel Zellmorphologie, Motilität und Proliferation) hemmt [Durkin, 2002].

Das Gen liegt im Chromosomenbereich 8p21-22, einer Region, die in einer Vielzahl menschlicher Tumoren von Deletionen und einer Reduktion der Kopienzahl betroffen ist, einschließlich Malignomen von Prostata, Kolon, Brust, Ovar, Leber, Lunge, Kopf, Hals und Leber [Zitzelsberger, 1997; Arbieva, 2000; Martinez-Clement, 2001; Xu, 2001]. Expressionsverluste des Gens konnten ebenfalls in Tumorzelllinien von Brust, Kolon und Prostata nachgewiesen werden [Yuan, 1998; Wilson, 2000; Guan, 2006].

Ursprünglich erlangte DLC1 den Ruf eines Tumorsuppressor-Gens im Hepatozellulären Karzinom (HCC), wo seine Inaktivierung mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht wird. Obwohl im HCC somatische Mutationen des Gens selten sind, findet sich ein LOH in ungefähr der Hälfte der primären Hepatozellulären Karzinome [Wong, 2005].

Ferner finden sich in Studien Promotormethylierungen in annähernd 24% der primären HCC [Wong, 2005], 30% der primären Magenkarzinome [Kim, 2003], 48% der Prostatakarzinome und 71% der benignen Prostatahyperplasien [Guan, 2006], was auf eine epigenetische Regulation schließen lässt.

1.6.3 FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene)

Das FGFR1 Gen gehört zu einer Gruppe von vier Zell-Oberflächen-Tyrosinkinaserzeptoren (FGFR1-4), die Signale von dem Wachstumsfaktor FGF (Fibroblast Growth Faktor) an verschiedenste Zelltypen vermitteln. Prozesse bei denen die verschiedenen FGFs eine wichtige Rolle spielen umfassen Angiogenese (auch und vor allem während der frühen Tumorentwicklung), Organogenese (unter anderem der Prostata) in der Embryonalentwicklung, Wundheilung und Regulation von Apoptose. Die Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren (FGFRs) sind wichtig für Organogenese der Prostata sowie Pathogenese des Prostatakarzinoms [Cunha, 1987; Leung, 1996; Gowardhan, 2005].

FGFR1 ist ein potentiell Onkogen, da Amplifikationen im Mammakarzinomen und Rearrangements in hämatologischen Erkrankungen nachgewiesen wurden [Devillard, 2006]. Ferner liegt FGFR1 in der Nähe eines in Hämopathien und dem Mammakarzinom durch eine fragile Stelle verursachten Amplifikationsbereichs auf 8p11-12 [Birnbaum, 2003; Garcia, 2005].

Die Expression von FGFR1 ist im Prostatakarzinom mit steigender Proliferation, schlechter Differenzierung und aggressivem Verhalten assoziiert [Giri, 1999; Devilard, 2006; Sahadevan, 2007]. Entsprechend wurde die Expression von FGFR1 in Prostatakarzinom- wie auch in

benignem Prostatahyperplasie-Gewebe erhöht gefunden. Dabei wird FGFR1 in Prostatagewebe nur als IIIc-Isoform exprimiert und kann FGF1, FGFR2, FGF8 und FGF17 binden [Sahadevan, 2007].

1.6.4 MSR1 (Macrophage Scavenger Receptor 1 Gene)

Das MSR1-Gen auf 8p22 wird zurzeit als Kandidatengen für das hereditäre Prostatakarzinom gehandelt, weil Variationen des Gens in der Keimbahn in verschiedenen Arbeiten mit der erblichen, aber auch der sporadischen Form des Prostatakarzinoms in Verbindung gebracht wurden [Hsing, 2007]. Ferner wird dem Protein eine Funktion bei der Genese entzündlicher Erkrankungen der Prostata zugeschrieben [Carpten, 2002; Xu, 2002; Xu, 2003]. Das MSR1 Gen kodiert ein Rezeptor-Membranprotein mit sechs strukturell unterschiedlichen Domänen. Funktionelle Studien haben gezeigt, dass der Rezeptor an eine große Gruppe von Liganden binden kann. Dabei ist seine Funktion in vivo immer noch ungeklärt. Man geht davon aus, dass der Rezeptor bei der Erkennung und Beseitigung von fremden pathogenen Substanzen und beschädigten oder apoptotischen Zellen eine Rolle spielt [Lindmark, 2004].

1.6.5 ANGPT2 (Angiopoietin 2 Gene)

Angiopoietin 1 und sein Antagonist Angiopoietin 2 sind Liganden des TIE-2-Rezeptors, der auf endothelialen Zellen exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Liganden zusammen mit VEGF (vascular endothelial growth factor) eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen. Während ANGPT1 bestehende Gefäße über Interaktion von Endothel und extrazellulärer Matrix stabilisiert und instand hält, antagonisiert ANGPT2 über kompetitive Bindung an TIE-2 diese Wirkung und führt so zu einer allgemeinen Destabilisierung der Gefäße. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Wirkung von ANGPT2 unter Anwesenheit von VEGF in eine proangiogenetische umgewandelt wird. Man kann also sagen, dass die Angiogenese durch eine dynamische Balance zwischen Regression und Wachstum, vermittelt durch ANGPT1, ANGPT2 und VEGF, kontrolliert wird [Caine, 2003]. In einer anderen Arbeit konnte eine erhöhte ANGPT2 Expression in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen nachgewiesen werden. Ferner bestand eine signifikante Korrelation zu Gefäßdichte, Metastasierungsrate und karzinomspezifischer Überlebensrate [Lind, 2005].

Da die Angiogenese bei der Versorgung von (schnell) wachsenden Geweben über die Versorgung mit unter anderem Nährstoffen und Sauerstoff eine entscheidende Rolle spielt, wird ANGPT2 bei der Initiation und Progression maligner Tumoren besondere Bedeutung zugemessen.

1.6.6 PPP2CB (Protein Phosphatase 2, Catalytic Subunit, Beta Isoform)

PP2A ist ein Mitglied der Familie der serin-/threoninspezifischen Proteinphosphatasen, welche auch PP1, PP2B (oder Calcineurin), PP2C, PP3, PP4, PP5, PP6, PP7 und andere Phosphatasen enthält [Schonthal, 2001].

PP2A ist ein trimere Komplex, der aus einer strukturellen A-, einer regulatorischen B- und einer katalytischen C-Untereinheit besteht. Dabei hat jede Untereinheit eine andere Funktion: Die A-Untereinheit scheint vornehmlich eine Art Gerüstfunktion zu haben, welche dazu dient, die anderen Untereinheiten zu einem Holoenzym zu versammeln. Untereinheit B agiert als Zielmodul, welches das Enzym zu verschiedenen intrazellulären Orten lenkt und außerdem im Einzelnen die Substratspezifität vermittelt. Die in dieser Arbeit untersuchte C-Untereinheit ist für die enzymatische Aktivität verantwortlich und besitzt die Funktion eines Katalysators. Alle diese Untereinheiten existieren in unterschiedlichen Isoformen, so dass das ABC-Holoenzym in einer großen Variabilität auftreten kann (siehe auch *Abbildung 4.1.1-1*). So kommt die A- und C-Untereinheit in je zwei Isoformen – α und β – vor, wohingegen die B-Untereinheit vier separate Familien – B, B', B'', B''' - umfasst. Jede dieser Familien besteht wiederum aus verschiedenen Mitgliedern, von denen alle in der Lage sind mit der A-Untereinheit ein bestimmtes ABC-Holoenzym zu bilden. Alles in allem können so über 72 verschiedene trimere ABC-Holoenzyme gebildet werden. Dabei werden die A- und C-Untereinheiten ubiquitär in allen Zellen exprimiert, während einige B-Untereinheiten gewebespezifisch sind beziehungsweise nur während bestimmter Entwicklungsstufen vorkommen [Schonthal, 2001].

PP2A ist ein zum größten Teil in löslicher Form vorkommendes Enzym, wobei die Hauptlokalisationen im Zytosol und im Nukleolus zu finden sind. Zusätzlich findet man PP2A aber auch im Mitochondrium, im Zytoskelett und im Membrankompartimenten [Zolnierowicz, 2000].

Neben den vielen strukturellen Varianten gibt es noch zahlreiche kovalente Modifikationen und andere Mechanismen, die zur Regulation der Enzymaktivität, Substratspezifität, Untereinheiten-

Anordnung und subzellulären Lokalisation von PP2A beitragen. So konnte gezeigt werden, dass reversible Phosphorylierung beziehungsweise Methylierung der C-Untereinheit starke Auswirkungen auf die PP2A-Aktivität haben. Dabei beeinflusst die Methylierung anscheinend nicht die Enzymaktivität, sondern fördert die Konversion dimerer in trimere Formen der Phosphatase. Reversible Phosphorylierung scheint dagegen die PP2A-Aktivität zu hemmen [Zolnierowicz, 2000]. Neben zellulären Hemmstoffen (I_1^{PP2A} , I_2^{PP2A}) existiert eine Vielzahl von exogenen Inhibitoren, allen voran Okadaic-Säure, Cytostatin und Microcystin.

Betrachtet man die Komplexität des PP2A-Aufbaus, so verwundert es nicht, dass dieses Enzym in eine Vielzahl von zellulären Funktionen verwickelt ist, wie Metabolismus, Transkription und Translation, RNA-Spleißen und DNA-Replikation, Entwicklung und Morphogenese, wie auch Zell-Zyklus-Progression und Transformation. Wenig ist allerdings darüber bekannt, wie all diese regulatorischen Kräfte letztlich zu den unterschiedlichen Funktionen von PP2A beitragen und zusammenwirken.

Lange Zeit wurde PP2A als klassisches Tumorsuppressor-Gen beschrieben. Diese Rolle von PP2A hat sich aber als wesentlich differenzierter herausgestellt, so dass diese simplifizierte Darstellung nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

Ausgehend von der inhibitorischen Wirkung der Tumorpromotoren Okadaic-Säure und Phorbolestern auf die Phosphatase, ging man von PP2A als eines negativen Regulators des Zellwachstums (eventuell sogar als Tumorsuppressor) aus.

Des Weiteren konnte PP2A eine negativ-regulatorische Eigenschaft im MAP-Kinase-Signalweg und somit ein negativer Einfluss auf das Zellwachstum nachgewiesen werden [Schonthal, 2001]. Allgemein werden die meisten (Protein-) Kinasen, die PP2A als Substrat dienen, inaktiviert, allerdings existieren einige Ausnahmen. So fördert PP2A interessanterweise die Funktion von RAF-1, einem Onko-Protein relativ weit am Beginn des MAP-Kinase Pfads. Weiter konnte PP2A eine stimulierende Funktion in von Glykoproteinen der WNT-Familie (Regulation von Zellwachstum, Zellpolarität, Gewebespezifität) initiierten Signaltransduktionswegen nachgewiesen werden. Ferner scheint Dephosphorylierung durch PP2A bei der Initiation von eukaryoter DNA-Replikation einen essentiellen Schritt darzustellen.

Entgegen der gut etablierten negativen Rolle von PP2A während der G2/M-Transition, scheint die PP2A-Aktivität für Zellen notwendig, um die frühen Phasen des Zellzyklus zu durchlaufen (Stimulierung von G1-spezifischen cyclin-abhängigen Kinasen) und schließlich in die S-Phase zu

gelangen [Schonthal, 2001]. So sterben Knockout-Mäuse ohne die katalytische α -Untereinheit von PP2A noch im Uterus.

PP2A hat somit neben seinen negativen Einflüssen durchaus auch positive, bisweilen auch paradox erscheinende, Einflüsse auf zelluläre Funktionen.

Obwohl noch nicht bestätigt, können die verschiedenen Rollen von PP2A wahrscheinlich bestimmten Mitgliedern der großen Holoenzymfamilie zugeschrieben werden. Und obwohl die Rolle von PP2A als eine bedeutende Komponente von Signaltransduktion und Zellwachstum evident ist, bleibt noch völlig unklar, welches Holoenzym welchen Aspekt des Funktionsspektrums reguliert. Das in dieser Arbeit, in Bezug auf das Prostatakarzinom, untersuchte Enzym - PPP2CB - wird als Kandidat für ein 8p-Tumorsuppressor-Gen behandelt [Eydmann, 1997].

1.6.7 PPP3CC (Protein Phosphatase 3, Catalytic Subunit, Gamma isoform)

PPP3CC kodiert für die katalytische γ -Untereinheit (CNA γ) von Calcineurin (PP2B) und liegt auf Chromosom 8p21.3. Es gibt vier Calcineurin Untereinheiten (PPP3R1, PPP3CA, PPP3CC, PPP3CB), deren genaue Funktionen noch unbekannt sind, wobei bei Veränderungen im PPP3CC-Genbereich eine Anfälligkeit zur Entwicklung einer Schizophrenie nachgewiesen werden konnte [Gerber, 2003].

Calcineurin (PPase-B) selbst gehört zur Familie der Serin-Threonin-Phosphatasen (PPase) [Wang, 1999]. Das Enzym spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie T-Zell-Aktivierung, Ca²⁺-induzierte Apoptose, Endozytose von synaptischen Vesikeln, Muskelentwicklung und bei der Hypertrophie von Skelett- und Herzmuskulatur [Biswas, 2003; Aramburu, 2004]. Diese unterschiedlichen Funktionen bewirkt Calcineurin durch die Dephosphorylierung von Schlüsselproteinen der jeweiligen Signalwege [Crabtree, 1999]. Klassische Beispiele sind die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFATc während der Ca²⁺-induzierten Apoptose [Tombal, 2000], die Dephosphorylierung und somit Inaktivierung von I κ B β und subsequence Aktivierung von NF κ B/REL-Faktoren im mitochondrialen Stress-Signalweg [Biswas, 2003], die Dephosphorylierung von BAD – einem proapoptischen Mitglied der BCL-2-Familie – als einen wichtigen Schritt während der Ca²⁺-induzierten Apoptose, auch in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 [Wang, 1999]. Auf der anderen Seite soll Calcineurin auch antiapoptotische Funktionen, insbesondere in

Kardiomyozyten, ausüben [Baines, 2005]. Zusammenfassend ist das pro- beziehungsweise antiapoptotische Potential von Calcineurin in Abhängigkeit von zelltyp-spezifischen Regulationsmechanismen und Parallelpfadwegen nur ungenügend untersucht.

1.6.8 TRAIL-Rezeptoren (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptors)

Es existieren verschiedene Liganden, die über Todesrezeptoren an der Zelloberfläche den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten können. Dieser verläuft über den extrinsischen Signalweg (p53-unabhängig), während der intrinsische auf mitochondrialer Ebene über DNA-Schäden, Defekte im Zellzyklus, Hypoxie und andere aktiviert wird. Über verschiedene Stufen münden die beiden Signalwege schließlich in die Aktivierung bestimmter Caspasen (Caspasen 8 und 9) und somit der Apoptose [Ashkenazi, 2002].

Die Todesrezeptoren binden Liganden der TNF-Superfamilie (Tumor-Nekrosis-Faktor). Das wohl komplexeste Beispiel ist TRAIL (auch APO2L), der an fünf verschiedene Rezeptoren der TNFRSF (Tumor Necrosis Faktor Receptor Super Family) binden kann. Diese fünf Rezeptoren sind Gegenstand der folgenden Expressionsanalyse und sollen hier zusammenfassend kurz dargestellt werden.

Dabei werden zunächst echte Todesrezeptoren (DR4, DR5) von sogenannten Decoy-Rezeptoren (DcR1, DcR2, OPG) unterschieden, welche nicht in der Lage sind die Apoptosesignalkaskade zu starten. Alle fünf Rezeptoren streiten in kompetitiver Weise um die Bindung mit TRAIL, wobei die Rolle von OPG, welches als einziger Rezeptor in einer löslichen, nichtmembrangebundenen Form vorliegt, fraglich ist, da seine Affinität zu TRAIL unter physiologischen Bedingungen sehr gering zu sein scheint [Truneh, 2000].

Über das teilweise gegensätzliche Zusammenspiel dieser pro- und antiapoptotischen Rezeptoren induziert TRAIL den programmierten Zelltod in vielen Zelllinien menschlicher Tumoren von Kolon, Lunge, Brust, Prostata, Pankreas, Niere und anderen [Ashkenazi, 1999; Keane, 1999; Mizutani, 1999; Walczak, 1999; Yu, 2000], während normale menschliche Zellen, wie Epithel-, Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen, gegenüber TRAIL unempfindlich zu sein scheinen [Ashkenazi, 1999; Lawrence, 2001].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die zunehmende Nutzung des PSA-Screenings hat zur Identifikation einer wachsenden Zahl asymptomatischer, niedrig-gradiger Tumoren bei relativ jungen Männern geführt [Farkas, 1998; Han, 2001]. Trotz dieser Verbesserungen ist es bisher nicht gelungen auf dem Gebiet der Therapie, insbesondere beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom, entscheidende Fortschritte zu machen und die Mortalitätsrate des Prostatakarzinoms ist nur leicht gesunken.

Dies hängt vor allem mit der extremen klinischen und biologischen Heterogenität des Prostatakarzinoms zusammen, welche die Unterscheidung von aggressiven Tumoren, die nach einer radikalen Therapie verlangen, von solchen, die langsam wachsen, wenig Beschwerden machen und eher einer konservativen Therapie bedürfen, extrem schwierig macht. Deshalb besitzt die Anwendung prognostischer Marker, die in der Tumormedizin generell wichtig ist, beim Prostatakarzinom eine besondere Relevanz.

Die momentan gebräuchlichsten prognostischen Marker wie Stage (TNM-System), Grade (Gleason-Grad) und Serum-PSA sind allerdings, bezogen auf diese Entscheidungsfindung, fehlerhaft [Stamey, 2001; Thompson, 2004]. Die genaue Abschätzung des individuellen klinischen Verlaufs wird somit kaum erleichtert und viele Männer müssen sich deswegen unnötigerweise diagnostischen Methoden unterziehen, die nicht nur physischen und psychischen Stress, sondern auch unnötige Kosten verursachen.

Die Entwicklung verbesserter prognostischer Marker wird durch das immer noch lückenhafte Wissen über die molekularen Grundlagen dieser Erkrankung erheblich behindert. Dabei existieren wenige Veränderungen, die in der Mehrheit der Prostatakarzinome nachgewiesen werden können. Zu diesen gehören wiederkehrende chromosomale Aberrationen. Chromosom 8 ist überdurchschnittlich häufig von genetischen Verlusten, wie auch von Zugewinnen betroffen. Trotz intensiver Forschungsarbeit ist es jedoch bislang nicht gelungen in diesem Genomabschnitt Tumorgene zu identifizieren, die maßgeblich und vor allem reproduzierbar an der Tumorgenese des Prostatakarzinoms beteiligt sind. Neben der Vielzahl von Genen, die auf Chromosom 8 liegen, erschwert der häufig nicht direkte Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen und deren Auswirkungen auf RNA- und Proteinebene die Suche nach relevanten Genen.

Ausgehend von den beschriebenen genetischen Veränderungen, sollen hier, mit Fokus auf Chromosom 8p, die oben vorgestellten Gene im Kontext der Tumorgenese des Prostatakarzinoms untersucht werden. Dabei wurde im Wesentlichen parallel nach Veränderungen auf genetischer

Ebene (LOH-Analyse) gesucht um anschließend die Auswirkungen der gefundenen Daten auf die Expression der Kandidatengene (Expressions-Analyse) zu analysieren.

Über diesen simultanen Ansatz erhofften wir uns zum einen Aufschluss über die Zusammenhänge der zum Teil komplexen molekularen Veränderungen im Prostatakarzinom, zum anderen die Identifizierung von pathogenetisch relevanten Tumorgenen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Gewebeproben

Die für die Isolation von DNA und RNA verwendeten Prostatakarzinom- sowie Normalgewebeproben wurden aus der Gewebebank der Urologischen Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf, bereitgestellt. Die Einwilligung der Patienten wurde mittels Formblatt routinemäßig eingeholt, und die Ethikkommission hat über die entsprechenden Projekte positiv entschieden. Alle Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Begutachtung durch einen Pathologen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Eine Auflistung der verwendeten Gewebeproben mit entsprechendem pathologischem Befund gibt die nachfolgende Tabelle.

Tabelle 2.1-1: Auflistung aller verwendeter Tumorproben, Probennummer, TNM-Status, R-Resektionsränder, G-Gleasonsumme.

Proben-Nr.	Gewebeart	DNA	RNA	Alter	T	N	M	R	G
36	pTu	nein	ja	72	pT3b	N0	M0	R2	7
38	pTu	nein	ja	75	pT2b	N0	M0	R0	7
50	pTu	nein	ja	67	pT3b	N1	M0	R1	7
63	pTu	ja	nein	67	pT2b	N0	M0	R0	7
65	pTu	ja	ja	62	pT3b	N0	M0	R0	7
70	pTu	ja	nein	66	pT2b	N0	M0	R1	7
74	pTu	ja	nein	54	pT3a	N0	M0	R1	5
76	pTu	ja	nein	79	pT3b	N0	M0	R1	7
78	pTu	ja	nein	69	pT2b	N0	M0	R0	8
80	pTu	ja	nein	66	pT3a	N0	M0	R1	8
83	pTu	ja	ja	76	pT3b	N0	M0	R1	7
89	pTu	ja	ja	68	pT2b	N0	M0	R1	3
91	pTu	ja	nein	61	pT3b	N1	M0	R1	9
93	pTu	ja	ja	73	pT3b	N0	M0	R0	7
95	pTu	ja	ja	74	pT3b	N1	M0	R1	10
97	pTu	nein	ja	71	pT3a	N0	M0	R1	7
99	pTu	ja	ja	67	pT2b	N0	M0	R1	5
105	pTu	ja	ja	59	pT3a	N0	M0	R0	5

Proben-Nr.	Gewebeart	DNA	RNA	Alter	T	N	M	R	G
107	pTu	ja	ja	59	pT3a	N0	M0	R1	7
109	pTu	ja	nein	68	pT3a	N1	M0	R0	9
111	pTu	ja	nein	72	pT2b	N0	M0	R0	7
117	pTu	ja	ja	68	pT3b	N0	M0	R1	5
121	pTu	ja	ja	65	pT2b	N0	M0	R1	6
127	pTu	ja	ja	71	pT2b	N0	M0	R1	6
133	pTu	ja	ja	72	pT2b	N1	M0	R1	7
137	pTu	nein	ja	73	pT2b	N0	M0	R1	8
139	pTu	ja	ja	65	pT3b	N1	M0	R1	9
141	pTu	ja	ja	69	pT2b	N0	M0	R1	4
143	pTu	ja	nein	66	pT3b	N0	M0	R1	8
145	pTu	ja	ja	70	pT4	N1	M0	R1	7
147	pTu	ja	nein	70	pT2b	N0	M0	R0	5
151	pTu	ja	nein	70	pT3a	N0	M0	R1	7
153	pTu	ja	nein	74	pT3a	N0	M0	R1	5
155	pTu	ja	nein	55	pT3a	N0	M0	R0	5
159	pTu	ja	ja	66	pT3a	N0	M0	R1	5
161	pTu	nein	ja	64	pT2b	N0	M0	R0	5
163	pTu	nein	ja	65	pT3a	N1	M0	R0	5
169	pTu	nein	ja	72	pT3a	N0	M0	R1	7
171	pTu	nein	ja	61	pT2b	N0	M0	R0	5
175	pTu	nein	ja	73	pT2b	N0	M0	R1	8
183	pTu	nein	ja	67	pT3a	N0	M0	R0	6
187	pTu	nein	ja	68	pT2b	N0	M0	R0	8
189	pTu	nein	ja	63	pT2b	N0	M0	R0	7
191	pTu	ja	ja	72	pT2b	N0	M0	R1	7
197	pTu	ja	nein	63	pT3b	N1	M0	R1	8
199	pTu	ja	nein	68	pT2b	N0	M0	R0	3
205	pTu	ja	ja	73	pT3a	N0	M0	R1	7
207	pTu	ja	nein	58	pT3b	N0	M0	R0	8
209	pTu	nein	ja	71	pT3a	N0	M0	R1	7
213	pTu	ja	ja	59	pT2a	N0	M0	R0	7
215	pTu	ja	ja	58	pT3a	N0	M0	R1	7
217	pTu	ja	ja	62	pT2b	N0	M0	R0	8
219	pTu	ja	ja	64	pT4	N1	M0	R1	7

Proben-Nr.	Gewebeart	DNA	RNA	Alter	T	N	M	R	G
221	pTu	ja	ja	59	pT3b	N1	M0	R1	9
225	pTu	ja	ja	62	pT3b	N0	M0	R0	6
227	pTu	ja	ja	72	pT2a	N1	M0	R0	7
230	pTu	ja	ja	68	pT2a	N0	M0	R0	7
232	pTu	ja	ja	70	pT2b	N1	M0	R0	7
236	pTu	ja	ja	74	pT3a	N0	M0	R1	7
238	pTu	ja	ja	62	pT2a	N0	M0	R1	6
243	pTu	ja	nein	46	pT2b	N0	M0	R0	8
245	pTu	ja	ja	66	pT3a	N0	M0	R0	7
247	pTu	nein	ja	55	pT3b	N1	M0	R1	7
253	pTu	ja	ja	61	pT3a	N1	M0	R1	7
254	pTu	ja	nein	58	pT2a	N0	M0	R0	6
256	pTu	ja	ja	71	pT3b	N0	M0	R0	7

Um ausreichende Mengen RNA und DNA für mehrere Messreihen zu gewinnen, wurde kein mikrodissektiertes Gewebe verwendet. Prostata-Normalproben wurden aus benignem Prostatahyperplasie-Gewebe beziehungsweise nach ihrer makroskopischen und mikroskopischen Morphologie aus tumortragenden Prostatae gewonnen. Dabei wurden nur Normalproben ohne Zeichen der GSTP1- und RARB2-Hypermethylierung in die Expressions- und Methylierungsanalysen eingeschlossen.

51 Tumorproben, für die zusätzlich DNA von Blutleukozyten vorhanden war, wurden in der LOH-Analyse auf allelische Imbalancen untersucht. Die klinisch-pathologischen Daten waren wie folgt: 21 pT2, 28 pT3, 2 pT4 Tumoren, 16 mit Gleason-Summen < 7 , 23 = 7 und 12 > 7 .

Zwölf Tumorproben waren Lymphknoten-positiv. Dreizehn der Patienten erlitten ein Krankheitsrezidiv, definiert über zwei aufeinanderfolgende PSA-Werte über 0,2 ng/ml.

Die Expressionsanalyse wurde mit 45 Tumor- und 13 Normalgewebeproben durchgeführt, außer für CSMD1 (hier fehlten zwei Tumorproben) und DLC1/FGFR1 (hier waren nur 10 Normalproben vorhanden). Die klinisch-pathologischen Daten der Überlappungsgruppe waren wie folgt: 20 pT2, 23 pT3, 2 pT4 Tumoren, 13 mit Gleason-Score < 7 , 26 = 7 und 6 > 7 . Elf Tumorproben waren Lymphknoten-positiv. Zehn Patienten dieser Gruppe erlitten ein

Krankheitsrezidiv. Für die Microarrayanalyse standen 22 Prostatatumorproben und 6 Prostatanormalgewebeproben zur Verfügung. Die mittlere Follow-Up-Periode war 66 Monate.

2.2 Chemikalien

Tabelle 2.2-1: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Firma	Firmensitz/Bezugsquelle
6 x Loading Dye Solution	MBI Fermentas	St.-Leon-Rot
20x Assay-on-Demand Gene Expression Assay Mix	Applied Biosystems	Foster City, California, USA
Agarose	SIGMA-Aldrich	Steinheim
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas	St.-Leon-Rot
dNTP-Mix	PeqLab	Erlangen
Fötale Kälberserum	Seromed Biochrom	Deisenhofen
Formamid	Merck	Darmstadt
Oligo (dT15)	Roche	Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin
Primer	MWG-Biotech	Ebersdorf
Random Primer	Roche	Mannheim
SequaGel Ultra Pure 25 %	National Dianostics Inc.	Atlanta, USA
Size Standard IRDye TM 800	LI-COR	Lincoln, USA
Stop Loading Buffer	Amersham Pharmacia	Freiburg
TBE/TAE	Eppendorf	Hamburg
TRAIL (primäres His-TRAIL)	Als freundliche Leihgabe von PD Dr. Reiner Jänicke, Institut für Molekulare Medizin, Heinrich Heine Universität Düsseldorf	
Trypsin/EDTA	Biochrom	Berlin
Zellkulturmedien	Bibco BRL	Paisley, Scotland

Alle weiteren Chemikalien wurden über die Firma Merck (Darmstadt) und SIGMA-Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

2.3 Enzyme

Tabelle 2.3-1: Auflistung der verwendeten Enzyme und Enzym-Mixe

Enzym	Firma	Firmensitz/Bezugsquelle
FastStart Taq DNA Polymerase (enthalten im LighCycler FastSart DNA MasterPlus SYBR Green I Kit)	Roche	Mannheim
HotStartTaq-DNA-Polymerase	QIAGEN	Hilden
HotStartTaq-DNA-Polymerase (enthalten im TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (2x))	Applied Biosystems, manufactured by Roche	Mannheim
Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas	St.-Leon-Rot
SuperskriptII-Reverse Transkriptase	Invitrogen	California, USA

2.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.4.1 Standardlösungen

Ethidiumbromid-Lösung:

0,5 mg/l Ethidiumbromid

dH₂O

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8

1 mM EDTA pH 8

2.4.2 Lösungen für Polyacrylamidgele

LI-COR-Gel (6%):

8,5 µl SequaGel ultra pure 25%

7 ml 5x TBE

16,8 ml 10M Harnstoff

ad 35 ml dH₂O

240 µl 10% Ammoniumpersulfatlösung

24 µl TEMED

2.5 Molekularbiologische Kits

Tabelle 2.5-1: Verwendete molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Firma	Firmensitz/Bezugsquelle
CellTiter Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Promega	Mannheim
Caspase-Glo [®] 3/7 Assay	Promega	Mannheim
CpGenome [™] DNA Modifikation Kit	Q-Biogene	Heidelberg

2.6 Spezielle Materialien und Geräte

Tabelle 2.6-1: Auflistung spezieller Materialien und Geräte

Material / Gerät	Firma	Firmensitz/Bezugsquelle
LI-COR-Sequencer 4200	LI-COR Inc.	USA
	Über MWG-Biotech GmbH	Ebersberg
ABIPrism 7900	Applied Biosystems	Foster City, California, USA
LightCycler	Roche	Mannheim
T3 Thermocycler	Biometra	Göttingen
TRIO Thermoblock	Biometra	Göttingen
Wallac Victor ² 1420 multilabel counter	Wallac	Turku, Finland

2.7 Software

Tabelle 2.7-1: Auflistung der verwendeten Software

Programm	Firma	Firmensitz/Bezugsquelle
IrfanView 3.97	Irfan Skiljan	Wiener Neustadt, Austria, Europe
LightCycler Software v.3	Idaho Technology Inc., Roche Molecular Biochemicals	Salt Lake City, Utha, USA
ONE-Dscan 2.03	Scanalytics, CSP Inc	Billerica, Massachusetts, USA
Reference Manager 10	ISI ResearchSoft.	Philadelphia, USA
SDS 2.2	Applied Biosystems	Foster City, California, USA
SPSS 12.0	SPSS Inc.	München, Germany
Genesis v.1.2	TU Graz	Graz, Österreich

2.8 Oligonukleotidprimer

Die verwendeten Primer für die LOH-Analyse und die Expressionsanalyse am LightCycler wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die forward-Primer der Mikrosatellitenanalyse sind jeweils fluoreszenzmarkiert (IRD 800). Primer und Sonden für die Expressionsanalyse am ABI 7900 wurden über die Firma Applied Biosystems Inc. (ABI) bezogen. Hierbei handelt es sich um bereits voroptimierte PCR-Kits, sogenannte TaqMan Assay-on-Demand. Informationen über chromosomale Position, Art der Substitution etc. können einem Online-Katalog (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/abdirect/ab?cmd=ABGTKeywordSearch&catID=601267>) entnommen werden, wobei die Primersequenzen von ABI nicht angegeben werden.

Tabelle 2.8-1: Auflistung aller verwendeter Oligonukleotidprimer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	TM	Amplifikat	Verwendung	Referenz/4 Acc.Nr.
D8S262 fwd	AGCTCAAAAG CGAAGGTGAT	55.3°C	114-128 bp	LOH-Analyse	Z16637
D8S262 rev	GGCAACAAAG TGAGATCCTG	57.3°C	114-128 bp	LOH-Analyse	Z16637
D8S264 fwd	ACATCTGCGT CGTCTTCATA	55.3°C	121-145 bp	LOH-Analyse	Z16659
D8S264 rev	CCAACACCTG AGTCAGCATA	57.3°C	121-145 bp	LOH-Analyse	Z16659
D8S1825 fwd	GAGATGGGGTT TCTCTATGTTGC	60.6°C	127-143 bp	LOH-Analyse	Z51727
D8S1825 rev	TGGGATTTTCATT TTTAACCTGTG	55.3°C	127-143 bp	LOH-Analyse	Z51727
D8S1827 fwd	GACAGAATC ATGTGGCCTTT	55.3°C	154-164 bp	LOH-Analyse	Z50970
D8S1827 rev	TTTTGTAAAATG TAAAATTGGCTTT	51.5°C	154-164 bp	LOH-Analyse	Z50970

D8S1786 fwd	CGAAAGATTG AGACCCCAT	54.5°C	209-229 bp	LOH-Analyse	Z53742
D8S1786 rev	GTTTCCACA CCGAAGCC	55.2°C	209-229 bp	LOH-Analyse	Z53742
D8S1820 fwd	ATGATGCTG AGTCCCCA	53.7°C	185-207 bp	LOH-Analyse	Z51662
D8S1820 rev	CAGAGGGCT GATTTTATGC	56.0°C	185-207 bp	LOH-Analyse	Z51662
D8S283 fwd	ATTCATGTCT AGGCCATTGC	55.3°C	103-129 bp	LOH-Analyse	Z17076
D8S283 rev	AGATACAGATG TAGATCTCTCCG	58.9°C	103-129 bp	LOH-Analyse	Z17076
D8S1229 fwd	GGTCATTCAG GGAGCCATTC	59.4°C	137-151 bp	LOH-Analyse	Z52085
D8S1229 rev	CCATTATATTTCA CCAAGAGGTCGC	61.3°C	137-151 bp	LOH-Analyse	Z52085
D13S1312 fwd	TCTTCCAGAA TATATGGGA	53.2°C	106-144 bp	LOH-Analyse	Z51719
D13S1312 rev	AGCTGTAAAAGT GTTGTTTGATGT	56.4°C	106-144 bp	LOH-Analyse	Z51719
D13S165 fwd	GTTTCGCCA AGCCTGTT	52.8°C	183-195 bp	LOH-Analyse	Z16900
D13S165 rev	GTTGACAATAA AATACGCCACA	54.7°C	183-195 bp	LOH-Analyse	Z16900
D13S1309 fwd	TGATGCCC ACCTGAAT	49.2°C	111-123 bp	LOH-Analyse	Z51691
D13S1309 rev	ACAGACTA CGGGCCAC	54.3°C	111-123 bp	LOH-Analyse	Z51691
D13S1255 fwd	AGCTTCAGAAAGTT ACCTGTATATGT	58.1°C	159-179 bp	LOH-Analyse	Z53255
D13S1255 rev	CATCTGGGTG TAATGCATGT	59.3°C	159-179 bp	LOH-Analyse	Z53255
D13S170 fwd	TTGCACTGTGGAG ATAAACACATAG	59.7°C	113-137 bp	LOH-Analyse	Z17086
D13S170 rev	TCACATTGTCTTT TAAGGCAGGAG	59.3°C	113-137 bp	LOH-Analyse	Z17086
D13S159 fwd	AGGCTGTGAC TTTAGGCCA	57.3°C	168-203 bp	LOH-Analyse	Z16691
D13S159 rev	CCAGGCCACT TTTGATCTGT	57.3°C	168-203 bp	LOH-Analyse	Z16691
FGFR1 fwd	GGAGGATCGAG CTCACTCGTGG	65.8°C	421 bp	Expression FGFR1	Boget et al. 2001
FGFR1 rev	CGGAGAAGTAG GTGGTGTCAC	61.8°C	421 bp	Expression FGFR1	Boget et al. 2001
DLC1 fwd	GCTCCATCCTCT ACTCCAGTTCAG	64.4°C	421 bp	Expression DLC1	Eigendesign
DLC1 rev	GACTGGCAGTTA ATCTGTAGTGA	58.9°C	421 bp	Expression DLC1	Eigendesign
CSMD1ende fwd	ACAACCCGCC ACTCTAACTG	59.4°C	162 bp	Expression CSMD1	Eigendesign
CSMD1ende rev	TCTGCCTGGC CTTTAATTG	55.3°C	162 bp	Expression CSMD1	Eigendesign
ANGPT2 fwd	Assay Location: Exon 5-6	60.0°C	73 bp	Expression ANGPT2	ABI Assay- on-Demand
ANGPT2 rev	Assay Location: Exon 5-6	60.0°C	73 bp	Expression	ABI Assay-

				ANGPT2	on-Demand
PPP2CB fwd	Assay Location: Exon 3-4	60.0°C	125 bp	Expression PPP2CB	ABI Assay- on-Demand
PPP2CB rev	Assay Location: Exon 3-4	60.0°C	125 bp	Expression PPP2CB	ABI Assay- on-Demand
PPP3CC fwd	Assay Location: Exon 2-3	60.0°C	78 bp	Expression PPP3CC	ABI Assay- on-Demand
PPP3CC rev	Assay Location: Exon 2-3	60.0°C	78 bp	Expression PPP3CC	ABI Assay- on-Demand
MSR1 fwd	Assay Location: Exon 3-4	60.0°C	63 bp	Expression MSR1	ABI Assay- on-Demand
MSR1 rev	Assay Location: Exon 3-4	60.0°C	63 bp	Expression MSR1	ABI Assay- on-Demand
TRAILR1 / DR4 fwd	Assay Location: Exon 2-3	60.0°C	80 bp	Expression TRAILR1	ABI Assay- on-Demand
TRAILR1 / DR4 rev	Assay Location: Exon 2-3	60.0°C	80 bp	Expression TRAILR1	ABI Assay- on-Demand
TRAILR2 / DR5 fwd	Assay Location: Exon 2-3	60.0°C	103 bp	Expression TRAILR2	ABI Assay- on-Demand
TRAILR2 / DR5 rev	Assay Location: Exon 2-3	60.0°C	103 bp	Expression TRAILR2	ABI Assay- on-Demand
TRAILR3 / DcR1 fwd	Assay Location: Exon 4-5	60.0°C	81 bp	Expression TRAILR3	ABI Assay- on-Demand
TRAILR3 / DcR1 rev	Assay Location: Exon 4-5	60.0°C	81 bp	Expression TRAILR3	ABI Assay- on-Demand
TRAILR4 / Dc25 fwd	Assay Location: Exon 5-6	60.0°C	99 bp	Expression TRAILR4	ABI Assay- on-Demand
TRAILR4 / DcR2 rev	Assay Location: Exon 5-6	60.0°C	99 bp	Expression TRAILR4	ABI Assay- on-Demand
TRAILR5 / OPG fwd	Assay Location: Exon 1-2	60.0°C	95 bp	Expression TRAILR5	ABI Assay- on-Demand
TRAILR5 / OPG rev	Assay Location: Exon 1-2	60.0°C	95 bp	Expression TRAILR5	ABI Assay- on-Demand
DcR1.unmethy l. fwd.	GAATTTTTTTTATGTG TATGAAATTTAGTTAAT	54.9°C	136 bp	MS-PCR	Van Noesel et al 2002
DcR1.unmethy l. rev.	CCATCAAACAACCAAA ACA	50.3°C	136 bp	MS-PCR	Van Noesel et al 2002
DcR1.methyl. fwd.	TTACGCGTACGAATTTA GTTAAC	55.3°C	128 bp	MS-PCR	Van Noesel et al 2002
DcR1.methyl. rev.	CCATCAAACGACCGAA ACG	56.7°C	128 bp	MS-PCR	Van Noesel et al 2002
DcR2.unmethy l. fwd.	TTGGGGATAAAGTGTTT TGATT	52.8°C	145 bp	MS-PCR	Van Noesel et al 2002
DcR2.unmethy l. rev.	AAACCAACAACAAAAC CACA	51.2°C	145 bp	MS-PCR	Van Noesel et al 2002
DcR2.methyl. fwd.	GGGATAAAGCGTTTCG ATC	54.5°C	139 bp	MS-PCR	Van Noesel et al 2002
DcR2.methyl. rev.	CGACAACAAAACCGCG	51.7°C	139 bp	MS-PCR	Van Noesel et al 2002
DcR2 fwd	TGTTGTTTATAGTTTGG ATAGGAT	56.0°C	342 bp	Promotorhyper methylierung	Eigendesign
DcR2 rev	CTTTATCCCCAAAATCC CATA	56.0°C	342 bp	Promotorhyper methylierung	Eigendesign
M13 rev.	GGAAACAGCTATGACC ATG	53.2°C		Sequenzierung	BMFZ

2.9 Mikrosatelliten-Analyse von Chromosom 8p und 13q

2.9.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur exponentiellen Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte eingesetzt. Dabei wird die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, DNA zu duplizieren, ausgenutzt. Hierfür wird ein DNA-Strang mit einem freien 3'-OH-Ende benötigt. Dieser wird in einer PCR künstlich durch kurze DNA-Fragmente, sogenannte Oligonukleotide oder Primer zur Verfügung gestellt. Die beiden Primer (sense = forward und antisense = reverse) binden nach einem Denaturierungsschritt an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang (Primeranlagerung oder Annealing) und können dann von der Polymerase verlängert werden, so dass der zwischen ihnen befindliche DNA-Abschnitt verdoppelt wird. Denaturiert man anschließend die neu synthetisierte doppelsträngige DNA durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge, so können neue Primermoleküle binden und der Zyklus beginnt erneut.

2.9.2 Standardprotokoll

Ein Standard-Reaktionsansatz enthält 100 ng DNA, 1xPCR-Puffer, 150 µM dNTP-Mix, ca. 30 pmol Primer und 1U HotStartTaq DNA-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Die PCR-Bedingungen wurden auf dem Biometra T3 Thermocycler mit Deckelheizung wie folgt gewählt:

Tabelle 2.9.2-1: Temperaturprogramm der PCR der LOH-Analyse

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	95°C / 15 min		
35	94°C / 40 sec	55°C / 30 sec	72°C / 40 sec
1			72°C / 5 min

Die Temperatur der Primer-Anlagerung wurde 2-4°C unterhalb des T_m-Wertes der benutzten Primer-Paare gewählt. Die Dauer der Primerverlängerung hängt von der Länge des entstehenden PCR-Produktes ab, wobei ca. 1000 bp pro Minute amplifiziert werden können.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem automatisierten Infrarot-DNA-Elektrophoresesystem (LI-COR) in einem 6 %igen PAA-Gel.

2.9.3 Mikrosatellitenanalyse

Das menschliche Genom besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlich langen Di- oder Trinukleotidwiederholungen, sogenannten Mikrosatellitenmarkern. In dieser Arbeit fanden hochpolymorphe Dinukleotidrepeatmarker Verwendung, da die meisten Individuen heterozygot in Bezug auf ihre Repeatlänge sind. Nur selten liegen mehrere benachbarte Marker homozygot vor, so dass die Ergebnisse der Mikrosatelliten-Analyse als Indiz für einen Allelverlust/-zugewinn, oder allgemeiner für eine allelische Imbalance, gelten können.

Die in dieser PCR eingesetzten forward-Primer sind für die anschließende Analyse mit dem LI-COR-Automaten fluoreszenzmarkiert. Diese Markierung erfordert eine möglichst kurze Lichtexposition der Reaktionsansätze.

Um feststellen zu können, ob Abweichungen (allelische Imbalancen) im Tumorgewebe vorliegen, wurden jeweils Tumor- und Normalprobe eines Patienten nebeneinander auf das Polyacrylamidgel am LI-COR-Automaten aufgetragen. Somit stellten sich im Idealfall, das heißt bei Vorliegen von Heterozygotie für einen bestimmten Mikrosatellitenmarker bei einem Patienten, die beiden Allele aus Tumor- und Normalgewebe nebeneinander dar.

Des Weiteren wurde, zusätzlich zu 8p, immer ein Mikrosatellitenmarker von Chromosom 13q mitgeführt. Es entstanden also Mikrosatellitenmarker-Paare. Die beiden Primerpaare wurden immer in einer Duplex-PCR amplifiziert, wobei sich die Produktgröße so unterscheiden musste, das bei der anschließenden Gelelektrophorese keine Überlappungen auftreten konnten. So war es (1) möglich, die Allelintensität nicht nur zwischen den beiden Allelen eines Chromosomes aus Tumor- und Normalgewebe, sondern auch diese zwischen Allelen verschiedener Chromosomen einer Probe zu vergleichen. Dies war insbesondere wichtig um die aus dem Tumor-Normal-Vergleich hervorgehende zum Teil schwierige Auswertung zu vereinfachen und mögliche Fehler (vor allem Pipettierfehler, unterschiedliche DNA-Menge) zu erkennen. So konnten homozygote Deletionen, bei denen beide Allele ein schwaches oder gar kein Signal liefern, von schwachen Signalen durch methodische Artefakte (Problem bei der Amplifikation, eingesetzte DNA-Menge zu gering etc.) unterschieden werden. Außerdem war es (2) so möglich chromosomale

Veränderungen auf Chromosom 13q mit in die Analyse einzubeziehen. So dienten beide Chromosomen als Test und Kontrolle.

Da sich die beiden Primerpaare während der Duplex-PCR gegenseitig behindern können, mussten die PCRs für die jeweiligen Primerpaare so optimiert werden, dass entsprechend unterschiedliche Primerkonzentrationen in den Mastermix eingesetzt wurden.

Die Reaktionsansätze stellten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2.9.3-1: Reaktionsansatz des PCR-Mastermixes LOH-Analyse

Komponente	Endkonzentration
10xReaktionspuffer Qiagen	1x
Primer 1 fwd.	Siehe Tabelle rechts
Primer 1 rev.	Siehe Tabelle rechts
Primer 2 fwd.	Siehe Tabelle rechts
Primer 2 rev.	Siehe Tabelle rechts
dNTPs	150 µM
HotStartTaq DNA Polymerase	1 U
sH ₂ O	ad 48 µl

Tabelle 2.9.3-2: Primerkonzentratraktionen bei der Duplex-PCR

Primerpaar	Endkonzentration [nM]
283D8S / 1255D13S	440 / 160
1820D8S / 1255D13S	300 / 300
1786D8S / 1312D13S	400 / 400
165D8S / 170D13S	250 / 100
1827D8S / 1309D13S	200 / 400
264D8S / 159D13S	200 / 200
1825D8S / 165D13S	100 / 400
262D8S / 1229D13S	200 / 250

2.10 Reverse Transkription

Der Einsatz einer Reversen Transkriptase, einer viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, erlaubt die Transkription von RNA zu cDNA (complementary DNA). Es wurde die Superskript II Reverse Transkriptase des Herstellers Invitrogen verwendet. Je nach Verwendungszweck der herzustellenden cDNA wurden Oligo dT₁₅-Primer oder Random Primer verwendet. Die für mehrere Standard-PCRs eingesetzte cDNA wurde nach folgendem Schema hergestellt:

2 µg RNA aus Zelllinie oder Gewebe wurden mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8,5 µl gebracht. Ein erster Mastermix wurde pro Ansatz nach folgendem Schema angesetzt:

Tabelle 2.10-1: Reaktionsansatz des Mastermix I der Reversen Transkription

Komponente	Endkonzentration
Oligo dT15-Primer	500 ng
dNTPs	je 0,5 mM

Nach Zusatz von jeweils 3,5 µl Mastermix pro Probe folgte eine zehnminütige Inkubation bei 65°C (Denaturierung). Nach fünfminütiger Abkühlung der Proben auf Eis folgte die Zugabe von 7 µl des zweiten Mastermixes, welcher nach folgendem Schema angesetzt wurde:

Tabelle 2.10-2: Reaktionsansatz des Mastermix II der Reversen Transkription

Komponente	Endkonzentration
Reaktionspuffer	1x
DTT	0,1 mM
Ribonuclease Inhibitor	40 U

Im Anschluss fand eine zweiminütige Inkubation bei 42°C statt (Annealing), worauf jeder Probe 200 U (1 µl) der Superskript II Reverse Transkriptase zugesetzt wurde. Im Anschluss folgte dann eine Inkubation für 50 min auf 42°C, 15 min auf 70°C sowie Abkühlung auf 4°C.

Daraus ergibt sich folgendes Reaktionsprogramm:

Tabelle 2.10-3: Temperaturprogramm der Reversen Transkription

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	65°C / 5 min		
1		42°C / 2 min	
1			42°C / 50 min
1			70°C / 15 min

2.11 Quantitative Real-Time-PCR (QRT-PCR) mit SYBR Green-Detektion am LightCycler

Der wesentliche Unterschied zwischen Realtime und klassischer RT-PCR besteht darin, dass im Verlauf der Realtime-PCR nach jedem durchlaufenen Zyklus die entstandene Menge an Produkt

quantifiziert wird. Dies erlaubt das genaue Verfolgen des Amplifikationsverlaufs, der in Form einer sigmoiden Kurve grafisch vom Gerät dargestellt wird. Eine exakte Quantifizierung der Unterschiede in den mRNA Spiegeln ist möglich. Vorteilhaft gegenüber einer normalen RT-PCR ist weiterhin, dass diese Methode sehr empfindlich ist, nur ungefähr die halbe Laufzeit beansprucht und dass Gele, wenn überhaupt, nur zur Produktkontrolle angefertigt werden müssen.

Die hier verwendete Realtime-PCR-Maschine war der Light Cycler der Firma Roche (Mannheim). Die zur PCR notwendigen Reagenzien, darunter eine Taq Polymerase und ein DNA-interkalierender Farbstoff (SYBR Green), enthält ein auf den Light Cycler zugeschnittener Kit. Es handelt sich um einen „Hot Start“ Master Mix. Die Verwendung der „FastStart Taq Polymerase“, einer modifizierten Form der thermostabilen rekombinanten Taq-Polymerase, minimiert die Möglichkeit der Entstehung unspezifischer Amplifikationsprodukte, die das gewünschte Produkt verunreinigen. Bei Raumtemperatur ist sie inaktiv aufgrund hitzelabiler Schutzgruppen an einigen Aminosäureresten des Enzyms. Bei hoher Temperatur werden die Schutzgruppen abgespalten und so das Enzym aktiviert. Aus diesem Grund beginnt die Realtime-PCR mit einer 10-minütigen Maximaltemperatur von 95°C.

Der SYBR Green I Farbstoff ist spezifisch für doppelsträngige DNA. Bindet er an eine solche wird seine Fluoreszenz drastisch erhöht. Während jeder Phase der PCR, in der DNA synthetisiert wird, bindet SYBR Green I an die amplifizierten PCR-Produkte, die so aufgrund ihrer Fluoreszenz detektiert werden können (*Abbildung 2.11-1*). Der Anstieg der gemessenen Fluoreszenz mit jedem neuen PCR-Zyklus steht in direktem Verhältnis zur PCR-Produkt-Akkumulation. Über die Software wird die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl dargestellt. Der Verlauf der PCR lässt sich dabei in drei Phasen einteilen: in eine frühe Phase, eine exponentielle Wachstumsphase (Log-Phase) und eine Plateau-Phase. In der frühen Phase übertreffen Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produkts. Abhängig von der initialen Menge an Ziel-DNA im Reaktionsansatz heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts statistisch signifikant von denen des Hintergrunds ab. Diese Schwelle wird von der Software determiniert, und der so genannte Crossing Point (Cp) ist definiert als die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Schwelle überschreitet. Über die Crossing Points lassen sich so vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA machen.

Eine absolute Quantifizierung über externe Standards ist dabei nach folgenden Überlegungen möglich:

Die exponentielle Wachstumsphase oder log-linearen Phase der PCR ist mathematisch zu erfassen. Die Crossing Points verhalten sich dabei umgekehrt proportional zu dem Logarithmus der initial eingesetzten Kopienzahlen. Wird ein externer Standard als Verdünnungsreihe mit bekannten Ausgangskonzentrationen in die PCR eingesetzt, bestimmt die Software ebenfalls die Crossing Points der einzelnen Verdünnungen. Über die Darstellung der ermittelten Crossing Points (Cp) gegen die Kopienzahlen (T₀) der Verdünnungen erhält man eine Regressionsgerade (Standardkurve) mit der folgenden Gleichung: $Cp = -(1/\log E) \cdot \log T_0 + (\log K / \log E)$

(K) beschreibt die Kopienzahl am Crossing Point, die für alle Verdünnungen an diesem Punkt gleich ist. Die Amplifikationseffizienz (E) kann Werte zwischen ≥ 1 und ≤ 2 annehmen. Ein Wert von 2 entspricht der Verdopplung der cDNA pro PCR-Zyklus und damit der theoretisch besten Effizienz; ein Wert von 1 hingegen ist gleichbedeutend mit keiner Amplifikation. Die Effizienz ist unter anderem von der Ziel-cDNA abhängig. Da das Ausgangsmaterial dasselbe ist, liegen in den Verdünnungsreihen auch gleiche Amplifikationseffizienzen vor.

Die Quantifizierung von unbekannten Proben erfolgt nun durch Messen der Crossing Points (Cp). Diese werden dann über die Gleichung der Standardkurve von der Software in Ausgangskonzentrationen (T₀) umgerechnet. Unter Anwendung dieser Gleichung ist entscheidend, dass die Amplifikations-Effizienz der Standards und die der Proben zumindest ähnlich sein müssen. Zur Erhöhung der Spezifität der Primerbindung kann dem Reaktionsgemisch Magnesiumchlorid in einer Endkonzentration von 1-5 mM hinzugefügt werden. Die Auswertung der Amplifikation der Realtime PCR wird kombiniert mit einer Schmelzkurven-Analyse („Melting Curve“). Auf diese Weise erhält man Sicherheit über die Identität und Reinheit des Produktes. Zusätzlich kann an dieser Stelle zur Überprüfung ein Gel angefertigt werden. Dort sollte ein Produkt eine saubere Bande in einer seiner Größe entsprechenden Höhe aufweisen. Die Schmelzkurve sollte aus einem sauberen Peak pro Produkt bestehen, der den definierten Schmelzpunkt des jeweiligen Produktes darstellt. Ist mehr als ein Peak vorhanden, deutet dies auf eine Verunreinigung des gewünschten Endproduktes hin, das heißt während der PCR ist nicht nur der durch die Primer begrenzte Bereich des Zielgens amplifiziert worden, sondern es sind beispielsweise auch Primerdimere entstanden. Die Spezifität lässt sich erhöhen durch eine Zugabe von bis zu 10% DMSO zum Reaktionsansatz. Durch

DMSO werden die Basenpaar-Interaktionen geschwächt. Dies hat zur Folge, dass die Primer nur an die Sequenzen binden, zu denen sie die höchste Affinität aufweisen, somit wird die Spezifität der Primerbindung erhöht. Zugleich wird der Schmelzpunkt des Produktes erniedrigt, da die DNA-Stränge bei niedrigerer Temperatur voneinander getrennt werden. Die Phasen der Realtime-PCR während der Amplifikation entsprechen denen der klassischen PCR und bestehen aus Denaturierung, Annealing und DNA-Replikation (*Abbildung 2.11-1*). Die Dauer einer jeden ist jedoch weitaus geringer, sie liegt in einem Bereich zwischen 2 und 15 Sekunden (im Vergleich dazu bei der klassischen PCR ca. 0,5-2 min). Je Replikation von 25 Basenpaaren sollte ungefähr eine Sekunde Zeit veranschlagt werden. Vorweg geht dem Abschnitt Amplifikation eine 10-minütige Präinkubation bei 95°C, die wie oben erwähnt der Abspaltung der Schutzgruppen von der Taq-Polymerase dient. Nach erfolgter Amplifikation wird die Schmelzkurve erstellt. Hierzu wird ein Temperaturgradient von 95°C nach 65°C gefahren mit 1°C / 20sec. Als letztes kühlt die Maschine bei 40°C. Die Anzahl der Zyklen variiert je nach PCR in Abhängigkeit von der Zeit, in der das Amplifikationsmaximum erreicht wird, und liegt zwischen 35 und 45 Cyclen. Im Anschluss an die PCR werden der Amplifikationsverlauf sowie die Schmelzkurve, anhand der für jede Probe am Ende eines jeden Zyklus gemessenen Fluoreszenz, in Form einer sigmoiden Kurve dargestellt. Beim Design von Primern für die Realtime PCR ist zu beachten, dass ihre Größe möglichst zwischen 150 und 200 Nukleotiden liegt und sie, wenn möglich, Exon-überspannend sind, so dass bei eventueller Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA ein längeres, da intronenthaltendes Amplifikationsprodukt entstehen würde.

Zur Bestimmung der RNA-Menge, beziehungsweise der Expression, wurden jeweils zwei unabhängige PCRs pro Gen und Probe durchgeführt. Als Kontrolle, auf den die gemessenen Expressionswerte bezogen werden konnten, diente das Housekeeping-Gen TBP (Tata-Box Binding Protein), unter der Annahme, dass seine Expression in allen Zellen gleich ist. Weiterhin wurde zur Optimierung für jedes Gen eine Verdünnungsreihe angefertigt. Dazu wurde zunächst für jedes Gen eine passende Zelllinie ausgesucht, die eine ausreichende Genexpression für das entsprechende Gen aufwies. Daraufhin wurde eine Verdünnungsreihe (in der Regel pur, 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000) angefertigt und am Light Cycler gemessen und die Expressionswerte in einer Standardkurve verrechnet.

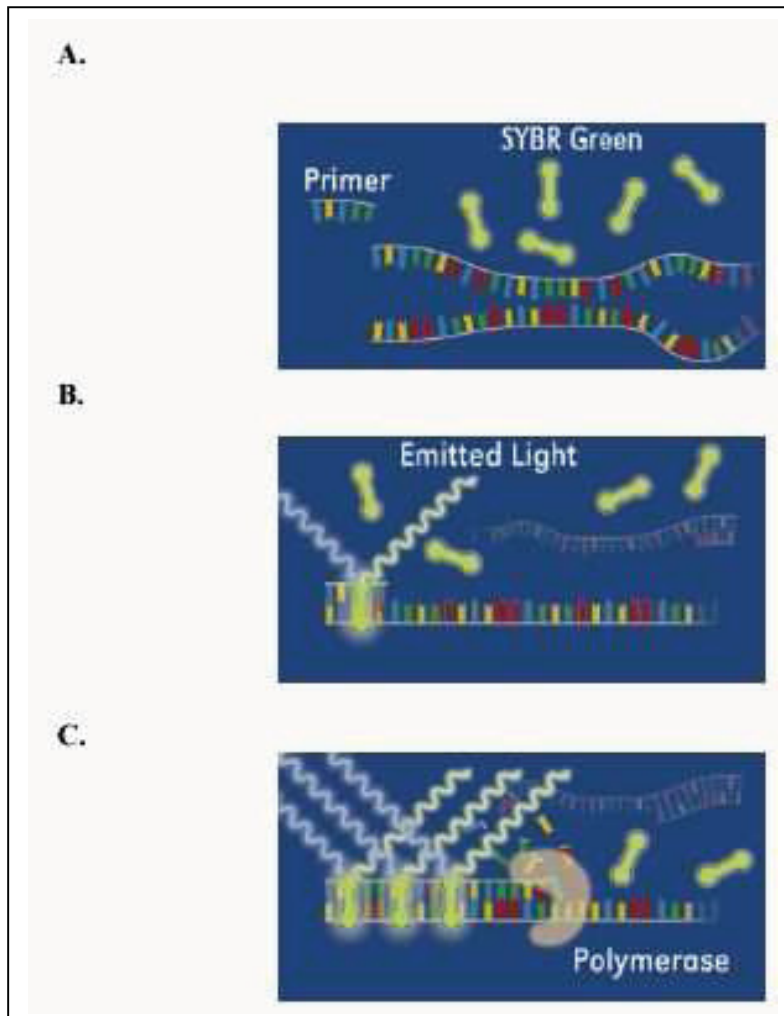


Abbildung 2.11-1: Schematische Darstellung der Abläufe bei der RT-PCR mit dem Farbstoff SYBR-Green.

Abb. A: Denaturierung. Auftrennung des DNA-Doppelstranges bei 95°C.

Abb. B: Annealing. Anlagerung der Primer an die entsprechenden DNA-Abschnitte bei spezifischer Annealingtemperatur des jeweiligen Primers. Der SYBR Green Farbstoff ist spezifisch für doppelsträngige DNA. Bindet er an eine solche wird seine Fluoreszenz drastisch erhöht.

Abb. C: DNA Replikation. Während jeder Phase der PCR, in der DNA synthetisiert wird, bindet SYBR Green I an die amplifizierte PCR-Produkte, die so aufgrund ihrer Fluoreszenz detektiert werden können.

Aus der Standardkurve zwischen den Expressionswerten und der logarithmischen Konzentration konnte so die Effizienz der PCRs bestimmt werden. Eine Doppelprobe einer Verdünnung der entsprechenden Zelllinie – und zwar optimaler Weise die Verdünnung, deren Expressionswert im Bereich der zu messenden Proben lag (in der Regel 1:10) – wurde dann in jedem Lauf mitgeführt. Am Ende des Laufes konnte dann die errechnete Standardkurve über die LightCycler-Software importiert, und somit Unregelmäßigkeiten (Pipettierfehler etc.) ausgeglichen werden.

Der Reaktionsansatz für den Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2.11-1: Reaktionsansatz des Mastermix LightCycler PCR

Komponente	Endkonzentration
Enzymmix	1 x
Primer forward	1 μ M
Primer revers	1 μ M
sH ₂ O	ad 8 bzw. 9 μ l
Formamid	3,33%

Der Enzymmix setzt sich zusammen aus den Reagenzien 1a und 1b des LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I Kits (Roche). 14 μ l des Reagenz 1a werden in das Reagenz 1b pipettiert. Der Enzymmix enthält dann FastStart Taq DNA Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix, SYBR Green I Farbstoff und MgCl₂. 3 μ l Formamid wurde nur für die PCR von CSMD1-Gen zugesetzt. Je nach PCR wurde außerdem 1 μ l 1:5 verdünnte (CSMD1, TBP) sowie 2 μ l 1:10 verdünnte cDNA eingesetzt. Es wurden 8 beziehungsweise 9 μ l des Mastermixes in vorgekühlte Glaskapillaren gegeben und 1 beziehungsweise 2 μ l cDNA hinzugefügt. Die Kapillaren wurden verschlossen, 30 sec bei 800g zentrifugiert und in den LightCycler eingesetzt. Die optimierten Temperaturprogramme für die untersuchten Gene verliefen wie folgt:

Tabelle 2.11-2: Temperaturprogramme für die drei am LightCycler untersuchten Gene, sowie TBP

	DLC1	FGFR1	CSMD1	TBP
Denaturierung	1 Zyklus	1 Zyklus	1 Zyklus	1 Zyklus
	95°C / 10 min	95°C / 10 min	95°C / 10 min	95°C / 10 min
Amplifikation	45 Zyklen	45 Zyklen	45 Zyklen	40 Zyklen
Denaturierung	95°C / 15 sec	95°C / 15 sec	95°C / 10 sec	95°C / 15 sec
Primer-Anlagerung	64°C / 15 sec	66°C / 5 sec	62°C / 5 sec	65°C / 5 sec
Primer-Verlängerung	72°C / 20 sec	72°C / 20 sec	72°C / 15 sec	72°C / 20 sec
Schmelzkurve	1 Zyklus	1 Zyklus	1 Zyklus	1 Zyklus
Denaturierung	95°C / 0 sec	99°C / 0 sec	95°C / 0 sec	99°C / 0 sec
Primer-Anlagerung	74°C / 20 sec	77°C / 20 sec	75°C / 20 sec	75°C / 20 sec
Schmelzen	95°C / 0 sec	99°C / 0 sec	95°C / 0 sec	99°C / 0 sec
Kühlung	1 Zyklus	1 Zyklus	1 Zyklus	1 Zyklus
	40°C / 30 sec	40°C / 30 sec	40°C / 30 sec	40°C / 30 sec

2.12 Quantitative Real-TimePCR (QRT-PCR) mit Taqman-Sonden

Diese Methode erlaubt es, den Verlauf einer PCR-Reaktion zu verfolgen und das gebildete Produkt relativ zu einem Standard zu quantifizieren. Nach HOLLAND und LIVAK [Holland, 1991; Livak, 1995] benötigt man neben den üblichen Oligonukleotidprimern für die Amplifikation ein beidseitig markiertes Oligonukleotid (Taqman-Sonde) für die Detektion des gebildeten Produkts. Diese Markierung besteht hier aus dem nicht fluoreszierenden 3'-gebundenen Quencher Minor Groove Binder (MGB, Applied Biosystems) und dem fluoreszierenden 5'- gebundenen 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), das als Reporter fungiert.

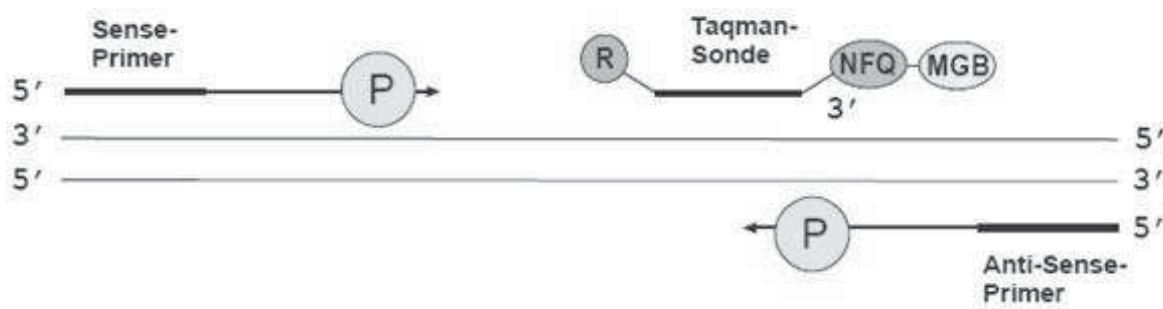


Abbildung 2.12-1: Anlagerung der Primer und der Taqmansonde während der PCR. Die Taqmansonde kann je nach Syntheserichtung entweder mit dem Plus-Strang ($5' \rightarrow 3'$) oder mit dem komplementären cDNA-Strang ($3' \rightarrow 5'$) hybridisieren. Solange die Sonde intakt ist, wird durch den nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) die Fluoreszenzstrahlung des Reporters (R) unterdrückt. P = DNA-Polymerase, MGB = Minor Groove Binder (verankert die Sonde in der kleinen Furche der DNA und erlaubt eine spezifische Anlagerung trotz geringer Sondenlänge, ca. 13-17 bp).

Wird die an die cDNA gebundene Sonde im Verlauf der DNA-Synthese durch die $5' \rightarrow 3'$ -Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase abgespalten, wird der Reporter in zunehmendem Maß freigesetzt und entfernt sich räumlich vom Quencher. Während der PCR-Reaktion werden die freien Reportermoleküle durch regelmäßige Lichteinstrahlung angeregt und geben ihrerseits Strahlung ab.

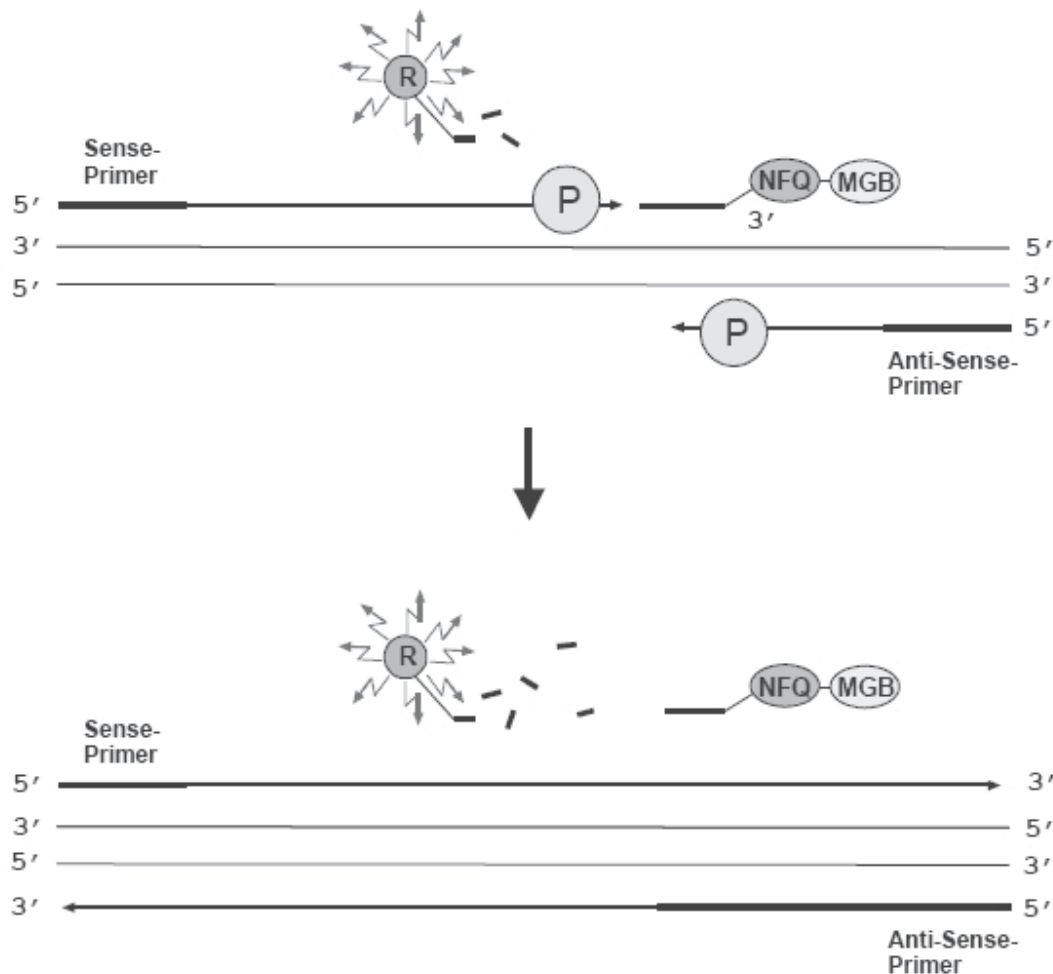


Abbildung 2.12-2: Abspaltung der Taqmansonde und cDNA-Synthese. Die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase führt zur Abspaltung der Sonde und Freisetzung des Reporters, der in räumlicher Entfernung vom Quencher bei Anregung Fluoreszenzstrahlung abgibt. Nur tatsächlich angelagerte Sondenmoleküle werden durch die Exonukleaseaktivität gespalten. Nach Abspaltung der Sonde wird die cDNA-Strangsynthese fortgesetzt. Dieser Prozeß läuft in jedem PCR-Zyklus ab und interferiert nicht mit der exponentiellen Produktzunahme.

Das Ansteigen des Fluoreszenzsignals korreliert in der exponentiellen Phase der PCR direkt mit der Zunahme des PCR-Produktes. Mittels der SDS 2.2 Software (ABI) lässt sich die Zykluszahl (CT-Wert) bestimmen, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Reaktionshintergrund abhebt. Führt man parallel zur eigentlichen Messung die gleiche Reaktion mit bekannten cDNA-Matrizenmengen durch (zum Beispiel mit Referenzplasmiden), erhält man eine Standardkurve mit CT-Werten, die einen Rückschluss auf die Produktmengen zulassen. Die Quantifizierung der Fluoreszenzänderung erfolgt über die Berechnung einer Standardkurve. Die Produktmenge wächst in der PCR exponentiell, erreicht jedoch irgendwann ein Plateau. Unter

idealen Bedingungen ergäbe sich für die Anzahl der amplifizierten Moleküle (N) folgende Gleichung: $N = N_0 \times 2^n$, wobei N_0 die Anzahl der Ausgangsmoleküle und n die Anzahl der Amplifikationszyklen beschreibt. Da die Reaktionseffizienz (E) durch Sequenz und Lage der Primer und der zu amplifizierenden Ziel-DNA sowie Verunreinigungen und die Prozessivität der Taq Polymerase beeinflusst wird, wird die Gleichung besser folgendermaßen formuliert: $N = N_0(1+E)^n$. Zur Erstellung einer Standardkurve wird diese Gleichung in ihre logarithmierte Form umgeschrieben: **$\log N = \log N_0 + n \log(1+E)$** .

Die für die Quantitative PCR am ABI-Prism 7900 benötigten Primer und Sonden wurden über Applied Biosystems Inc. (ABI) bezogen. Hierbei handelt es sich um bereits voroptimiertes PCR-Kits, sogenannte TaqMan Assay-on-Demand. Diese Assays sind komplett von ABI entworfen und benutzerfertig. Alle in dieser Arbeit verwendeten Assays laufen unter gleichen Temperaturprogrammen.

Zur Bestimmung der RNA-Menge, beziehungsweise der Expression, wurden jeweils zwei unabhängige PCRs pro Gen und Probe durchgeführt. Als Kontrolle, auf den die gemessenen Expressionswerte bezogen werden konnten, diente das Housekeeping-Gen TBP.

Weiterhin wurde zur Optimierung für jedes Gen eine Verdünnungsreihe angefertigt. Dazu wurde zunächst für jedes Gen eine passende Zelllinie ausgesucht, die eine ausreichende Genexpression für das entsprechende Gen aufwies. Daraufhin wurde eine Verdünnungsreihe (in der Regel pur, 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000) angefertigt, am ABI Prism 7900 gemessen und die Expressionswerte in einer Standardkurve verrechnet. Aus der Standardkurve zwischen den Expressionswerten und der logarithmischen Konzentration konnte so die Effizienz der PCRs bestimmt werden. Eine Doppelprobe einer Verdünnung der entsprechenden Zelllinie – und zwar optimaler Weise die Verdünnung, deren Expressionswert im Bereich der zu messenden Proben lag (in der Regel 1:10) – wurde dann in jedem Lauf mitgeführt. Der Reaktionsansatz für den Mastermix stellte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2.12-1: Reaktionsansatz des Mastermix des TaqMan-PCR

Komponente	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (2x)	1x
20x Assay-on-Demand Gene Expression Assay Mix	1x
sH ₂ O	ad 18 µl

Es wurden 2 µl einer 1:20 verdünnten cDNA pro Ansatz zugesetzt. Die Proben wurden auf 96 Well-Platten pipettiert, anschließend mit optischer Klebeschuttfolie der Firma ABI verschlossen und bei 15000 x g drei Minuten zentrifugiert. Zur Analyse wurden die 96 Well-Platte in das ABI Prism 7900 System überführt. Die optimierten Temperaturprogramme für die untersuchten Gene (ANGPT2, PPP2CB, PPP3CC, MSR1, TRAILR1-R4, OPG) verliefen wie folgt:

Tabelle 2.12-2: Temperaturprogramme der untersuchten Gene, sowie TBP

Denaturierung	1 Zyklus
	95°C / 10 min
Aplifikation	40/45 Zyklen
Denaturierung	95°C / 15 sec
Primer-Anlagerung Primer-Verlängerung	60°C / 1 min

Das ABI PRISM 7900 Sequence Detection System verfügt über einen eingebauten Thermocycler. Über den Reaktionsgefäßen der Microtiterplatte befindet sich eine Linse, die den Strahl eines Argon-Lasers (488 nm) in die Gefäße weiterleitet, wodurch eine Fluoreszenzanregung erfolgen kann. Die Fluoreszenzemission wird über denselben optischen Leiter gemessen.

2.13 Clusteranalyse mit Genesis

Die Software von GENESIS ist ein von der bioinformatischen Abteilung der TU Graz zur Verfügung gestelltes Werkzeug, um unter anderem hierarchische Clusteranalysen mit Array-Daten durchzuführen. Die dabei benutzten Algorithmen sind mit denen der 1998 von Eisen entwickelten Programme „Cluster“ und „Tree View“ vergleichbar [Eisen, 1998]. Alle hier dargestellten Analysen wurden mit der Programmversion GENESIS v1.2 unter Benutzung des Pearson Korrelationskoeffizienten als Distanzmatrix durchgeführt. Bei dieser Methode zur Untersuchung ähnlich regulierter Gene werden die relativen Änderungen der Expressionen zweier Datensets stärker bewertet als deren absolute Differenzen. Dadurch werden koregulierte Gene unabhängig von ihren absoluten Expressionsunterschieden aufgrund ihrer ähnlichen relativen Expressionsmuster ermittelt. Die Ergebnisse werden grafisch als hierarchische Cluster formiert, in denen die unterschiedlich starken Expressionsabweichungen jedes einzelnen Gens im Bezug zur Expression der jeweiligen Referenzbedingungen farblich kodiert dargestellt werden.

2.14 Microarray Expressionsanalyse und biostatistische Auswertung¹

RNA (jeweils 5µg) wurde vor der in vitro Transkription mit biotinierten dNTPS mittels GeneChip® Expression 3` Amplification One-Cycle Target Labeling Kit (Affymetrix, Santa Clara USA) zu cDNA konvertiert. Die resultierende biotinierte cRNA wurde fragmentiert und an den HG-U133A (Affimetrix) Microarrays nach Herstellerangaben biotiniert. Nach Hybridisierung wurden die Microarrays gewaschen, mit Streptavidin/Phycoerythrin-Konjugat und biotinierten Antikörpern gefärbt und nach Herstellerangaben mit einem Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 gescannt. Die Bilder wurden mittels GeneChip® Betriebsprogramm (GCOS, Version 1.3, Affymetrix) bearbeitet. Die rohen Expressionsdaten wurden mittels VSN-Normalisierungsprozedur [Huber, 2002] normalisiert, indem alle 28 Proben gemeinsam benutzt wurden. Nach der Normalisierung wurden die Expressionsdaten auf 736 Probensätze auf Chromosom 8 und 386 Probensätze auf Chromosom 13 beschränkt. Für jeden Probensatz wurde getrennt ein t-Test mit gleichen Varianzen zwischen Tumor- und Normalgewebeproben

¹ Freundlicherweise durchgeführt von Adrian Alexa und Prof. Dr. Jörg Rahnenführer, Max-Planck Institut für Informatik, Saarbrücken, bzw. Institut für Statistik, Universität Dortmund.

berechnet. Die resultierenden p-Werte wurden für multiples Testen nach der false discovery rate (fdr) Methode korrigiert [Benjamini, 2001].

2.15 DNA-Methylierungs-Analyse mittels Bisulfit

2.15.1 Bisulfitumwandlung

Im Gegensatz zur klassischen PCR, bei der methylierte und nicht-methylierte DNA gleichermaßen amplifiziert wird und so das Methylierungsmuster verloren geht, besteht die Möglichkeit, dieses bei der sogenannten methylierungsspezifischen PCR zu erhalten und zu beurteilen. Essentieller Bestandteil des letztgenannten Verfahrens ist die Bisulfitbehandlung. Dabei macht man sich das unterschiedliche Reaktionsverhalten der Aminogruppe von Cytosin und 5-Methylcytosin zu nutze. Während Cytosin zu Uracil desaminiert, bleibt 5-Methylcytosin unter der Behandlung mit Bisulfit unverändert. Bisulfit behandelte DNA spiegelt also den Methylierungsstatus in Sequenzunterschieden wieder, die dann von der PCR erfasst werden können. *Abbildung 2.15.1-1* gibt hier einen Überblick.

Es wurde jeweils 1 µg DNA von Prostatakarzinom-Zelllinien beziehungsweise Prostatakarzinom-Gewebeproben eingesetzt und nach Herstellerangaben umgewandelt. Nach Fällung der umgewandelten DNA wird sie in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

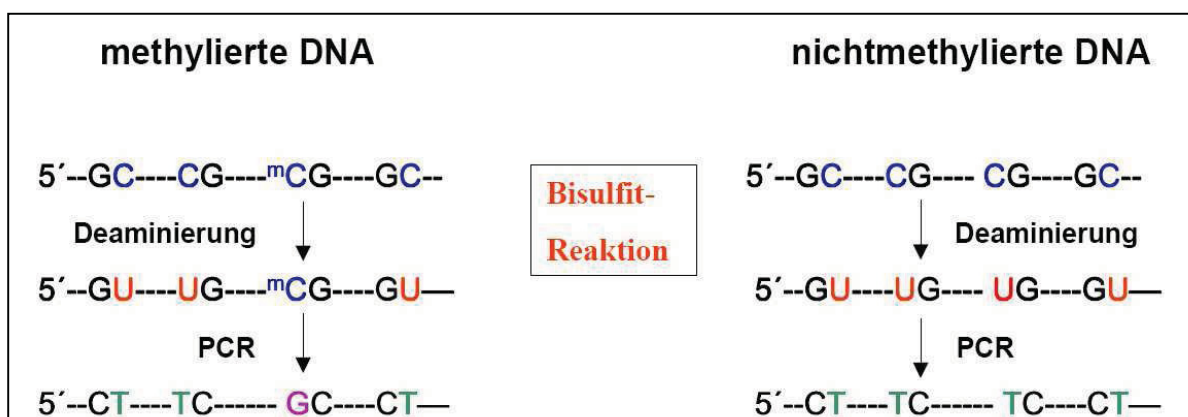


Abbildung 2.15.1-1: Veränderungen bei methylierter und nicht-methylierter DNA durch die Bisulfitbehandlung. Bei unmethyliertem CpG-Cytosin Deaminierung von Cytosin zu Uracil, in der PCR dann weiter zu Thymin deaminiert [Blümke].

2.15.2 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Für die nachfolgende PCR wurden Primer aus einer wissenschaftlichen Arbeit übernommen [van Noesel, 2002], die für CpG-Inseln am 5'-Ende der veröffentlichten Sequenz von DcR1 und DcR2 entworfen wurden. Die Lage der Primer entspricht Sequenzen im ersten Exon beziehungsweise dem Übergang zum ersten Intron und sollte so Rückschlüsse auf den Einfluss des Methylierungsstatus des Promotorbereichs der untersuchten Gene (DcR1 und DcR2) auf die Genexpression zulassen.

Dabei wurden für jedes Gen zwei PCRs mit unterschiedlichen Primern durchgeführt. Eine PCR, die so genannte U-Reaktion (Unmethylierte-Reaktion), wurde mit Primern einer Sequenz durchgeführt, die von einem unmethylierten Zustand des Genes ausgehen – das heißt alle Cytosinreste der CpG Insel wurden zur Uracilresten konvertiert. Die zweite Reaktion, die so genannte M-Reaktion (Methylierte-Reaktion) wurden mit Primern einer Sequenz durchgeführt, die eine Methylierung des Gens voraussetzten, und somit in der Bisulfitumwandlung an CpG-Stellen keine Konvertierung von Cytosin zu Uracil erfährt.

Trägt man beide PCR-Produkte nebeneinander auf ein Gel auf, kann man den Methylierungsstatus der untersuchten Sequenz ablesen (methyliert: M Positiv, unmethyliert: U positiv, teilmethyliert: M und U positiv). Als Positivkontrolle für die M-Reaktion diente eine Zelllinie (PC3) die für die untersuchte Sequenz komplett methyliert war. Als Negativkontrolle für die U-Reaktion eine Blutprobe sowie eine Harnblasenkarzinomzelllinie, die für die untersuchte Sequenz komplett unmethyliert war. Von der Bisulfit-umgewandelten DNA wurden jeweils 80 ng zu einem Gesamtansatz von 50 µl aus folgenden Komponenten hinzugegeben:

Tabelle 2.15.2-1: Reaktionsansatz für den PCR-Mastermix der MS-Analyse

Komponenten	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer QIAGEN	1 x
Primer forward	20 pmol
Primer reverse	20 pmol
dNTPs	150 µM
MgCl ₂	4,5 µM
HotStarTaq DNA Polymerase	1 U
sH ₂ O	ad 46 µl

Die Amplifikation erfolgte im Biometra T3 Thermocycler mit Heizdeckel mit folgender Programmierung:

Tabelle 2.15.2-2: Temperaturprogramm der MS-PCR, U- und M-Reaktion der beiden Gene liefen unter selben Bedingungen.

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	94°C / 15 min		
38(DcR1)/35(DcR2)	95°C / 30 sec	56°C / 30 sec	72°C / 45 sec
1			72°C / 7 min

2.16 Bisulfitsequenzierung des DcR2-Promotors²

In diesem Abschnitt sollte der Methylierungsstatus des DcR2-Promotors analysiert werden. Die DNA für die Untersuchung wurde aus den Prostatakarzinomzelllinien PC3 und LNCaP, einer Vollblutprobe (BT-1149), zwei Normalgewebe- und fünf Tumorgewebeproben isoliert. Von der bisulfitumgewandelten DNA (*Kapitel 2.15.1*) wurden jeweils 80 ng zu einem Gesamtansatz von 50 µl hinzugegeben. Komponenten und Zusammensetzung entsprechen denen in *Kapitel 2.15.2*. Die Amplifikation erfolgte im Biometra T3 Thermocycler mit Heizdeckel mit folgender Programmierung:

Tabelle 2.16-1: Temperaturprogramm der MS-PCR für die Promotorsequenzierung von DcR2

Zyklenzahl	Denaturierung	Primer-Anlagerung	Primer-Verlängerung
1	94°C / 15 min		
36	95°C / 30 sec	56°C / 30 sec	72°C / 45 sec
1			72°C / 7 min

Im Anschluss wurde jeweils der gesamte PCR-Ansatz auf einem Agarosegel (2,5%) elektrophoretisch aufgetrennt, die spezifische Bande des PCR-Produkts ausgeschnitten und das PCR-Produkt geleluert (QIAquick Gel- Extraction Kits), um unverzüglich für die Ligation und

² Freundlicherweise durchgeführt von Christiane Hader, Abteilung für Urologie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Klonierung in den TA-Vektor mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits eingesetzt zu werden. Um Aussagen über eine möglicherweise vorliegende Promotorhypermethylierung treffen zu können wird aus einzelnen Klonen die Plasmid-DNA präpariert (Minipräp: QIAprep Spin[®] Mini Kit) und diese zur Sequenzierung gegeben. Die zu sequenzierenden Proben wurden als Auftragsarbeit an das Biologisch Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) gegeben. Dort wird die Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger unter Verwendung von „Dye Terminatoren“ durchgeführt. Üblicherweise werden T3- oder T7-Primer verwendet. Die Sequenzierungs-Reaktion beruht auf der gezielten, aber statistisch verteilten Unterbrechung der Komplementärstrang-Synthese durch den Einbau eines Didesoxynukleotids. Diese haben keine freie 3'OH-Gruppe, so dass die Synthese bei Einbau eines solchen Didesoxynukleotids unterbrochen wird. Meistens sind die vier ddNTPs unterschiedlich markiert, so dass das zuletzt eingebaute Nukleotid anhand seiner spezifischen Fluoreszenz erkannt werden kann. Eine genaue Auftrennung der markierten Syntheseprodukte unterschiedlicher Länge über Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgt im BMFZ automatisiert mit Hilfe des ABI Prism[™].

2.17 Gelelektrophoretische Methoden

2.17.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese ist eine wichtige Methode zur Analyse von Nucleinsäuren. Die negative Ladung von Nukleinsäuren erlaubt ihre Auftrennung im elektrischen Feld. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von Größe, Form und Ladungszahl der Moleküle. Die Agarose-Gelelektrophorese von linearen DNA-Fragmenten aus Restriktionen und von PCR-Produkten kann zur Bestimmung ihrer Größe genutzt werden. Agarose wird durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und geliert beim Abkühlen zu einem Gel mit hoher Stabilität und großen Porendurchmessern. Die Agarosekonzentration wurde der erwarteten DNA-Fragmentgröße angepasst. Vor Auftragung der Proben auf das auspolymerisierte Gel wurden diese zur Erhöhung der Dichte der DNA-Lösung mit 3 –5 µl Blaumarker vermischt. Zur Charakterisierung der Fragmentgrößen der aufzutrennenden DNA wurde außerdem ein Längenstandard mitgeführt, in der Regel die „Gene-Ruler 100 bp DNA-Ladder“. Die Auftrennung erfolgte in horizontalen

Elektrophoresesystemen in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 5 V / cm Gel. Die Nukleinsäuren werden mittels Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen. Hierfür wurde das Gel 5-15 min in der Färbelösung gebadet, so dass der Farbstoff in die DNA interkalieren konnte. Dieser ermöglicht auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge 302 nm die DNA durch dessen Fluoreszenz sichtbar zu machen. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera.

2.17.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

2.17.2.1 Native Polyacrylamidgele

Polyacrylamidgele können durch Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer wie N, N'-Methylenbisacrylamid hergestellt werden. Die Polymerisation wird durch freie Radikale, die zum Beispiel durch Zerfall von Ammoniumpersulfat (APS) entstehen, gestartet. Gegenüber dem Radikalfänger Sauerstoff werden die Radikale N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) stabilisiert. Nicht-denaturierende Polyacrylamidgele (PA-Gele) besitzen im Vergleich zu Agarosegelen ein höheres Auftrennungsvermögen, so dass diese gut zur Analyse von PCR-Produkten geeignet sind, die einer höheren Sensitivität als im Agarosegel bedürfen.

2.17.2.2 Gele zur Mikrosatellitenanalyse

Die Elektrophorese erfolgte im LI-COR-Automaten. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um eine vertikale Elektrophoreseapparatur mit einem anregenden IR-Laser, einem Detektor und einem die Messwerte aufnehmenden Computersystem. Der anregende Laserstrahl wird auf Höhe des Detektors in das Gel eingekoppelt. Die vom Detektor gewonnenen Signale werden zur Darstellung des Bandenmusters an den Computer übermittelt. Zur laserinduzierten Fluoreszenz sind jeweils die forward-Primer IRD800-markiert (Infrarot-Anregung der Fluoreszenz).

Zur Mikrosatellitenanalyse wurden denaturierende PA-Gele eingesetzt, da diese eine sehr genaue Auftrennung von DNA-Molekülen, die sich in ihrer Länge um nur ein Nukleotid unterscheiden, ermöglichen. Zur Erstellung eines 0,25 mm dicken Gels wurden 35 ml der 6%igen Gellösung

zwischen gesäuberte Glasplatten gegossen und nach Einsetzen eines Vorkammes 60 min auspolymerisiert.

Nachfolgend wurde das Gel in 1xTBE-Laufpuffer in den LI-COR-Automaten eingesetzt und nach Entfernung des Vorkammes für mindestens 15 min einem Vorlauf bei 1500 V unterzogen. Anschließend wurde die Gelkante mit 1xTBE-Puffer gespült und ein Haifischzahnkamm eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden 1:5 mit sterilem H₂O verdünnt und auf einer Mikrotiterplatte mit 3 µl Stop Loading Buffer vermischt. Vor dem Auftragen wurden die Proben abgedunkelt auf einem Heizblock für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend kurz auf Eis gestellt. Von den frisch denaturierten Proben wurde jeweils 1 µl aufgetragen. Zur Größencharakterisierung der verschiedenen polymorphen Sequenzwiederholungen wurde anfangs außerdem ein Längenstandard mitgeführt. Die Proben wurden dann über 3-6 Stunden (je nach Produktgröße) nach Bedingungen des Herstellers elektrophoretisch bei 1500 V aufgetrennt. Die anschließende Dokumentation und Auswertung wurde unter Verwendung der serienmäßigen LI-COR-Software, sowie des Gel-Analyseprogramms ONE-Dscan 2.03 (Scanalytics, CSP Inc., Billerica, Massachusetts, USA) vorgenommen.

2.18 Zelllinienexperimente und Zellkultur

2.18.1 Anzucht von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, Du145, 22Rv1 und PC3 wurden mit Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium in Kultur gehalten. Dem Medium wurden 1% Penicillin/Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertes FCS beigemischt.

2.18.2 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde das in der 75 ml Zellkulturflasche enthaltene Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und nach der Zugabe von 2 ml Trypsin bei 5%iger, CO₂-H₂O-gesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Die enzymatische Reaktion des Trypsins wurde durch 5 ml Mediumzugabe gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden

in Greiner-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min bei 1500 g). Das Pellet wurde im entsprechenden Medium resuspendiert und im gewünschten Volumen ausgesäht.

2.18.3 Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) und Suberoylanilid-Hydroxamic-Acid (SAHA)

Zur Behandlung mit 5-Aza-dC, einem Inhibitor der DNA-Methylierung, und SAHA, einem Histon-Deacetylase-Inhibitor, wurden die Prostatakarzinom-Zelllinien drei Tage in Medium mit Zusatz von 2 μM 5-Aza-dC beziehungsweise SAHA kultiviert. Medium und Inhibitor wurden jeden Tag frisch zugesetzt.

2.18.4 CellTiter-Glo[®] Lumineszenz-Test

Der CellTiter-Glo[®]-Test dient zur quantitativen Bestimmung lebender Zellen und basiert auf der Quantifizierung von ATP.

Der zum Zeitpunkt des Testes vorhandene ATP-Gehalt wird ermittelt, welcher auf die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen schließen lässt. Ein Testreagenz wird zu den Zellen zugegeben, das die Lyse der Zellen und somit die Freisetzung des ATP bewirkt. Dieses wird in einer Luziferase-Reaktion mit Luziferin zu Oxyluziferin umgesetzt und bewirkt die Bildung eines Lumineszenzsignals, welches mit einem Luminometer erfasst und quantifiziert werden kann. Die Reaktion ist in *Abbildung 2.18.4-1* wiedergegeben.

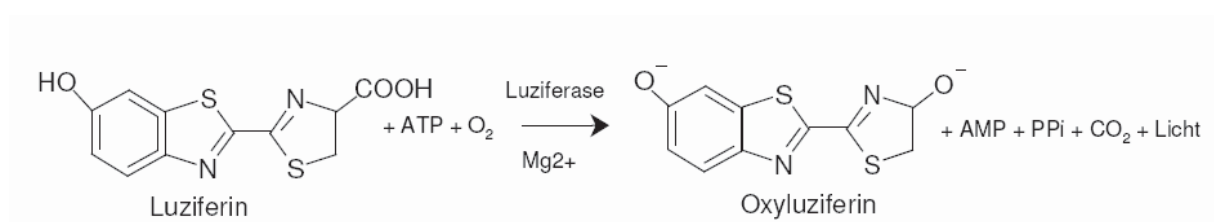


Abbildung 2.18.4-1: Reaktionsmechanismus, welcher der Quantifizierung von metabolisch aktiven Zellen durch Umsetzung mit Luziferin zugrunde liegt.

Der Assay wurde als funktioneller Test eingesetzt, um einen synergistischen Effekt zwischen der toxischen Wirkung verschiedener TRAIL-Konzentrationen auf Prostatakarzinom-Zelllinien und

der Vorbehandlung mit dem Methytransferaseinhibitor 5-Aza-dC, sowie dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Suberoylanilid-Hydroxamic-Acid (SAHA) festzustellen.

Hierfür wurde jeweils eine feste Zellzahl in 100 µl Medium pro 96-Well-Platte ausgesät. Parallel wurden Hintergrundkontrollen angesetzt, die nur Medium ohne Zellen enthielten. Daraufhin wurden die Zellen für 72 h im Brutschrank inkubiert, die Zugabe der Inhibitoren und TRAIL erfolgte unter Bildung von vier Zellgruppen. Eine wurden 72 h mit 5-Aza-dC, eine 48 h mit SAHA und eine 48 h mit 5-Aza-dC und SAHA inkubiert. Eine Zellgruppe blieb unbehandelt.

Dabei lag die Endkonzentration von 5-Aza-dC und SAHA, sowie für die Kombination beider bei 2 µM, beide Reagenzien wurden täglich frisch zugesetzt. Die Zugabe von TRAIL erfolgte nach 48 h für eine Inkubationsdauer von 24 h in den Konzentrationen 0, 2, 10, 50, 200 und 1000 ng/ml.

Jede einzelne Probe wurde viermal angesetzt und gemessen. Aus den sich ergebenden Vierfach-Werten wurde ein Mittelwert gebildet, nachdem von allen Einzelwerten die Hintergrundlumineszenz abgezogen wurde.

Nach 72 h Inkubation und einer 30-minütigen Äquibrierung bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Zugabe eines gleichen Volumens Testreagenz lysiert und die Luciferase-Reaktion gestartet. Nach Zugabe des Testreagenz wurde die 96-well Platte für zwei Minuten auf einen Schüttler gestellt und anschließend zur Stabilisierung des Chemolumineszenz-Signals 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung des Chemolumineszenz-Signals erfolgte am Victor Counter (Testwellenlänge 570 nm, Referenzwellenlänge 630 nm).

2.18.5 Caspase-Glo® 3/7 Test

Der Caspase-Glo® 3/7 Assay misst die Aktivität der Caspasen 3 und 7, die eine Schlüsselrolle während der Apoptose von Säugetierzellen spielen. Der Test erlaubt somit eine Abschätzung der Apoptoseaktivierung. Das Prinzip des Tests beruht auf der Messung der Fluoreszenzzunahme, die zustande kommt, wenn das künstliche Substrat für die Caspasen-3 und -7 (Z-DEVD-Aminoluziferin), gespalten wird. Nach Zugabe des Caspase-Glo® 3/7 Reagenz erfolgt die Zelllyse, gefolgt von der Caspasespaltung des luminogenen Substrates Aminoluziferin, das als Substrat für die UltraGlo Luziferase dient und eine Luziferasereaktion mit verlängerter Halbwertszeit katalysiert (Glow-Type Luziferasereaktion). Die Reaktion ist in *Abbildung 2.18.5-1* wiedergegeben.

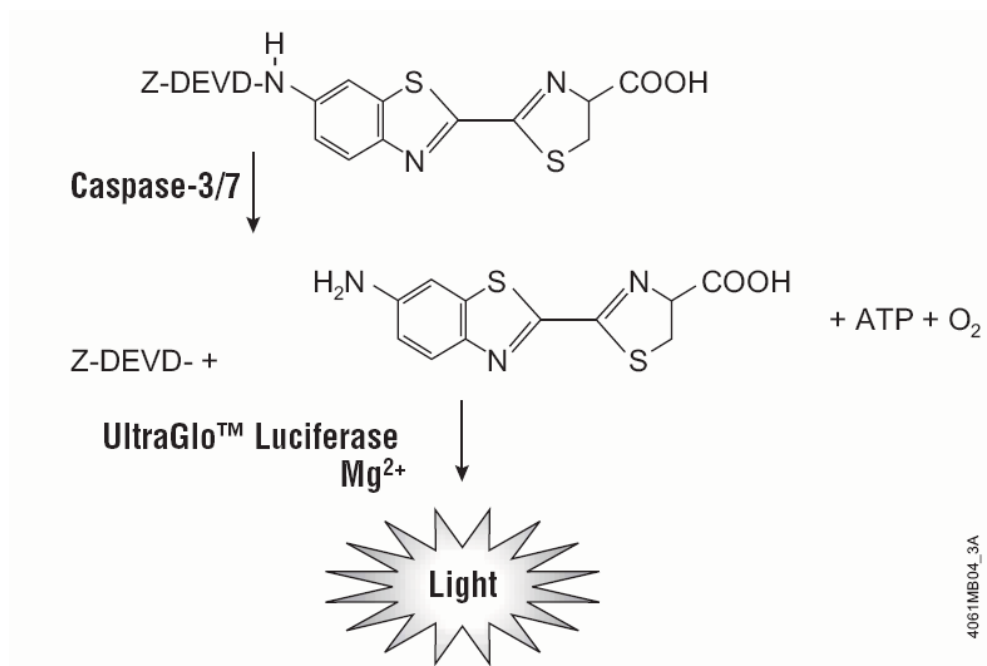


Abbildung 2.18.5-1: Caspase 3/7 Spaltung des luminogenen Substrates Z-DEVD

Der Assay wurde als funktioneller Test im Anschluss an den CellTiter-Glo® Test eingesetzt, um die Apoptoseaktivierung in Prostatakarzinom-Zelllinien durch verschiedenen TRAIL-Konzentrationen und der Vorbehandlung mit dem Methyltransferaseinhibitor 5-Aza-dC, sowie dem Histon-Deacetylase-Inhibitor SAHA näher zu untersuchen.

Das Versuchsdesign und die Auswertung gleichen im Wesentlichen der Durchführung des CellTiter-Glo® Lumineszenz-Tests.

3 ERGEBNISTEIL

3.1 LOH-Analyse von Veränderungen der Chromosomen 8p und 13q

Der Verlust von genetischem Material in Tumoren ist potentiell assoziiert mit der Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen. Ein Verfahren, den Verlust von genetischem Material in Tumoren zu bestimmen, ist die Analyse polymorpher genetischer Marker. Dazu wird DNA aus Tumor- und Normalgewebeproben desselben Patienten extrahiert und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) im Bereich eines solchen (polymorphen genetischen) Markers amplifiziert. Die anschließende Gelauf trennung erlaubt dann eine Aussage darüber, ob der Patient homozygot (nicht informativ) oder heterozygot (informativ) für den untersuchten Marker ist. Im Falle der Heterozygotie kann durch den Vergleich von Tumor- und Normalgewebeprobe der Allelverlust (Verlust der Heterozygotie) und damit von genetischem Material im Tumor festgestellt werden.

Die LOH-Analyse (Loss of Heterozygosity) des kurzen Armes von Chromosom 8p und 13q wurde durchgeführt, um chromosomale Veränderungen in Form von Verlusten oder Zugewinnen genomischen Materials nachzuweisen, wobei sich das Verhältnis zweier allelischer Marker in diesem Falle ändern würde (allelische Imbalance). Dazu wurden jeweils sieben Mikrosatellitenmarker ausgewählt, die so entlang der beiden Chromosomenarme verteilt liegen, dass eine gleichmäßige Kartierung dieser Regionen möglich war.

Die Produkte einer Duplex-PCR von Tumor- und Normalprobe eines Patienten wurden nebeneinander auf ein Gel aufgetragen. Die Duplex-PCR wurde für je einen Marker von Chromosom 8 und Chromosom 13 durchgeführt, die untereinander in einer Gelspur sichtbar gemacht werden konnten. So war es möglich, jeweils zwei Allele von Chromosom 8p und 13q vergleichend zu untersuchen und so chromosomale Veränderungen in Form einer allelischen Imbalance nachzuweisen. *Abbildung 3.1-1* stellt einen Auszug aus einem Gel der Mikrosatellitenanalyse dar und veranschaulicht exemplarisch die beschriebene Systematik.

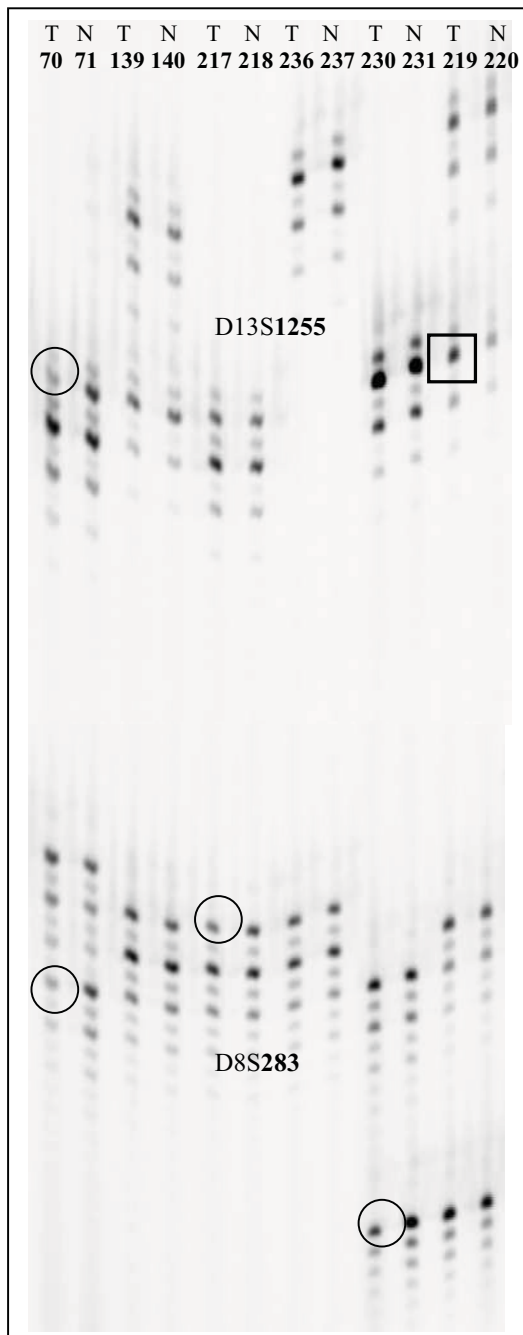


Abbildung 3.1-1: Zu sehen ist ein Auszug aus einem Gel der Mikrosatellitenanalyse. Aufgetragen sind PCR-Produkte aus Gewebeproben von sechs Patienten, wobei Tumor- (T) und Normalprobe (N) eines Patienten immer nebeneinander in Spalten liegen. Die Größe der Amplifikationsprodukte aus der Duplex-PCR unterscheiden sich so, daß Produkte des Markers D13S1255 über denen des Markers D8S283 zu liegen kommen. Der Zwischenmarkerbereich wurde zugunsten der Übersicht reduziert. Die Signal- bzw. Allelstruktur der Proben eines Patienten sind gleich, weisen aber zwischen verschiedenen Probanden natürlich(e) Unterschiede auf. Durch Fehler der Polymerase während der PCR kommt es zu Entstehung verschieden langer PCR-Nebenprodukte eines Allels. Dies ist erkennbar an dem Auftreten eines stärkeren Hauptsignals und mehrerer schwächerer Nebensignale für ein Allel. Bei Heterozygotie entstehen dann entsprechend zwei stärkere Hauptsignale pro Marker und Spalte. Für die Auswertung wurden nur die Hauptsignale verwendet.

Bei Vorliegen einer heterozygoten Allelausprägung erkennt man zwei, voneinander räumlich getrennte Signale (Proben 70/71, 139/140, 217/218, 236/237 nur D8S 283, 219/220). Bei Vorliegen einer homozygoten Allelausprägung erkennt man dagegen nur ein Signal mit abnehmenden Folgesignalen (Proben 236/237 nur D13S1255, 230/231). Diese sind auch bei den jeweils zwei Einzelsignalen der heterozygoten Proben zu sehen. Bei einem gesunden Probanden, bzw. Fehlen einer allelischen Imbalance, sollten die Signalintensitäten, bzw. das Verhältnis der Signalintensitäten einer Normal-Probe zu der jeweils zugehörigen Tumor-Probe, gleich sein. Mit einem **schwarzen Kreis** sind die Signale gekennzeichnet, die eine deutliche Abschwächung i.S. eines LOH zeigen. Mit einem **Quadrat** sind die Signale gekennzeichnet, die eine Verstärkung i.S. eines Zugewinnes/Amplifikation genetischen Materials zeigen.

Da es aufgrund verschiedener Fehlerquellen zu Unterschieden in der Signalintensität einer kompletten Spalte kommen kann, war es wichtig, nicht nur die Einzelallele paarweise miteinander zu vergleichen, sondern durch die Bildung eines Quotienten Ungenauigkeiten auszugleichen. Nachdem durch die Software OneDScan jedem Allelsignal ein absoluter Intensitätswert zugeordnet wurde, gestaltete sich die Auswertung der heterozygoten Proben wie

folgt (homozygote Proben mit nur einem Allelsignal konnten nicht ausgewertet werden, da hier der Nachweis eines LOHs nicht möglich ist):

Die Signalintensitäten der jeweils entsprechenden Allele von Tumor- und Normalprobe eines Patienten wurden dividiert. Bei heterozygoten Proben ergaben sich somit zwei Quotienten. Zum Fehlerausgleich wurden diese beiden Quotienten dann durcheinander dividiert, wobei immer der größere Quotient im Nenner stand, um einen Wert kleiner 1 zu erhalten. Unter der Annahme einer regelgerechten Verteilung des genetischen Materials auf die komplementären Allele, muss dieser Korrektur-Quotient aus den beiden Allelvergleichen nahe 1 liegen, da – auch bei Abweichungen zwischen den aufgetragenen Tumor- und Normalproben – das Verhältnis zwischen beiden annähernd gleich ist. Das Auftreten eines Verlustes oder Zugewinns von genetischem Material sollte sich in der Abschwächung beziehungsweise Verstärkung der Allelintensität und damit in einer Änderung des Korrektur-Quotienten zeigen, und zwar in Werten deutlich unter 1. Bei einem kompletten Allelverlust würde sich ein Wert von 0 ergeben. Da aber immer von einer Verunreinigung des Tumorgewebes mit Normalgewebe auszugehen ist, kam es nie zu solch einer Konstellation. Bei Werten kleiner 1 liegen die beiden Allele eines homologen Chromosomenpaares in Tumor- und Normalgewebe also nicht in gleicher Menge vor, das heißt es besteht eine allelischen Imbalance (AI). Dabei schließt dieser Begriff zunächst den Verlust und den Zugewinn genetischen Materials ein. Der Begriff allelische Imbalance wird im Folgenden synonym für genetische Instabilität benutzt, da die Ursachen für einen Zugewinn beziehungsweise Verlust genetischen Materials, und somit eines veränderten Allelverhältnisses, zumindest theoretisch auf denselben Veränderungen beruhen können, welche auch die genetische Instabilität charakterisieren (siehe *Tabelle 1.5-1*).

Es stellte sich aber die Frage, welche Werte der Korrektur-Quotient annehmen muss, um unter statistischen Gesichtspunkten von einer allelischen Imbalance sprechen zu können.

Zur Ermittlung der Varianz der LOH-Analyse und der Festlegung eines Cutoffs wurde folgender Versuch durchgeführt: Mit 10 Gewebeproben wurden für zwei Mikrosatellitenpaare jeweils zwei PCRs durchgeführt. Im Folgenden wurde das amplifizierte Probenmaterial aus den beiden PCRs nebeneinander auf ein Gel aufgetragen, so daß die Signale ein und derselben Probe aus zwei PCRs miteinander verglichen werden konnten. Im Optimalfall dürfte es keine Abweichungen zwischen den Proben geben und der Korrekturquotient müßte bei 1 liegen. *Abbildung 3.1-2* veranschaulicht das Ergebnis der Varianz-Analyse:

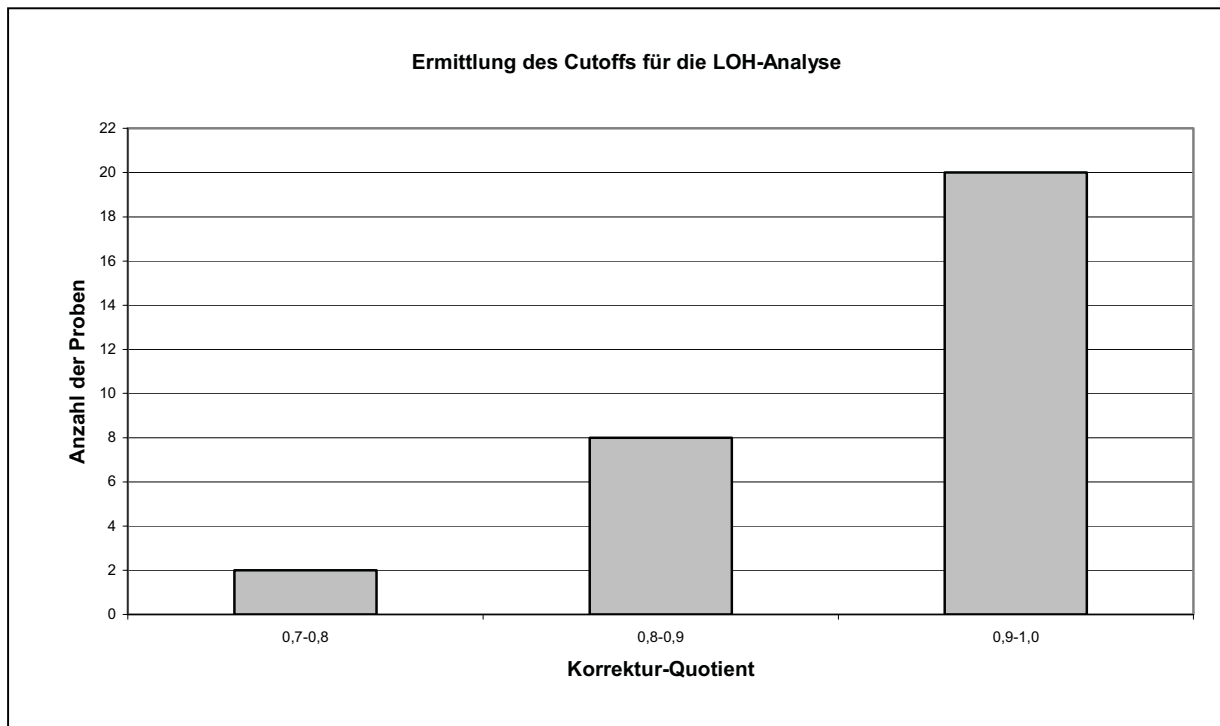


Abbildung 3.1-2: Bei der Varianzanalyse fanden sich nach Abzug der homozygoten Proben 30 verwertbare Probenpaare, von denen 20 einen Wert zwischen 0,9 und 1, acht einen Wert zwischen 0,8 und 0,9 und zwei einen Wert zwischen 0,7 und 0,8 aufwiesen.

Unter Berücksichtigung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p=0,05$) wurde der Cutoff bei einem Wert von einschließlich 0,70 gewählt.

3.1.1 Chromosom 8p

Die folgenden Abbildungen geben eine Übersicht über die auf Chromosom 8p gesammelten Daten aus der LOH-Analyse, die verwendeten Mikrosatellitenmarker sowie die in der anschließenden Expressionsanalyse untersuchten Gene.

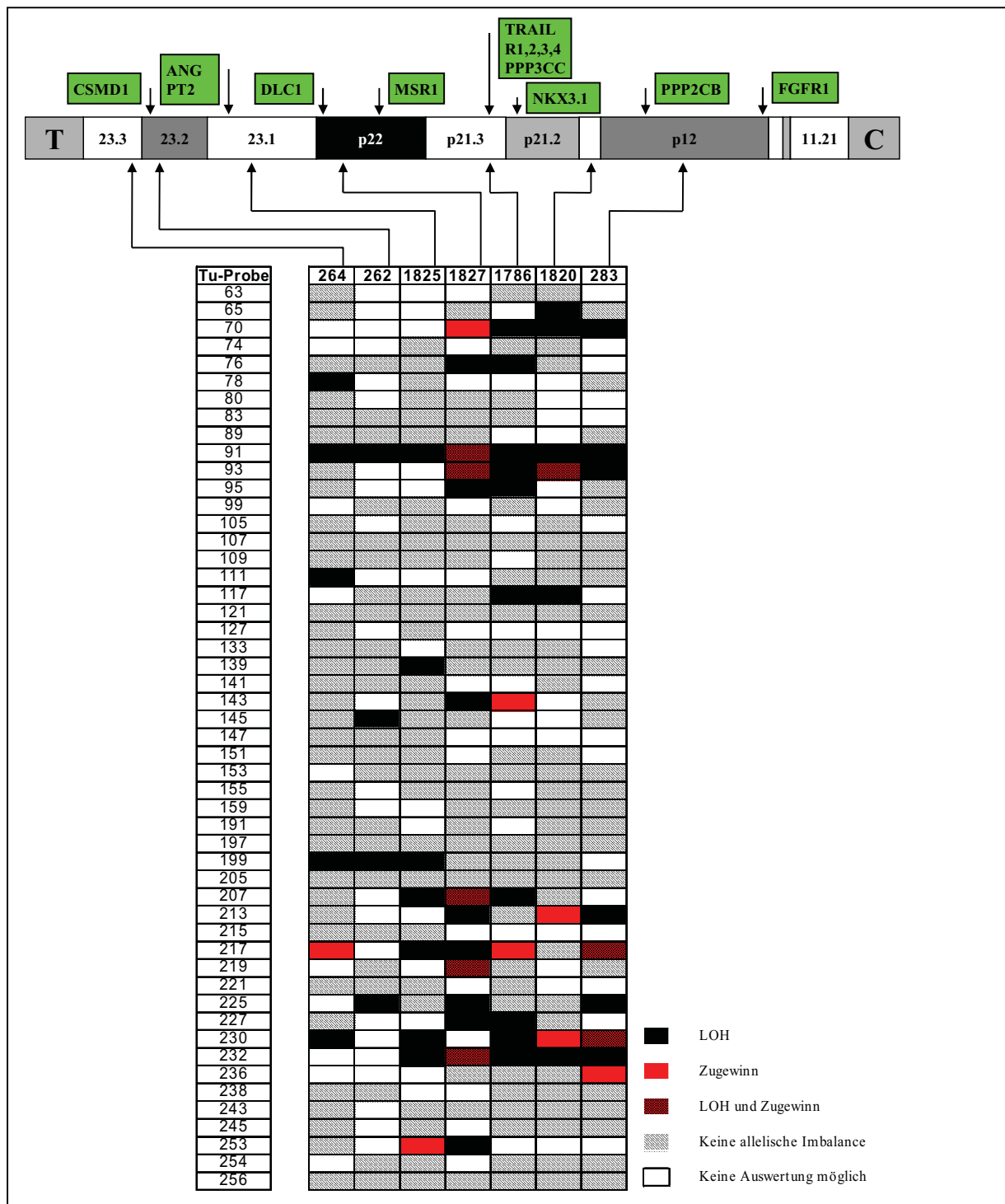


Abbildung 3.1.1-1: Übersicht über die LOH-Analyse von Chromosom 8p. Zu sehen ist eine Skizze von Chromosom 8p (T=Telomer, C=Centromer) mit der Lokalisation der verwendeten Mikrosatellitenmarker sowie der in der Expressionsanalyse untersuchten Gene. Darunter findet sich eine Tabelle mit den verwendeten Tumorphoben und den entsprechenden Ergebnissen der LOH-Analyse. In einigen Fällen ergab sich in wiederholten Einzelmessungen der Hinweis auf einen Verlust (LOH) und einen Zugewinn genetischen Materials (Felder rot-schwarz kariert). Keine Auswertung war bei den homozygoten Allelträgern möglich (Felder weiß).

Deutlich sichtbar ist das Überwiegen von Verlusten genetischen Materials, in Form von LOH, gegenüber Zugewinnen. Dies bestätigt die Rolle von Chromosom 8p als Ort, der in der Entwicklung des Prostatakarzinoms besonders häufig von Deletionen und Chromosomenarm- und Teilstückverlusten betroffen ist. Von den 51 untersuchten Proben zeigten 23 (45%) mindestens eine allelische Imbalance auf 8p. Imbalancen waren am häufigsten im Bereich von 8p22 (D8S1827: 27% der Fälle) und 8p21.3 (D8S1786: 24% der Fälle). Sowohl die Prozentsätze als auch die am häufigsten von Verlusten betroffenen Mikrosatelliten-Subregionen entsprechen den in der Literatur beschriebenen Daten. Homozygote Deletionen wurden in keinem der Fälle beobachtet

3.1.1.1 Statistische Auswertung

Zunächst soll die LOH-Analyse unabhängig von den Expressionsdaten behandelt werden, das heißt der Zusammenhang mit klinisch prognostischen Parametern wie Gleason-Grad, Lymphknotenstatus, pT-Stadium und dem Auftreten von Rezidiven. Zur Vereinfachung der Analyse wurden die sehr seltenen Amplifikationsereignisse unter der LOH-Gruppe subsummiert, da auch sie Zeichen einer allelischen Imbalance im Rahmen der Tumorentwicklung sind. *Abbildung 3.1.1.1-1* gibt hier eine Übersicht.

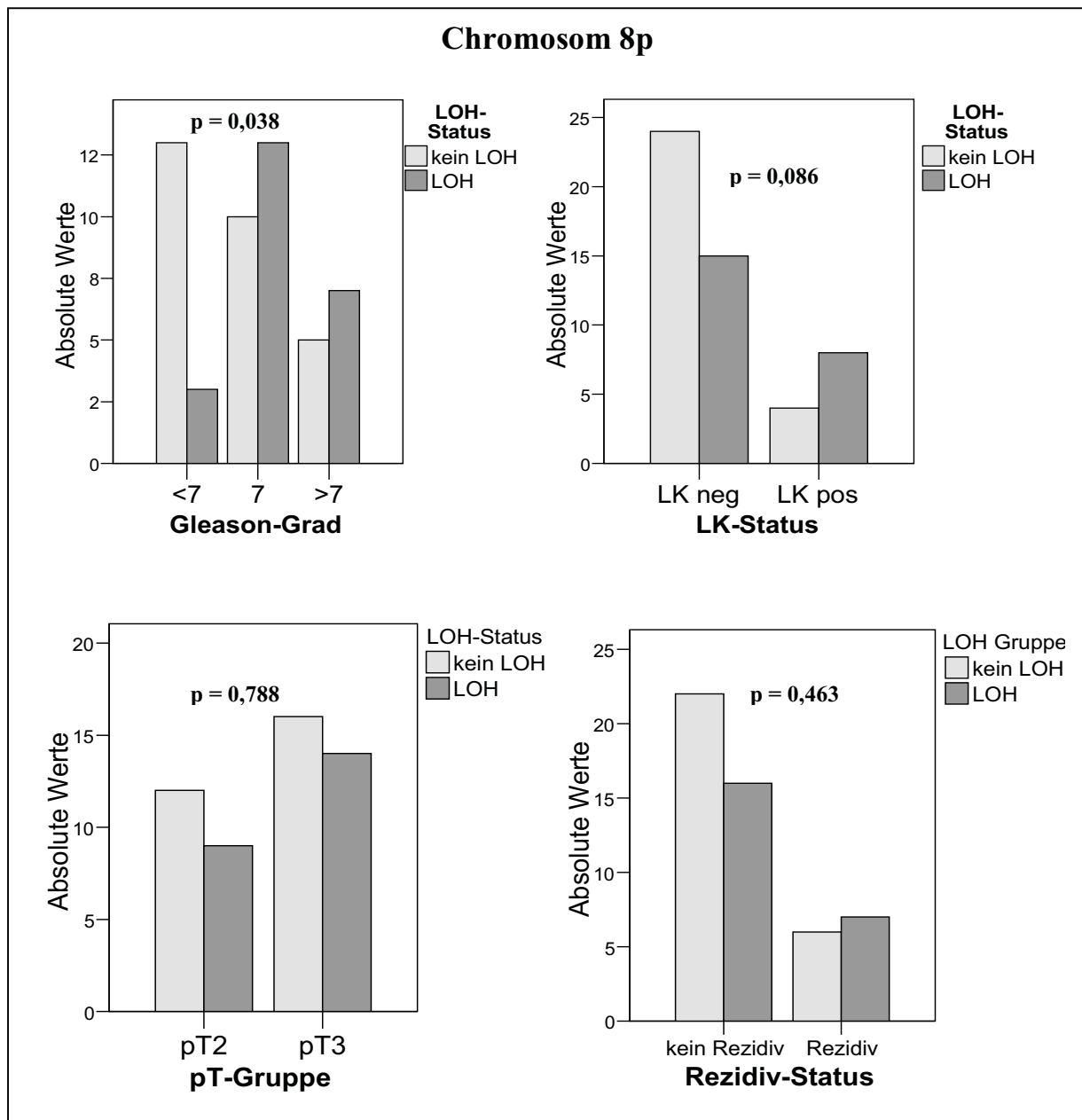


Abbildung 3.1.1.1-1: Übersicht über die durchgeführten statistischen Analysen für Chromosom 8p. LK = Lymphknoten.

Wie aus *Abbildung 3.1.1.1-1* zu entnehmen ist, erreicht die Korrelation von LOH-Ereignissen und dem Gleason-Summe der jeweiligen Tumorproben statistische Signifikanz (unter Chi-Quadrat nach Pearson $p = 0,038$). Während in der Gruppe mit Gleasongraden kleiner 7 der LOH-Anteil nur 19% beträgt, steigt dieser in der 7er Gleasongruppe deutlich an (ca. 56%), um dann ab einem Gleasongrad von 8 leicht abzusinken (ca. 45%).

Man kann also festhalten, dass der größte Unterschied im Auftreten von LOH, im Sinne einer allelischen Imbalance, zwischen den Gleasongruppen kleiner 7 und gleich 7 stattfindet, um sich dann auf hohem Niveau zu stabilisieren.

Dieser Sachverhalt unterstreicht die Schwierigkeit im Umgang mit Prostatakarzinomen der Gleasongruppe 7, von der man nicht wirklich weiß, ob sie sich aggressiv-progredient oder eher latent-lokalisiert entwickeln. Dieser Analyse zufolge würde man sie ersterer Gruppe zuordnen.

Die Korrelation der LOH-Daten mit dem postoperativen Lymphknotenstatus verfehlt nur knapp das statistische Signifikanzniveau ($p = 0,086$). Trotzdem zeigt die Abbildung anschaulich, dass der Anteil von LOHs in der Gruppe mit positivem postoperativem Lymphknotenstatus deutlich höher ist (67%), als in der Gruppe mit negativem Lymphknotenstatus (38%). Es findet sich also ein klarer Trend hinsichtlich der Zunahme von LOHs in lokal lymphogen fortgeschrittenen Prostatakarzinomen.

Bei der Betrachtung der Zusammenhänge mit der lokalen Tumorausdehnung findet sich keine signifikante Verbindung mit LOH-Ereignissen beziehungsweise einer allelischen Imbalance ($p = 0,788$). LOHs sind in der pT3 Gruppe mit 47% gegenüber der pT2 Gruppe mit 43% fast gleich häufig.

Betrachtet man das Auftreten von Rezidiven nach operativer Therapie, so findet man ein ähnliches, wenn auch weniger deutliches, Verhältnis wie beim Lymphknotenstatus. Mit 54% liegt der LOH-Anteil in der Rezidivgruppe über dem in der rezidivfreien Gruppe (42%), zeigt aber mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,463$ keine eindeutigen Trend auf.

3.1.1.2 Zusammenfassung

Letztlich findet sich in allen Berechnungen eine Zunahme von LOHs in Tumoren mit ungünstigen Prognoseparametern. Besonders deutlich wird dies bei der Gleason-Summe, dem wohl wichtigsten klinisch-prognostischen Parameter des Prostatakarzinoms überhaupt, und dem Lymphknotenstatus, als Marker für die lokale und überregionale Tumorprogression.

3.1.2 Chromosom 13q

Wie bereits erwähnt wurde die LOH-Analyse für identische Tumorproben ebenfalls für sieben Mikrosatellitenmarker auf dem langen Arm von Chromosom 13 durchgeführt. Die Daten sollen hier nur kurz zusammengestellt werden, da sie nicht im unmittelbaren Fokus dieser Arbeit stehen.

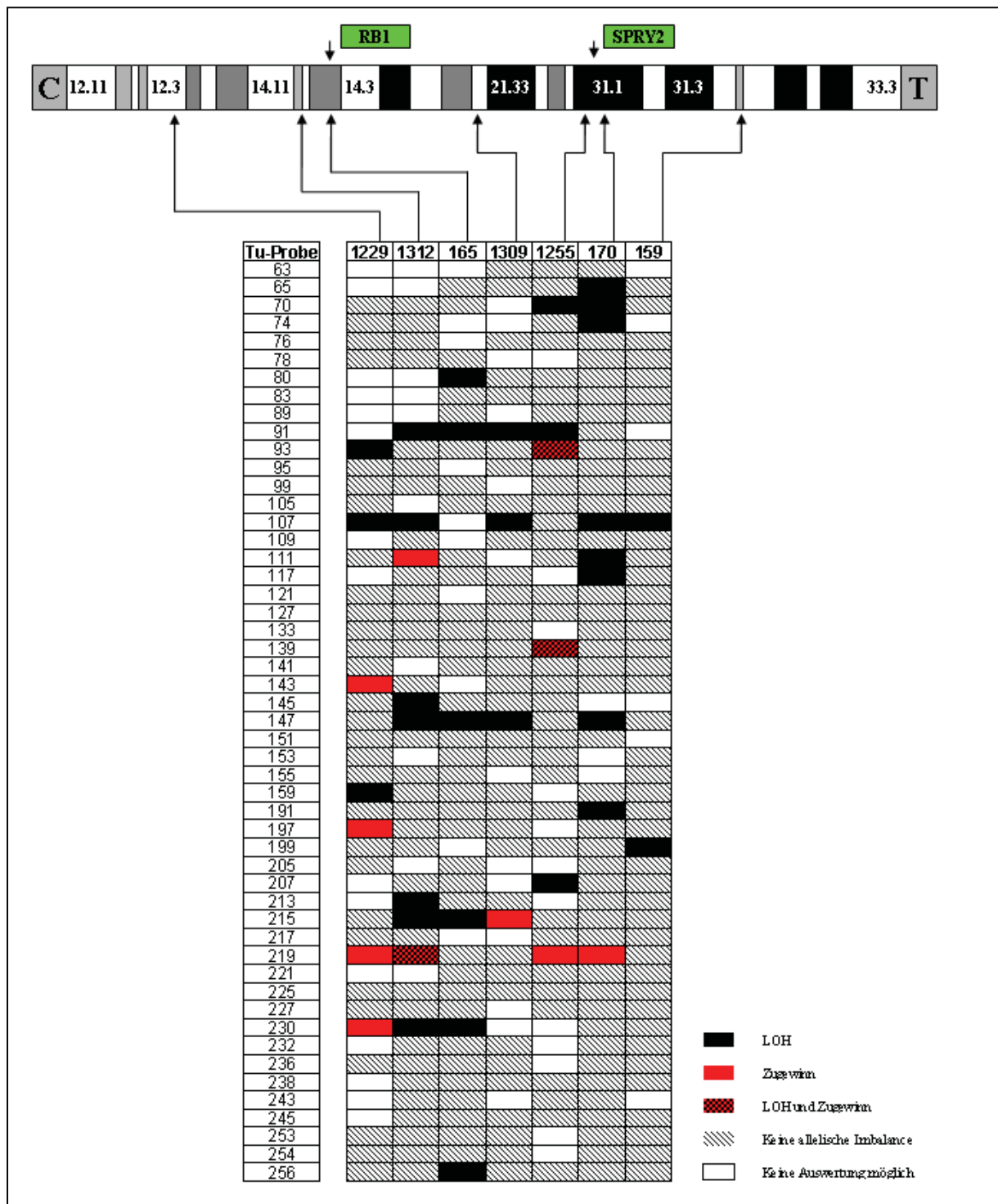


Abbildung 3.1.2-1: Übersicht über die LOH-Analyse von Chromosom 13q. Zu sehen ist eine Skizze von Chromosom 13q (T=Telomer, C=Centromer) mit der Lokalisation der verwendeten Mikrosatellitenmarker sowie der in der Expressionsanalyse untersuchten Gene. Darunter findet sich eine Tabelle mit den verwendeten Tumorsproben und den entsprechenden Ergebnissen der LOH-Analyse. In einigen Fällen ergab sich in wiederholten Einzelmessungen der Hinweis auf einen Verlust (LOH) und einen Zugewinn genetischen Materials (Felder rot-schwarz kariert). Keine Auswertung war bei den homozygoten Allelträgern möglich (Felder weiß).

3.1.2.1 Statistische Auswertung

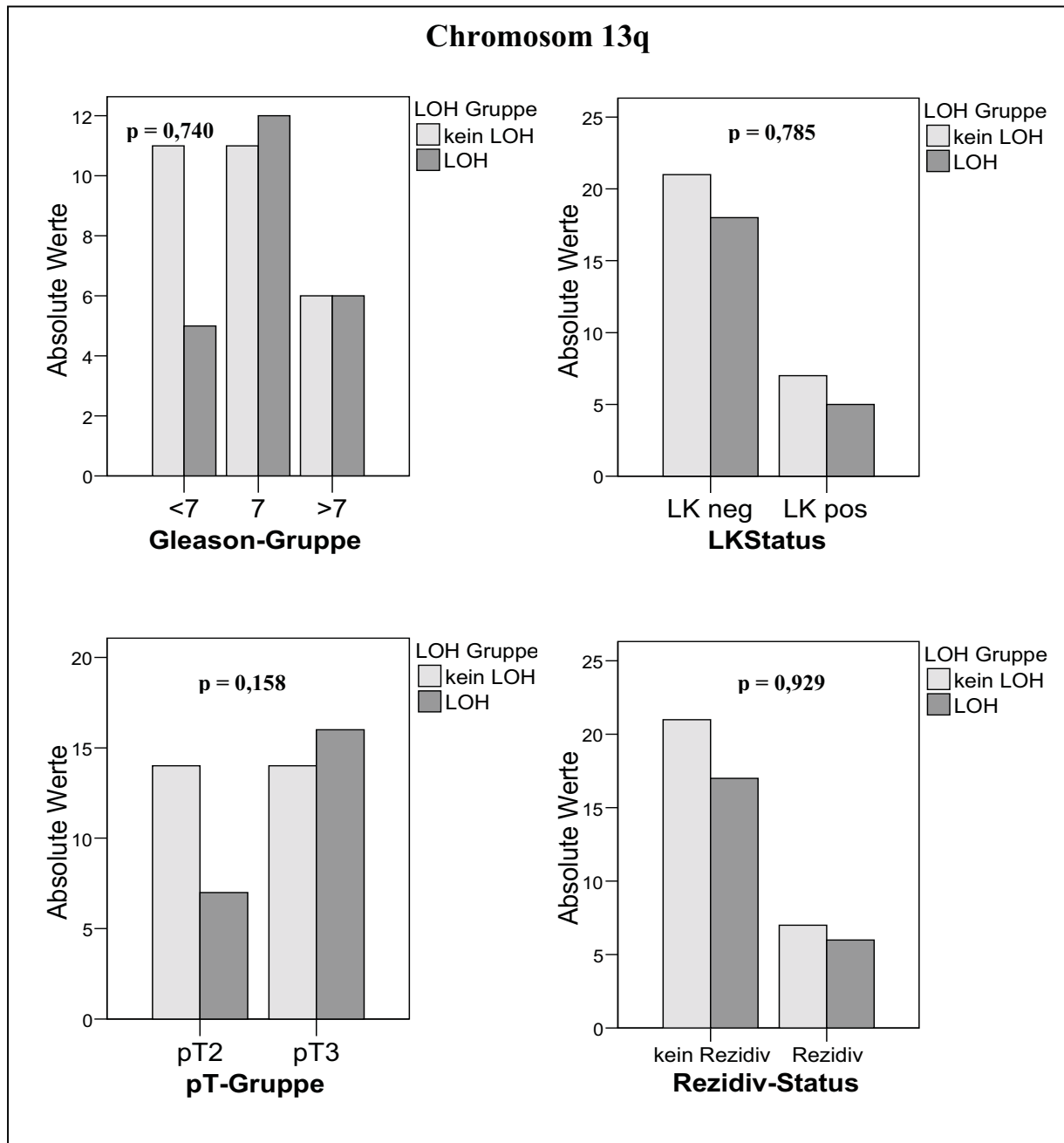


Abbildung 3.1.2-2: Übersicht über die durchgeführten statistischen Analysen für Chromosom 13q.

3.1.2.2 Zusammenfassung

Bei der Untersuchung von Chromosom 13q konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu einem der klinischen Parameter nachgewiesen werden. Trotzdem zeigt sich auch hier in allen Berechnungen ein, wenn auch zum Teil minimaler, Anstieg der LOH-Frequenz bei ungünstigen Prognoseparametern, am deutlichsten noch im Falle des pT-Stadiums, wo der LOH-Anteil in der pT3-Gruppe deutlich höher ist (53%) als in der pT2-Gruppe (33%). Ebenfalls nicht signifikant, aber ähnlich wie bei der Untersuchung von Chromosom 8p, sind die Daten des Vergleichs mit der Gleason-Summe. Auch hier findet sich die größte Veränderung zwischen den Proben mit Gleason kleiner 7 und größer/gleich 7. Im direkten Vergleich dieser beiden Gruppen liegt das Verhältnis von LOH bei 33% zu 50% (Signifikanzniveau $p=0,276$, ohne Abbildung) und bestätigt damit den beobachteten Trend. Auch hier zeigt die Gruppe mit Gleason-Grad 7 eher Ähnlichkeiten mit den aggressiveren Tumoren der Gruppe mit Summen zwischen 8 und 10.

3.2 CGH-Analyse von Chromosom 8-Veränderungen³

Für 41 der 51 in der LOH-Analyse untersuchten Prostata-Tumorproben konnte eine Comparative-Genomic-Hybridisation-Analyse (CGH) durchgeführt werden. Die Daten wurden uns freundlicherweise von einer Arbeitsgruppe aus Homburg bereitgestellt.

Von den 41 Proben wiesen 18 in der LOH-Analyse eine allelische Imbalance auf, von denen sich 6 (33%) in der CGH-Analyse bestätigten (Proben 143, 217, 219, 225, 232, 253) und 9 Proben zumindest eine Annäherung – wenn auch keine signifikante – an den Cutoff in Übereinstimmung mit den LOH-Ergebnissen zeigten (Proben 70, 76, 91, 93, 95, 111, 199, 207, 213).

Von den 23 LOH-negativen Proben zeigten 8 Proben in der CGH eine signifikant erhöhte/erniedrigte Kopienzahl auf dem kurzen Arm von Chromosom 8, die in der LOH-Analyse nicht bestätigt werden konnte (Proben 63, 89, 105, 109, 121, 127, 141, 238).

Damit ergibt sich eine komplette, signifikante Bestätigung der LOH-Daten in nur einem Drittel Fälle. Da die CGH aber ein wesentlich schlechteres Auflösungsvermögen als die LOH-Analyse besitzt, können kleine Deletionen, wie sie mit der LOH-Analyse nachgewiesen werden, hier durchaus unbeobachtet bleiben oder in Dosisschwankungen großer Chromosomenabschnitte

³ Freundlicherweise durchgeführt von Prof. Bernd Wullich und Dr. Volker Jung, Urologische Klinik, Universitätsklinikum Saarland

untergehen. Betrachtet man die Daten unter diesem Gesichtspunkt, indem man die in der LOH-Analyse auffälligen Loci differenziert mit den Daten der CGH vergleicht, so zeigen 16 von 18 Proben (89%) mit LOH in der CGH-Analyse zumindest eine Dosisveränderung in die richtige Richtung. *Abbildung 3.2-1* veranschaulicht den Sachverhalt.

Diskrepanzen und nur teilweise Übereinstimmung der beiden Methoden können theoretisch durch zwei Sachverhalte erklärt werden:

- 1) Unterschiedliches Auflösungsvermögen: Die Auflösung bei der LOH-Analyse mit Mikrosatellitenmarkern liegt je nach Produktgröße zwischen 100 und 200 Basenpaaren. So können auch kleine Deletionen erkannt werden, wogegen in der CGH Verluste in Höhe von 5-10 Megabasen erforderlich sind, um diese sicher als solche festzustellen. Somit wäre es möglich, dass in der Mikrosatellitenanalyse Verluste beziehungsweise Zugewinne nachgewiesen werden – und zwar vor allem solche die nur kurze Bereich von Chromosom 8p betreffen -, die die CGH nicht auflösen kann.
- 2) Eine unterschiedliche Sensitivität der CGH gegenüber Verlusten und Zugewinnen: Es wird angenommen, dass um einen einzelnen Kopieverlust mittels CGH nachweisen zu können, dieser mindestens 10 Megabasen lang sein muss. Dagegen können Amplifikationen wahrscheinlich schon ab einer Größe von 1 Megabase erkannt werden. Dies würde die Übereinstimmung zwischen beiden Methoden weiter verschlechtern, da die CGH in einem Chromosomenbereich, der im Prostatakarzinom sehr häufig von Verlusten betroffen ist, verhältnismäßig zu wenige Verluste und zu viele Zugewinne detektieren würde.

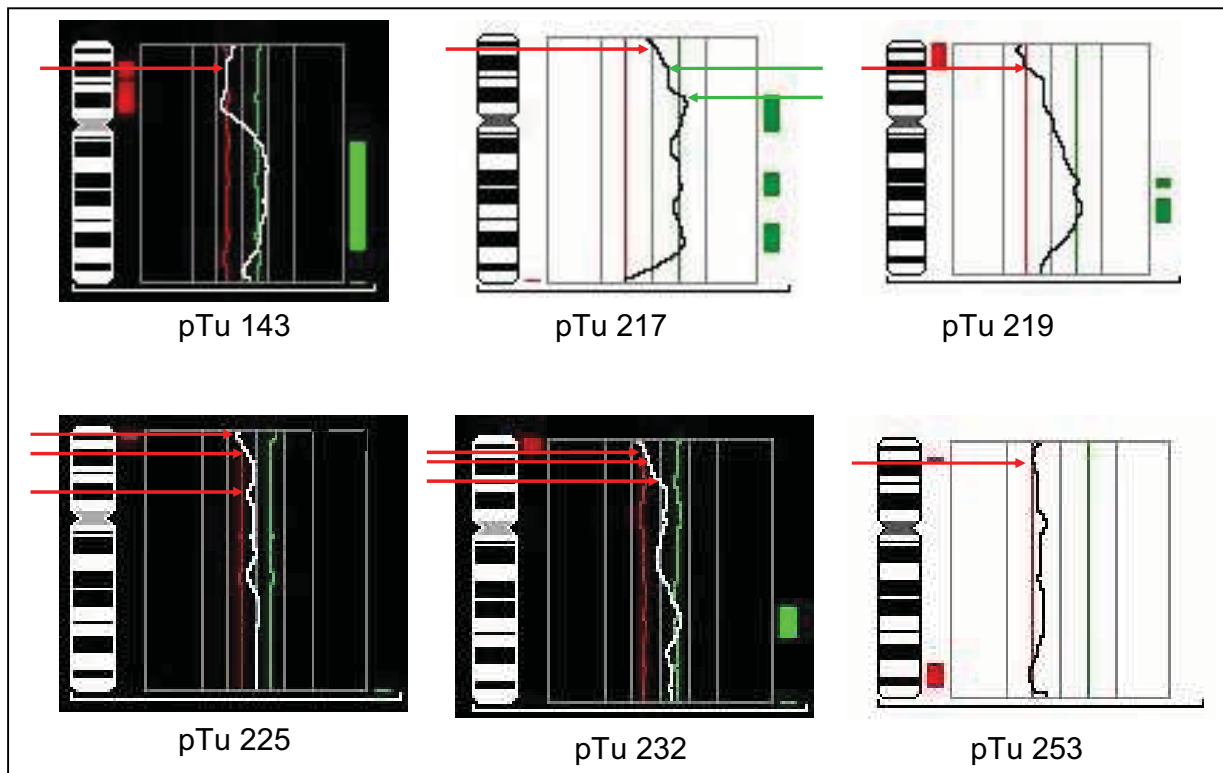


Abbildung 3.2-1: Auswahl aus der CGH-Analyse. Abgebildet ist jeweils ein schematisches Karyogramm für die sechs Tumortypen mit Übereinstimmung in der LOH-Analyse. Rote und grüne Linien bilden die Grenzen (Cutoff) für signifikante Erniedrigung (rot) und Erhöhung (grün) der Kopienzahl. Die gewundene Linie dazwischen beschreibt das Dosisprofil der jeweiligen Probe. Bei Erreichen des Cutoff sind die betroffenen Chromosomenbereiche seitlich mit roten (entspricht Verlust) oder grünen (entspricht Zugewinn) Balken markiert. Mit roten (Verlust) und grünen (Amplifikation) Pfeilen sind die Positionen der Mikrosatelliten aus der LOH-Analyse markiert. Exemplarisch sind auch Mikrosatelliten angegeben, bei denen in der CGH der Cutoff nicht erreicht wird (siehe Text). Alle 41 Abbildungen finden sich im Anhang, Kapitel 9.1.

Zwar finden sich hier Übereinstimmungen zwischen LOH und CGH, jedoch kommt es in vielen Bereichen mit auffälligen Mikrosatellitenmarkern in der CGH nur zu einer Annäherung an den Cutoff, ohne dass dieser erreicht wird.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die Mikrosatellitenanalyse gegenüber dem konventionellen CGH-Verfahren eine höhere Sensitivität besitzt. Durch ihr höheres Auflösungsvermögen eignet sie sich ferner besser für die Eingrenzung bestimmter Genloci, wie sie später in dieser Arbeit zur Anwendung kommen wird. Nichtsdestowenig konnten die LOH-Daten durch die differenzierte Betrachtung der CGH-Ergebnisse in den meisten Fällen bestätigt werden. Diese lieferten so einen wichtigen Beitrag zur Datenverifizierung.

3.3 Statistische RNA Microarray-Auswertung⁴

Eine im Rahmen eines anderen Forschungsprojektes in unserem Labor durchgeführte Array Analyse von Prostatakarzinom-Proben, sowie die statistische Auswertung haben maßgeblich zu der Auswahl der in der Expressionsanalyse untersuchten Genen beigetragen.

Dabei wurde RNA von sechs Prostatanormal- und 22 Prostatakarzinomproben wie unter *Kapitel 2.14* beschrieben auf HG-U133A (Affymetrix GenChip[®]) Mikroarrays analysiert. Die Rohexpressionsdaten wurden über die VSN-Normalisierungs-Prozedur normalisiert [Huber, 2002]. Danach wurden die Expressionsdaten auf Proben mit Lokalisation auf Chromosom 8 und 13 reduziert und für jeden Probensatz wurde getrennt ein t-Test mit gleichen Varianzen zwischen Tumor- und Normalgewebeproben berechnet. Die resultierenden p-Werte wurden für multiples Testen nach der false discovery rate (fdr) Methode korrigiert [Benjamini, 2001].

In der veröffentlichten Arbeit [Schulz, 2007] wurde der Zusammenhang von molekularen Veränderungen auf Chromosom 8 und LINE-1-Hypomethylierung im Prostatakarzinom anhand bioinformatischer Auswertung von Daten aus Methylierungsanalysen, CGH und Arrayanalyse untersucht. Dabei scheinen sich die beiden Veränderungen nicht kausal zu beeinflussen. Vielmehr wirken sie konvergierend-synergistisch auf Immunsuppression sowie Veränderungen von Zytoskelett wie auch extrazellulärer Matrix und tragen so zur Progression des Prostatakarzinoms bei. Hier sollen die Daten aus dieser Analyse bezüglich Chromosom 8p kurz zusammengefasst werden.

Bei der statistischen Auswertung wurden die Expressionsprofile verschiedener Tumorgruppen mit dem der Normalproben verglichen, nämlich zunächst die aller 22 Tumorproben und dann die der 6 Tumorproben mit LOH (Proben 95, 101, 139, 145, 219, 232). Dabei wurde die Auswahl an untersuchten Genen auf diejenigen auf Chromosom 8 und weiter auf 8p beschränkt. Dabei ergaben sich eine ganze Reihe differentiell (statistisch signifikant erhöht beziehungsweise erniedrigt in Bezug auf die Normalproben) exprimierter Gene. *Abbildung 3.3-1* gibt hier einen Überblick. Vergleichend sind noch die Daten von Chromosom 8q dargestellt.

Dabei fällt auf, dass sich das Verhältnis der herunter- und hochregulierten Gene von der Gruppe aller Tumorproben zu der kleineren Gruppe mit LOH auf 8p umkehrt: In der Gruppe, in der sämtliche Tumorproben untersucht wurden überwiegen die hochregulierten Gene (21:31 Gene),

⁴ Freundlicherweise durchgeführt von Adrian Alexa und Prof. Dr. Jörg Rahnenführer, Max-Planck Institut für Informatik, Saarbrücken, bzw. Institut für Statistik, Universität Dortmund.

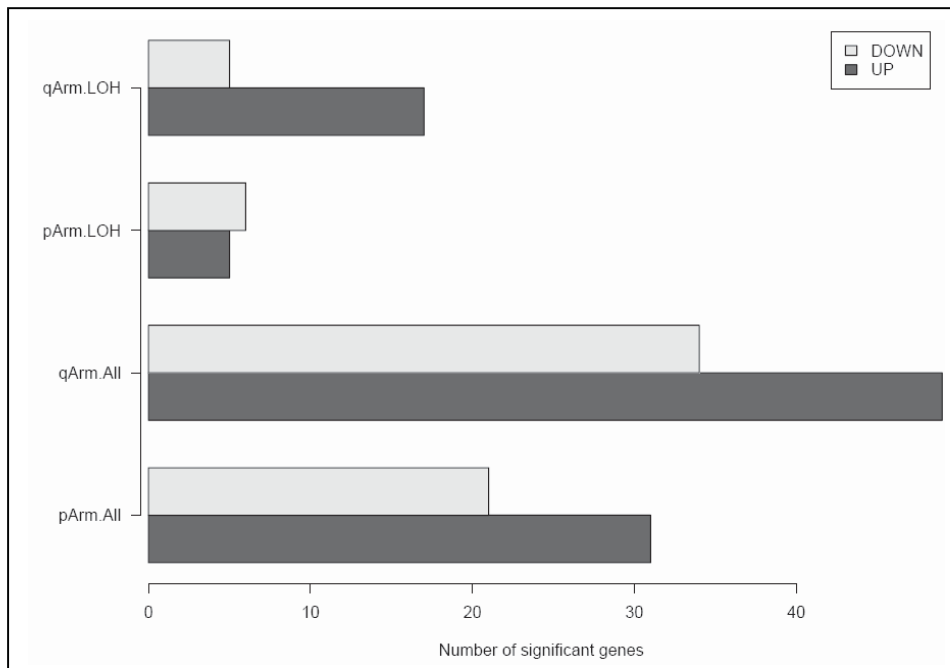
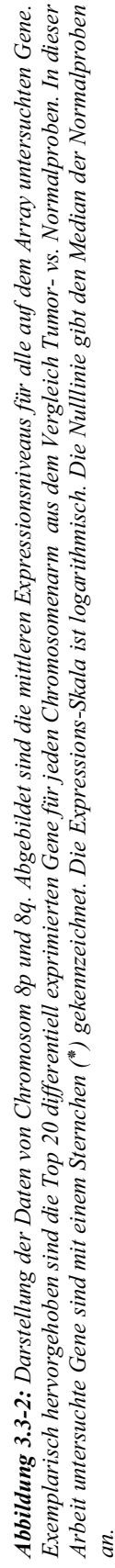


Abbildung 3.3-1: Anzahl der differentiell exprimierten Gene auf 8p und 8q für alle Berechnungen. Die Balken zeigen die Anzahl der hoch- (up) bzw. runter- (down) regulierten Gene. LOH: Gene aus der Berechnung Tumorproben mit LOH vs. Normalproben, All: Gene aus der Berechnung alle Tumorproben vs. Normalproben

während in der Gruppe der Tumorproben mit LOH die herunterregulierten Gene in der Überzahl sind. Bei Betrachtung von Chromosom 8q dagegen findet man in der Gruppe mit LOH auf 8q deutlich weniger herunterregulierte beziehungsweise deutlich mehr hochregulierte Gene als in der Gruppe, die alle Tumorproben umfasst (4:16 zu 34:48 Gene), wobei sich das Verhältnis hier nicht umkehrt. Interessant ist aber auch der Vergleich des Verhältnisses von hoch- und herunterregulierten Genen der Gruppen mit LOH: auf 8p kehrt sich das Verhältnis zugunsten der herunterregulierten Gene um, während es sich für 8q in Richtung der hochregulierten Gene „schärft“. Vor dem Hintergrund des mechanistischen Zusammenhangs zwischen Verlusten genetischen Materials auf 8p und Zugewinns auf 8q [Kindich, 2006], stellt sich die Frage, ob hier die Auswirkungen dieses Zusammenhangs auf Expressionsniveau deutlich werden.

Abbildung 3.3-2 und 3.3-3 geben einen Überblick über die Verteilung der differentiell exprimierten Gene für Chromosom 8 und 13q. Tabelle 3.3-1 und 3.3-2 führen die signifikant ($p < 0,05$) herunter- beziehungsweise hochregulierten Gene für Chromosom 8 auf, aus denen für die weitere Untersuchung fünf ausgewählt wurden (Abbildung 3.3-4)



an.

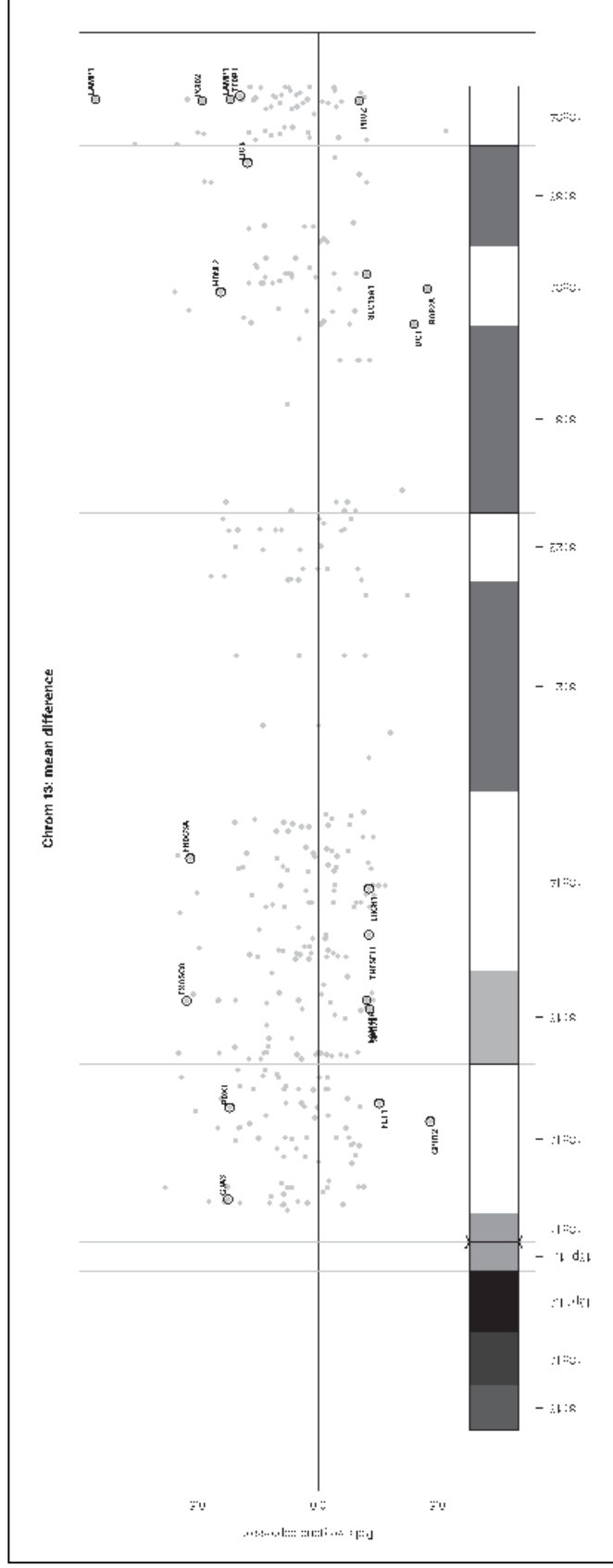


Abbildung 3.3-3: Darstellung der Daten von Chromosom 13q. Abgebildet sind die mittleren Expressionsniveaus für alle auf dem Array untersuchten Gene. Exemplarisch hervorgehoben sind die Top 20 differentiell exprimierten Gene für Chromosomenarm 13q aus dem Vergleich Tumor- vs. Normalproben. Die Expressions-Skala ist logarithmisch. Die Nulllinie gibt den Median der Normalproben an.

Tabelle 3.3-1: Differentiell **herunterregulierte** Gene auf Chromosom 8p. Die *p*-Werte sind auf der Basis aller Arrays kalkuliert, die letzte Spalte enthält die *fdr*-korrigierten *p*-Werte.

Gen-Symbol	Gen-Name	Korrigierter p-Wert
<i>PROSC</i>	proline synthetase co-transcribed homolog (bacterial)	8.4e-06
<i>FAM86B1</i>	family with sequence similarity 86, member B1	9.3e-06
<i>NAT2</i>	N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)	1.1e-05
<i>CHRNA3</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 3	3.7e-05
<i>DOCK5</i>	dedicator of cytokinesis 5	9.7e-05
<i>MSR1</i>	macrophage scavenger receptor 1	9.7e-05
<i>ZNF395</i>	zinc finger protein 395	9.7e-05
<i>FGFR1</i>	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	0.00017
<i>ASAH1</i>	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	0.00044
<i>TEX15</i>	testis expressed 15	0.00051
<i>DLGAP2</i>	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2	0.00054
<i>VDAC3</i>	voltage-dependent anion channel 3	0.00068
<i>PPP3CC</i>	protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, gamma isoform	0.00084
<i>MTMR7</i>	myotubularin related protein 7	0.00240
<i>ZMAT4</i>	zinc finger, matrin type 4	0.00249
<i>FKSG2</i>	apoptosis inhibitor	0.00461
<i>REEP4</i>	receptor accessory protein 4	0.00461
<i>TACC1</i>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	0.00566
<i>SPAG11B</i>	sperm associated antigen 11B	0.00566
<i>WHSC1L1</i>	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	0.01037
<i>DEFA5</i>	defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	0.01501
<i>MSRA</i>	methionine sulfoxide reductase A	0.01735
<i>BLK</i>	B lymphoid tyrosine kinase	0.01753
<i>EPB49</i>	erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin)	0.02212

Tabelle 3.3-2: Differenziell **herauf**regulierte Gene auf Chromosom 8p.

Gen-Symbol	Gen-Name	Korrigierter p-Wert
<i>PCMI</i>	pericentriolar material 1	3.9e-08
<i>NRG1</i>	neuregulin 1	2.1e-07
<i>PPP2CB</i>	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	3.7e-07
<i>ANGPT2</i>	angiopoietin 2	1.3e-06
<i>SFTPC</i>	surfactant, pulmonary-associated protein C	1.2e-05
<i>TNKS</i>	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	1.5e-05
<i>HR</i>	hairless homolog (mouse)	2.6e-05
<i>MTUS1</i>	mitochondrial tumor suppressor 1	2.8e-05
<i>ELP3</i>	elongation protein 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	4.1e-05
<i>IKBKB</i>	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	0.00017
<i>DCTN6</i>	dynactin 6	0.00067
<i>FNTA</i>	farnesyltransferase, CAAX box, alpha	0.00105
<i>ATP6V1B2</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2	0.00105
<i>PDLIM2</i>	PDZ and LIM domain 2 (mystique)	0.00106
<i>CHMP7</i>	CHMP family, member 7	0.00106
<i>XPO7</i>	exportin 7	0.00205
<i>KIAA1967</i>	KIAA1967	0.00212
<i>PTK2B</i>	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	0.00242
<i>NKX3.1</i>	NK3 homeobox 1	0.00259
<i>MYST3</i>	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3	0.00348
<i>ASH2L</i>	ash2 (absent, small, or homeotic)-like (<i>Drosophila</i>)	0.00366
<i>SH2D4A</i>	SH2 domain containing 4A	0.00492
<i>PSD3</i>	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	0.00592
<i>BMP1</i>	bone morphogenetic protein 1	0.00609
<i>LEPROTL1</i>	leptin receptor overlapping transcript-like 1	0.00723
<i>GSR</i>	glutathione reductase	0.00810
<i>DUSP4</i>	dual specificity phosphatase 4	0.00941
<i>CNOT7</i>	CCR4-NOT transcription complex, subunit 7	0.00995
<i>WRN</i>	Werner syndrome	0.00998
<i>LZTS1</i>	leucine zipper, putative tumor suppressor 1	0.01090
<i>TNFRSF10B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	0.01115
<i>SFRP1</i>	secreted frizzled-related protein 1	0.01115
<i>EXTL3</i>	exostoses (multiple)-like 3	0.01193
<i>KIF13B</i>	kinesin family member 13B	0.01299
<i>ENTPD4</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	0.01436
<i>ADAM28</i>	ADAM metallopeptidase domain 28	0.01816
<i>TUSC3</i>	tumor suppressor candidate 3	0.02109
<i>GATA4</i>	GATA binding protein 4	0.03151

Eine Anzahl von Genen auf 8q und 13q, welche von dieser Analyse ebenfalls hervorgehoben wurden, sind bereits im Rahmen des Prostatakarzinoms untersucht worden. Zum Beispiel ist TRAM1, das auf 8q13 für den Steroidrezeptor-Koaktivator SRC3 kodiert, im Prostatakarzinom überexprimiert [Zhou, 2005]. RAD21 wurde als Ziel von 8q-Amplifikationen im Prostatakarzinom entdeckt [Porkka, 2004]. Das am stärksten überexprimierte Gen YWHAZ kodiert das 14-3-3 Θ -Protein. Es wurde bis dato noch nicht im Prostatakarzinom untersucht, aber andere Mitglieder dieser Familie finden sich in dieser Karzinomart häufig verändert [Hermeking, 2006]. Unter den möglicherweise herunterregulierten Genen auf 8q könnte RUNX1, das für das AML1-Protein kodiert, von besonderem Interesse sein, da es im Prostatakarzinom und metastatischen Tumoren eine regulatorische Rolle zu haben scheint [Fowler, 2006; Pratap, 2006]. Von den herunterregulierten Genen auf 13q wurde FAM 48A (auch C13orf19) ausführlich als möglicher Tumorsuppressor im Prostatakarzinom studiert [Schmidt, 2005]. FLT1 zeigte sich in Prostatakarzinomzelllinien hypermethyliert [Yamada, 2003], TNFSF11 kodiert das RANKL-Zytokin, wichtig bei der Entwicklung von Knochenmetastasen und RAP2A hemmt Androgenrezeptor-vermittelte Prozesse [Bigler, 2007].

Wir fokussierten dann aber auf Gene auf Chromosom 8p (siehe *Tabellen 3.3-1* und *3.3-2*, *Abbildung 3.3-4*).

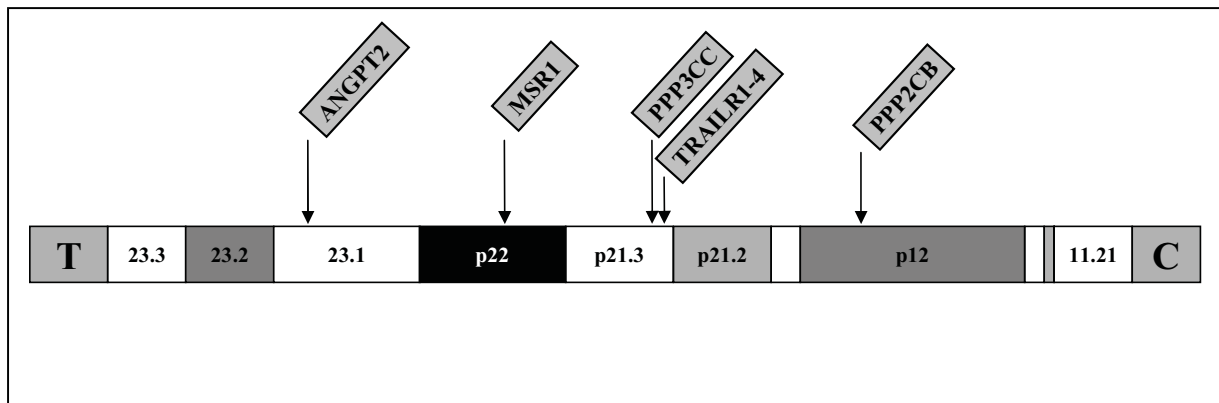


Abbildung 3.3-4: Schematische Übersicht über den Chromosomenarm 8p (T: Telomer, C: Centromer) und die ausgewählten Gene.

Aus der Liste der Gene mit differentieller Expression auf Chromosom 8p wählten wir verschiedene Kandidaten auf Grund ihrer potentiellen biologischen Rolle beim Prostatakarzinom aus.

Von besonderem Interesse war hierbei das Auftauchen des Gens TRAILR2/DR5/TNFRSF10B. Es reguliert als Rezeptor in einem komplexen Zusammenspiel mit anderen Rezeptoren die Wirkung des apoptoseinduzierenden Liganden TRAIL möglicherweise auch im Prostatakarzinom. Drei sehr ähnliche Rezeptoren (TRAILR1/DR4/TNFRSF10A/Apo2, TRAILR4/DcR2/TNFRSF10D/TRUNDD, DcR1/TRAILR3/TNFRSF10C/TRID) liegen in unmittelbarer räumlicher Nähe zu DR5 auf Chromosom 8p, was uns dazu bewogen hat diese drei Gene ebenfalls in die Expressionsanalyse mit aufzunehmen. TRAILR5/OPG/TNFRSF11B liegt als fünfter TRAIL-Rezeptor ebenfalls auf Chromosom 8, jedoch auf dem langen Arm 8q, wurde aber trotzdem ausgewählt, um alle TRAIL-Rezeptoren in die Untersuchung miteinbeziehen zu können. Von den insgesamt 14 untersuchten Genen waren CSMD1, DR4 und SPRY2 nicht auf dem Expressionsarray-Gen-Chip repräsentiert.

Die Daten zu NKX3.1 und SPRY2 wurden freundlicherweise von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bereitgestellt (siehe unten). SPRY2 wurde in die Analyse aufgenommen, da es auf 13q liegt und bereits in anderem Zusammenhang untersucht worden war [Fritzsche, 2006] und somit als einziges Gen den Abgleich der in der LOH-Analyse erhobenen Daten von diesem Chromosomenabschnitt erlaubte.

3.4 Expressionsanalyse ausgewählter Gene

Um der Frage nachzugehen, in welcher Weise sich substantielle Veränderungen auf genetischer Ebene im Sinne einer allelischen Imbalance/Gendosisveränderung auf das transkriptionelle Niveau von Genen der betroffenen Genomabschnitte auswirken, wurde der LOH-Analyse im zweiten Schritt eine Expressionsanalyse ausgewählter Gene auf Chromosom 8p angeschlossen. Dabei ging es zum einen um die Identifikation potentieller Tumorsuppressor- beziehungsweise Onkogene auf diesem im Prostatakarzinom so oft von genetischen Aberrationen betroffenen Chromosomenarm. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die untersuchten Gene.

Zum anderen galt es, den Zusammenhang zwischen ebendiesen Unregelmäßigkeiten auf genetischer Ebene (LOH-Daten) und den Auswirkungen auf die Expression von Genen auf Chromosom 8p zu untersuchen.

Tabelle 3.4-1: Übersicht über die in der Expressionsanalyse untersuchten Gene mit Informationen über chromosomale Region, Auswahlkriterium, Expressionsdaten aus der Arrayanalyse (runter: herunterreguliert, hoch: hochreguliert) und Funktion.

Genname	Chr.-Region	Auswahlkriterium	Expression in Arrayanalyse (Tu vs. N)	Funktion
DLC1	8p22	Kandidatengen	unverändert	Hemmung onkogener Prozesse
FGFR1	8p12	Kandidatengen	runter	Wachstumsfaktor-Rezeptor
CSMD1	8p23.2	Kandidatengen	nicht repräsentiert	Adhäsionsmolekül?
MSR1	8p22	Arrayanalyse	runter	Immunreaktion, hereditäres Prostatakarzinom
ANGPT2	8p31.1	Arrayanalyse	hoch	Angiogenese-Regulation
PPP2CB	8p12	Arrayanalyse	hoch	Einfluss auf multiple Zellfunktionen
PPP3CC	8p21.3	Arrayanalyse	runter	Pro- und antiapoptotische Wirkung
TRAILR1, DR4	8p21.3	Arrayanalyse	nicht repräsentiert	Apoptoseinduktion
TRAILR2, DR5	8p21.3	Arrayanalyse	hoch	Apoptoseinduktion
TRAILR3, DcR1	8p21.3	Arrayanalyse	unverändert	Hemmung der Apoptoseinduktion
TRAILR4, DcR2	8p21.3	Arrayanalyse	unverändert	Hemmung der Apoptoseinduktion
TRAILR5, OPG	8q24.12	Arrayanalyse	unverändert	Hemmung der Apoptoseinduktion
NKX3.1⁵	8p21.2	Kandidatengen	hoch	Entwicklung- und Differenzierung der Prostata
SPRY2⁶	13q31.1	Lage auf 13q	nicht repräsentiert	Modulation und Inhibition von EGF- und FGF-Signalwegen

Bei allen Versuchen diente in cDNA umgeschriebene RNA als Grundlage für die Expressionsanalyse in Form einer RT-PCR. Um die Expression der Gene besser einschätzen zu können, wurden gleichzeitig die Sequenzabschnitte eines Haushaltsgens amplifiziert. Zu Beginn der Arbeit wurde im Falle von DLC1 und FGFR1 β -Aktin, bei den restlichen Genen das Tatabox-Binding-Protein-Gen (TBP) verwendet. Durch Angleichung der Genexpression an das Expressionsniveau der Referenzgene (β -Aktin, TBP) ergab sich somit eine (korrigierte) relative Expression. Im Falle von CSMD1 wurden beide Haushaltsgene mitgeführt. Somit war es möglich für jede Tumor- und Normalprobe das Verhältnis von Aktin- und TBP-Expression zu berechnen. Dies war wichtig, denn TBP stellte sich nach den ersten Versuchsreihen als präziseres Haushaltsgen dar, da die β -Aktin-Expression in Prostatakarzinomgeweben teilweise als erhöht beschrieben worden war. Über das in der CSMD1 errechnete β -Aktin/TBP-Verhältnis war es dann möglich, die β -Aktin korrelierten Expressionswerte für DLC1, FGFR1 und SPRY2 an das

⁵ Freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Masanori Yamanaka

⁶ Freundlicherweise bereitgestellt von Frau Sandy Fritzsche

Expressionsniveau von TBP anzugleichen. Dazu wurden die β -Aktin-korrelierten DLC1-, FGFR1- und SPRY2-Expressionswerte für jede Probe mit dem Quotienten aus β -Aktin-/TBP-Expression der entsprechenden Probe aus der CSMD1-Messreihe multipliziert. Somit ergaben sich für alle untersuchten Gene relative Expressionsdaten bezogen auf das Haushaltsgen TBP.

Zunächst wählten wir nach eingängiger Literaturrecherche drei Kandidatengene aus (DLC1, FGFR1, CSMD1), die relativ gleichmäßig über Chromosom 8p verteilt lagen.

Die oben beschriebene Array-Analyse lieferte eine Gruppe von interessanten Kandidatengenen auf Chromosom 8p, die noch um die TRAIL-Rezeptor-Familie ergänzt wurde. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die untersuchten Gene einzeln dargestellt. Bei der statistischen Auswertung wurden jeweils dieselben Tests durchgeführt, wobei die Expression im Normalgewebe mit verschiedenen Tumorgruppen (alle Tumoren, Tumoren mit LOH auf 8p, Tumoren mit LOH in unmittelbarer Nähe des Genlokus) und in Bezug auf unterschiedliche Prognoseparameter (Gleason-Summe, pT-Stadium, Lymphknotenstatus, Rezidivstatus) untersucht wurde. Zum Vergleich von zwei unabhängigen, in der Regel nicht normalverteilten, Stichproben diente als nichtparametrischer Test der Mann-Whitney-U-Test, für die Korrelation der Expressionsdaten mit dem Gleason-Grad der Kruskal-Wallis-Test als nichtparametrisches Verfahren für „K“ unabhängige Stichproben. Dabei bedeutet die Eingrenzung auf den Genlokus, dass nur diejenigen Tumorproben eingeschlossen sind, bei denen die Mikrosatellitenmarker beidseits des Genlokus wenigstens einen LOH zeigten.

Untersucht wurde die Expression der Gene in 45 Tumorproben (außer CSMD1, hier 43 Tumorproben) und 13 Normalgewebeproben (außer DLC1 und FGFR1, hier 10 Normalproben, SPRY2 7 Normalproben).

3.4.1 DLC1 (Deleted in Liver Cancer Gene 1)

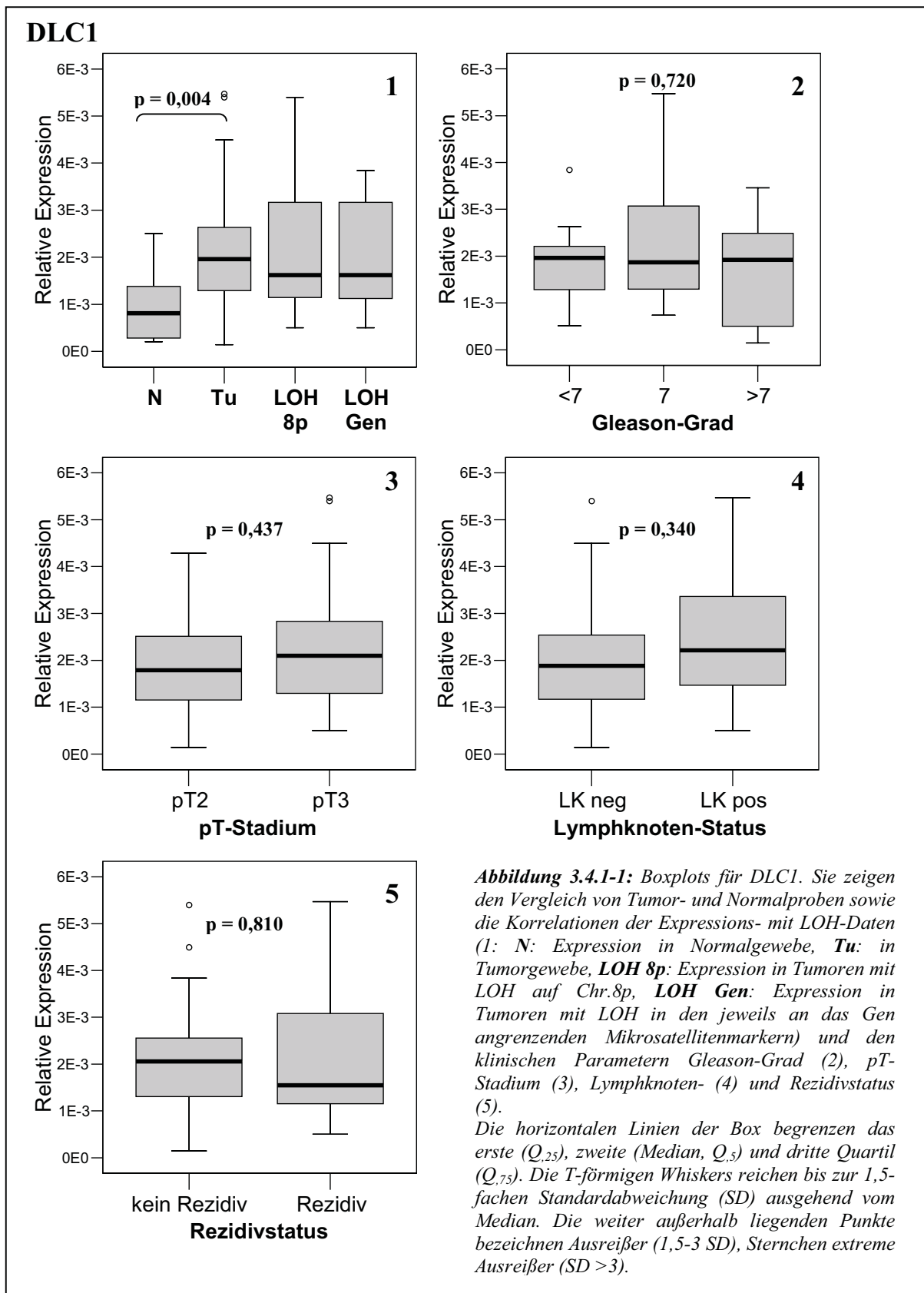
DLC1 zeigte – unerwarteter Weise - eine statistisch signifikant deutlich erhöhte Expression in Tumorproben verglichen mit der in Normalgewebe ($p = 0,004$). Die Eingrenzung auf die LOH-Daten brachte dabei keinen Signifikanzanstieg.

Bei Betrachtung des Gleason-Grades zeigt sich eine Tendenz zu abnehmenden Expressionswerten bei höheren Gleason-Summen > 7 , die aber keine statistische Signifikanz erreicht ($p = 0,720$). In allen anderen Berechnungen (pT-Gruppe, LK-Status und Rezidivstatus) sind die Expressionswerte in der prognostisch ungünstigeren Gruppe leicht erhöht, erreichen aber kein signifikant unterschiedliches Niveau.

3.4.2 FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Gene)

Bei dem Vergleich Tumor- versus Normalgewebe zeigte sich eine leicht, wenn auch nicht signifikant erhöhte Expression von FGFR1 in der Tumorgruppe ($p = 0,663$). Beim Abgleich mit den Ergebnissen aus der LOH-Analyse zeigt sich jedoch, dass die Signifikanz mit zunehmender Einengung auf den Genlocus zunahm. So lag das Signifikanzniveau im Vergleich Normal- gegen Tumorproben mit einem LOH irgendwo auf 8p bei $p = 0,567$ und erreicht im Vergleich mit Tumoren mit LOH in der Nähe des Genbereichs bei 8p12 ein Niveau von $p = 0,230$. Während sich beim Gleason-Grad und bei Betrachtung der lokoregionalen Ausbreitung, sowie des Rezidivstatus keine auffälligen Veränderungen der Expressionswerte zeigten ($p = 0,824$ und $p = 0,508$, sowie $p=0,883$), fanden sich bei der Korrelation mit dem Lymphknotenstatus eine tendenziell erhöhte Expression in Tumorproben mit prognostisch ungünstigeren Parametern ($p = 0,223$).

Betrachtet man das Auftreten einer Allelischen Imbalance in Form von LOH, neben dem N-Status als ungünstigen Prognoseparameter, so scheint eine erhöhte FGFR1-Expression eher in aggressiven und fortgeschrittenen Prostatakarzinomen aufzutreten. Fraglich scheint hierbei nur, warum die Expression von FGFR1 zunimmt, wenn durch LOH genetisches Material verloren geht.



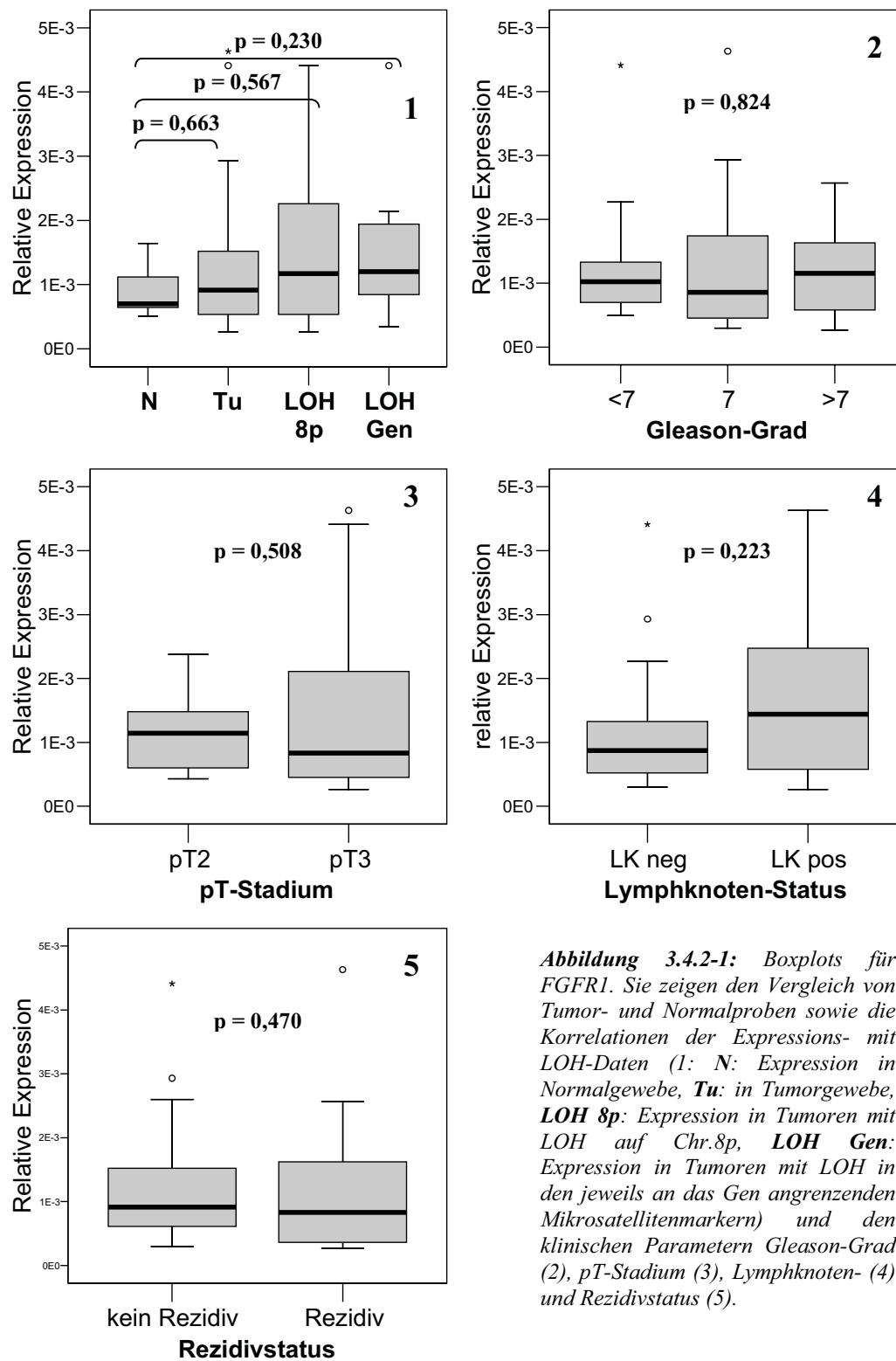
FGFR1

Abbildung 3.4.2-1: Boxplots für FGFR1. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, Tu: in Tumorgewebe, LOH 8p: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, LOH Gen: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

3.4.3 CSMD1 (CUB and Sushi Multiple Domains 1 Gene)

Die CSMD1-Expression zeigte weder im Tumorgewebe, noch in Tumoren mit LOH eine auffällig veränderte Expression, sie war vielmehr gleichbleibend, verglichen mit der Expression in Prostatanormalgewebe ($p = 1,000$). Allerdings fand sich eine deutlich signifikante Korrelation mit der Gleason-Summe ($p = 0,025$), wobei eine besonders starker Expressionssprung zwischen Gleason-Summen kleiner beziehungsweise gleich 7 stattfand. Hier fällt die Expression rapide ab – Patienten mit einer Gleason-Summe 7 zeigten die niedrigsten Expressionwerte -, um bei Gleason-Summe > 7 wieder leicht anzusteigen.

Ähnlich wie bei den Korrelationen der LOH-Daten scheint hier die Gruppe der Prostatakarzinome der Gleason-Summe 7 eine gesonderte Rolle einzunehmen.

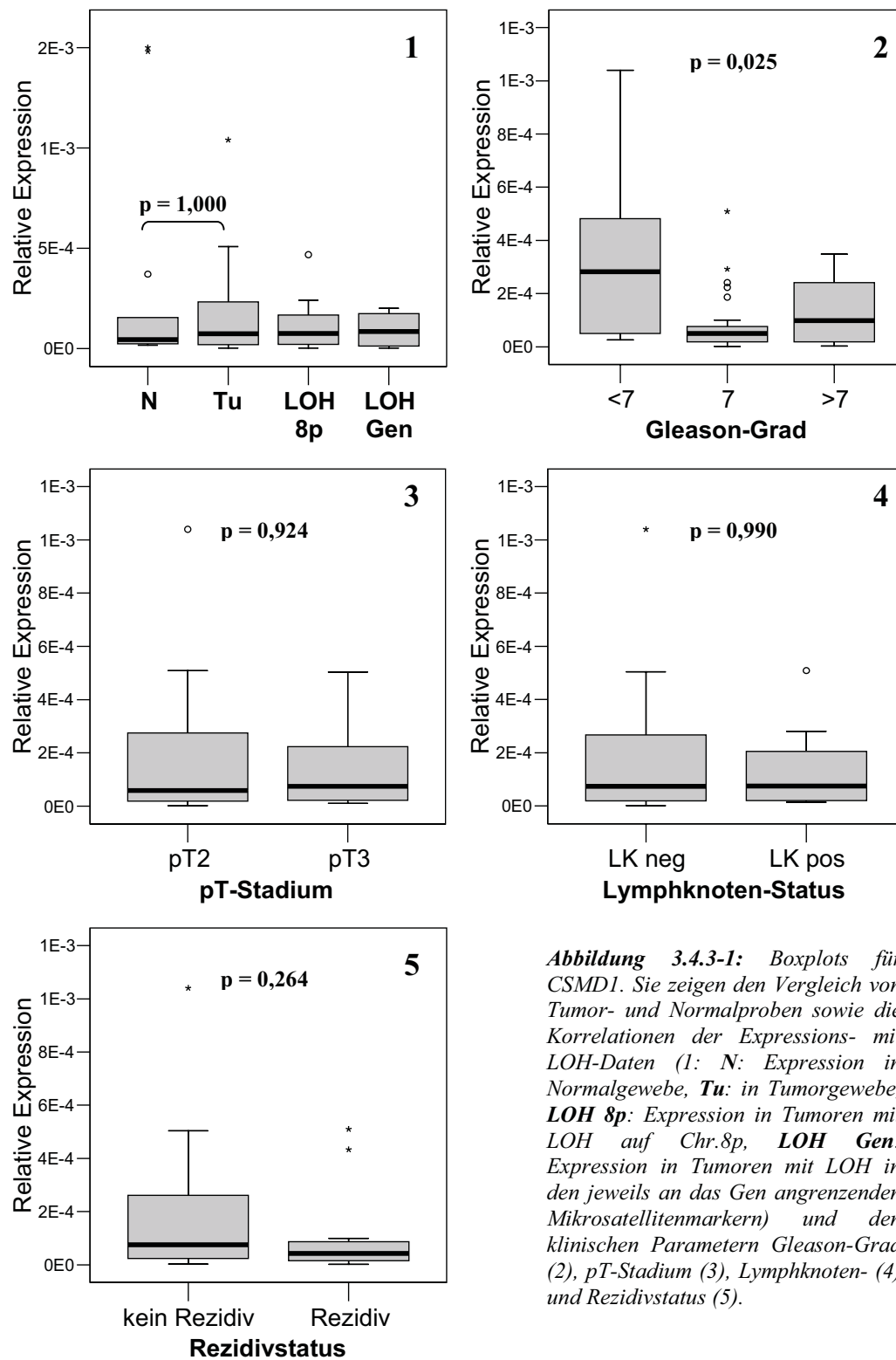
CSMD1

Abbildung 3.4.3-1: Boxplots für CSMD1. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, Tu: in Tumorgewebe, LOH 8p: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, LOH Gen: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

3.4.4 MSR1 (Macrophage Scavenger Receptor 1 Gene)

Im Tumor-Normalgewebevergleich wies die MSR1-Expression keine signifikanten Veränderungen auf ($p = 0,852$), sie war minimal erhöht. Gleiches gilt für den Vergleich mit der Tumorgruppe mit LOH auf 8p ($p = 0,856$), wobei hier die Expression im Vergleich zu der Gesamttumorgruppe leicht sank und diesen Trend in der Gruppe mit LOH im Genbereich weiter fortsetzte ($p = 0,277$). Auch beim Gleason-Grad zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, allenfalls in der Gruppe mit Werten größer sieben schien die Expression leicht erhöht ($p = 0,761$). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei Betrachtung des Abgleichs der Expressionsdaten mit der lokalen Tumorausbreitung. Die Expression war in Tumoren mit pT3-Stadium, im Gegensatz zu denen mit pT2-Stadium, leicht erhöht ($p = 0,545$). Noch deutlicher fiel dies bei der Korrelation mit dem Rezidivstatus aus. Hier war die Expression in der Gruppe mit Tumorrezidiv deutlich, wenn auch nicht signifikant, erhöht ($p = 0,262$). Einzig der Vergleich mit dem Lymphknotenstatus erreichte statistische Signifikanz ($p = 0,032$). Tumoren mit positivem Lymphknotenstatus zeigten eine deutlich höhere Expression als jene mit N0-Resektion.

Lässt man die sinkenden Expressionswerte in den LOH-Gruppen außer Acht, so ergibt sich das relativ einheitliche Bild einer steigenden MSR1 Expression in Tumoren mit ungünstigen Prognoseparametern (Gleason > 7 , pT3, Rezidiv, N+), wobei die Expression in Prostatatumoren allenfalls sehr milde erhöht schien und das Signifikanzniveau nur im Falle des Lymphknotenstatus erreicht wurde. Somit kann die Rolle von MSR1 als ein putatives Tumorgen im Prostatakarzinom hier zumindest nicht widerlegt werden.

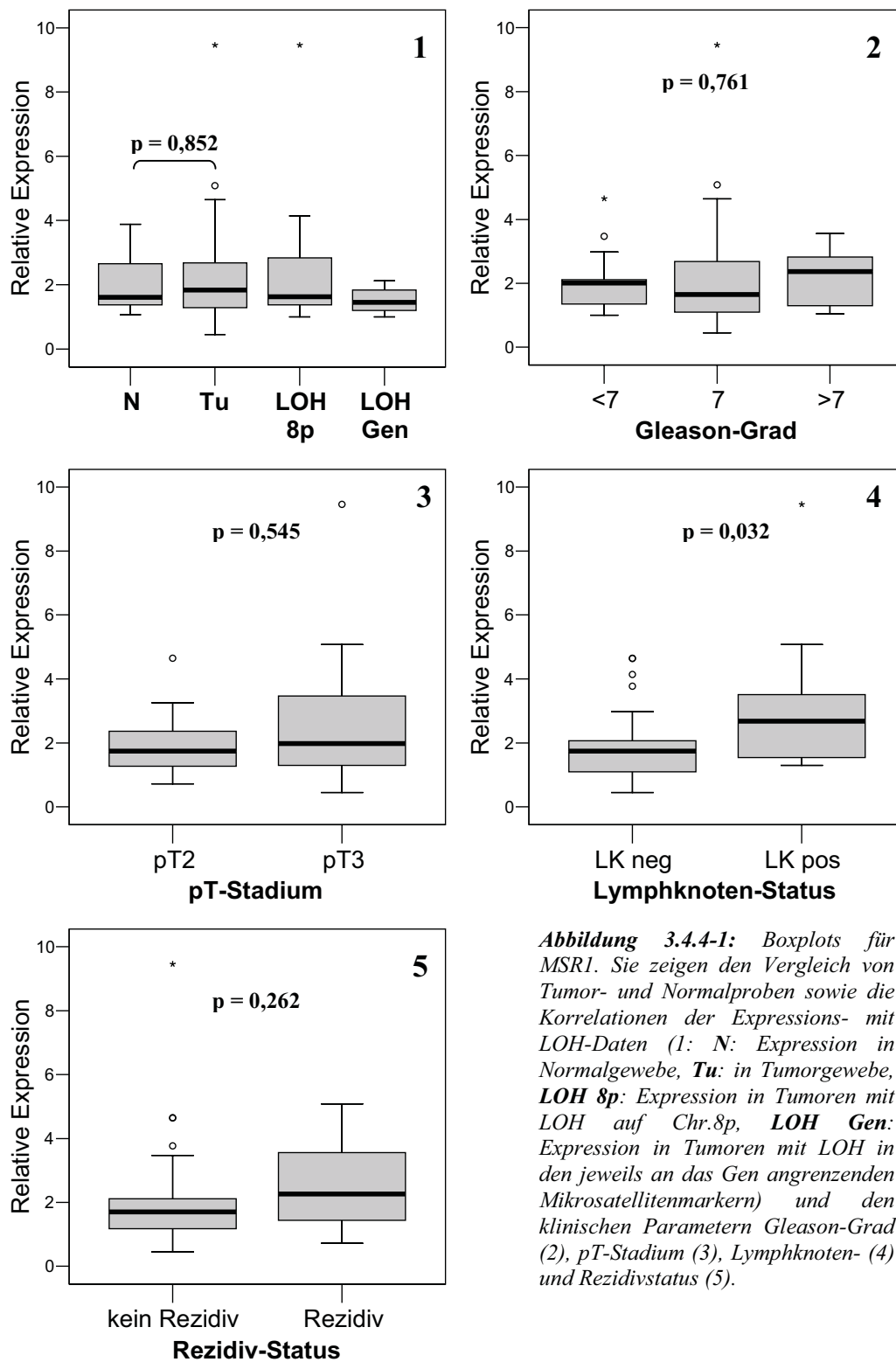
MSR1

Abbildung 3.4.4-1: Boxplots für MSR1. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, **Tu**: in Tumorgewebe, **LOH 8p**: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, **LOH Gen**: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

3.4.5 ANGPT2 (Angiopoetin 2 Gene)

In Tumor- und Normalgewebe zeigten sich fast identische Expressionswerte ($p = 0,978$), wobei die Expression bei Tumoren mit LOH ($p = 0,892$) beziehungsweise Tumoren mit LOH im Genbereich absank ($p = 0,485$) und dabei die Signifikanz der Korrelation zur Expression in Normalgewebe zunahm. Bei Betrachtung der Gleason-Summe fiel wiederum die Gruppe mit Gleasongrad 7 auf. Hier lag die Expression von ANGPT2 deutlich höher ($p = 0,267$) als in den Gruppen mit Summen kleiner beziehungsweise größer 7. Sowohl bei der Korrelation bezüglich pT-Stadium, Lymphknoten- und Rezidivstatus waren die jeweiligen Expressionswerte in den prognostisch ungünstigeren Gruppen leicht erhöht, ohne jedoch statistisch signifikant zu werden ($p_{pT} = 0,373$, $p_{LK} = 0,785$, $p_{RV} = 0,279$).

Zusammengefasst bietet sich kein einheitliches Bild. Möglicherweise spielt ANGPT2 – mit seiner Rolle als angiogenesefördernder Faktor - eher bei sehr schnell wachsenden, hochmalignen Tumorerkrankungen eine Rolle. Diese werden aber durch den heterogenen, häufig latenten Krankheitsverlauf des Prostatakarzinoms, sowie durch die in dieser Untersuchungsreihe spärlich vertretenen fortgeschrittenen Tumorstufen (nur 13% der Tumorproben besitzen eine Gleason-Summe größer 7, nur zwei Fälle mit pT4-Stadium) ungenügend vertreten.

Trotzdem kann aufgrund der erhöhten Expression von ANGPT2 in prognostisch ungünstigen Tumorsubgruppen, die These einer onkogenen Funktion nicht völlig widerlegt werden.

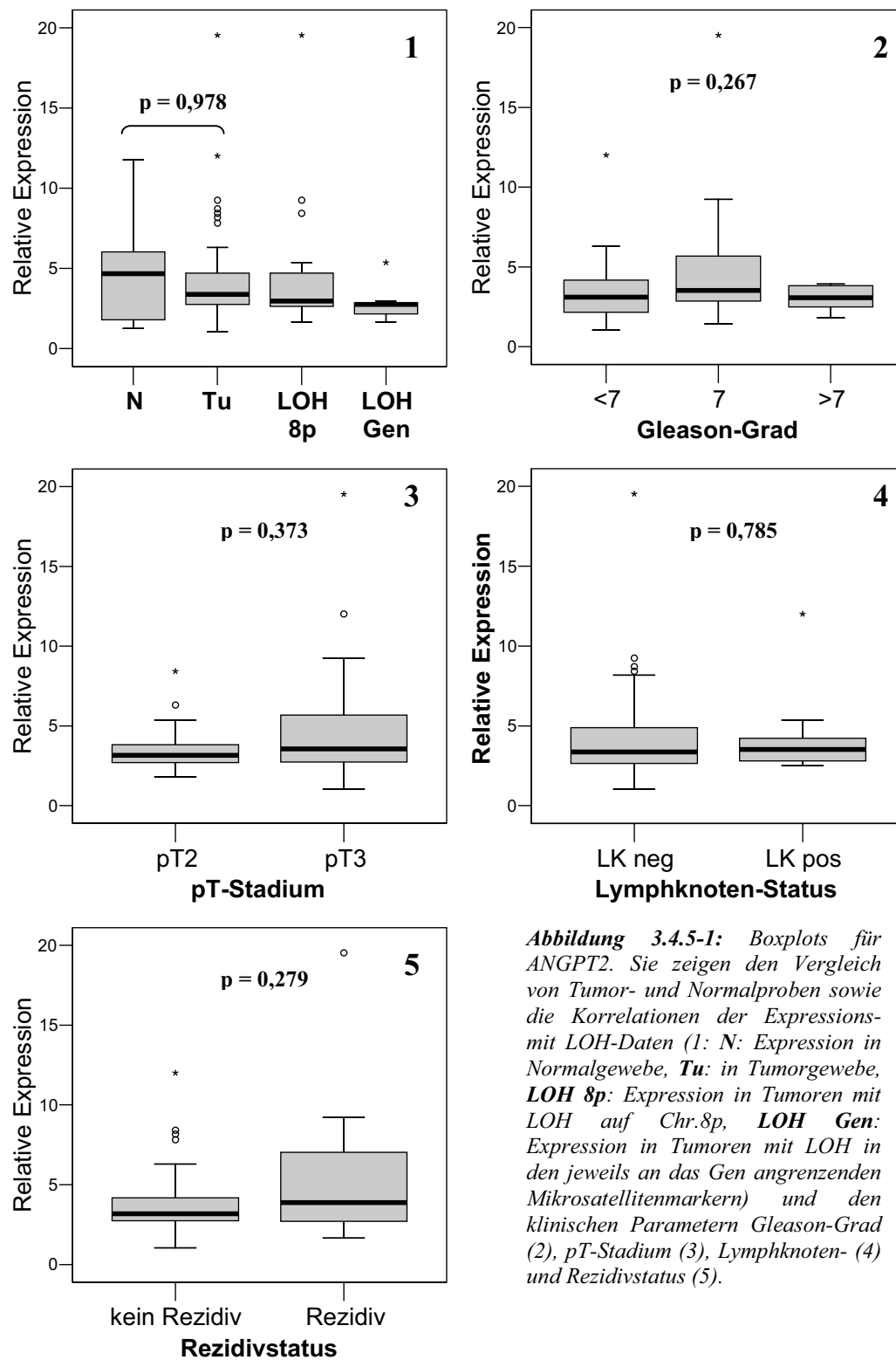
ANGPT2

Abbildung 3.4.5-1: Boxplots für ANGPT2. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, **Tu**: in Tumorgewebe, **LOH 8p**: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, **LOH Gen**: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

3.4.6 PPP2CB (Protein Phosphatase 2, Catalytic Subunit, Beta Isoform)

Die PPP2CB-Expression zeigte sich in den untersuchten Prostatakarzinomen signifikant erniedrigt ($p = 0,023$). Ferner sanken die Expressionswerte – und stieg das Signifikanzniveau – in den Tumorgruppen mit LOH ($p = 0,002$) und mit LOH im Genbereich ($p = 0,001$). Die Expression lag in der Tumorgruppe mit LOH auf 8p deutlich unter der ohne LOH ($p = 0,002$). Bei Betrachtung der Korrelation der Expressionsdaten mit der Gleason-Summe zeigte sich eine leicht erniedrigte Expression in der 7er-Gruppe im Vergleich zu den Tumorproben mit Gleasongraden größer beziehungsweise kleiner 7 ($p = 0,517$). Der Vergleich mit der lokalen Tumorausdehnung (pT-Stadium), dem Lymphknotenstatus und dem Auftreten von Rezidiven zeigte dagegen kaum Abweichungen innerhalb der Tumorgruppe: Die Expressionswerte lagen in den prognostisch ungünstigeren Gruppen sogar eher höher.

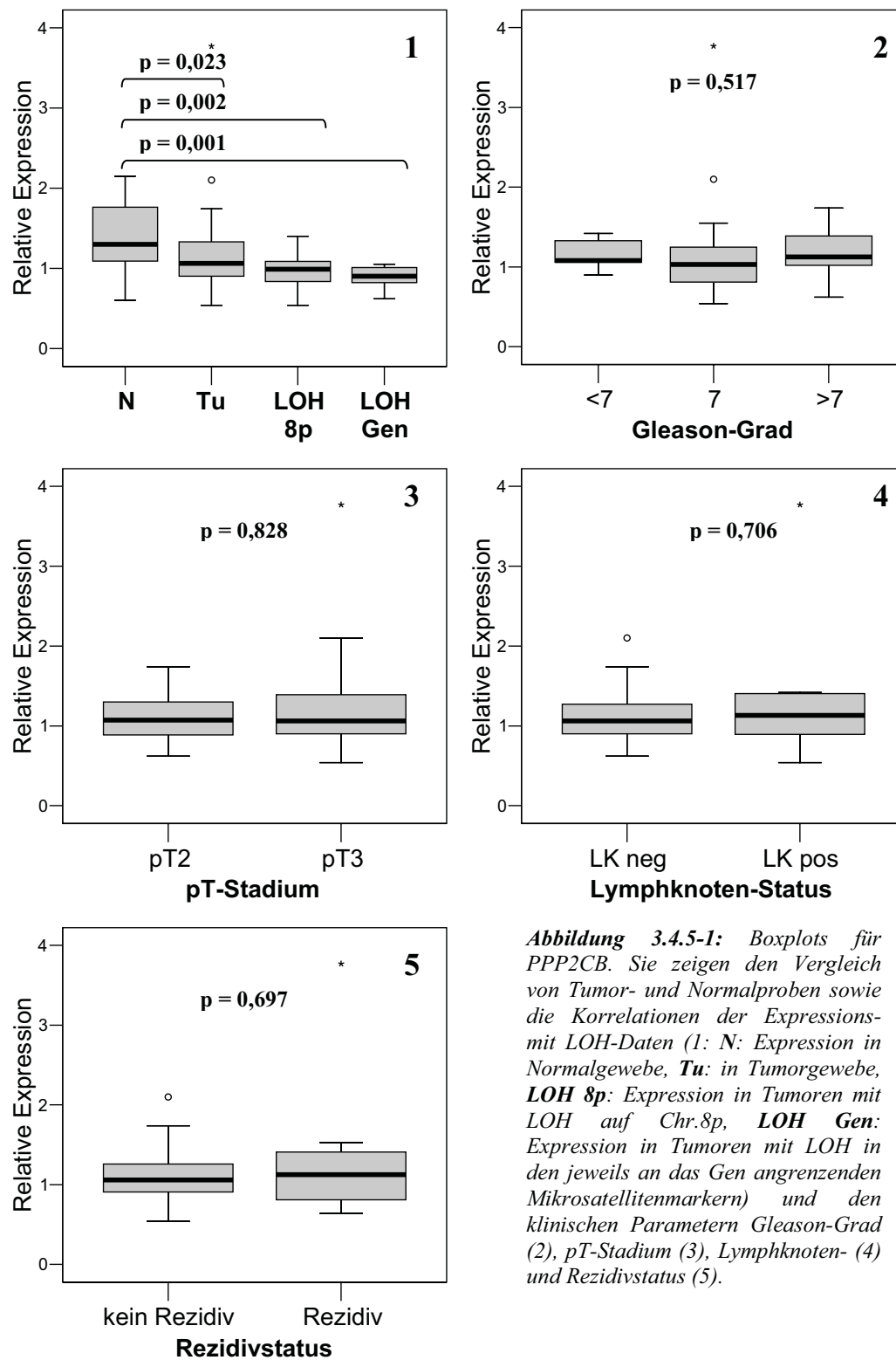
PPP2CB

Abbildung 3.4.5-1: Boxplots für PPP2CB. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, Tu: in Tumorgewebe, LOH 8p: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, LOH Gen: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

3.4.7 PPP3CC (Protein Phosphatase 3, Catalytic Subunit, Gamma Isoform)

PPP3CC zeigte eine signifikant erniedrigte Expression in allen Tumorgruppen im Vergleich zu Normalgewebe ($p = 0,002 - 0,007$). Dabei erbrachte die Eingrenzung auf Proben mit LOH eine weitere Signifikanzsteigerung. Die Genexpression lag in Tumorproben mit LOH signifikant unter der ohne LOH ($p = 0,023$). Bei der Betrachtung der prognostischen Parametern erreichten der Vergleich von Gewebeproben von Patienten mit und ohne Rezidiv deutlich signifikantes Niveau ($p = 0,003$). Dabei war die Expression von PPP3CC in der Rezidivgruppe stark erniedrigt.

PPP3CC

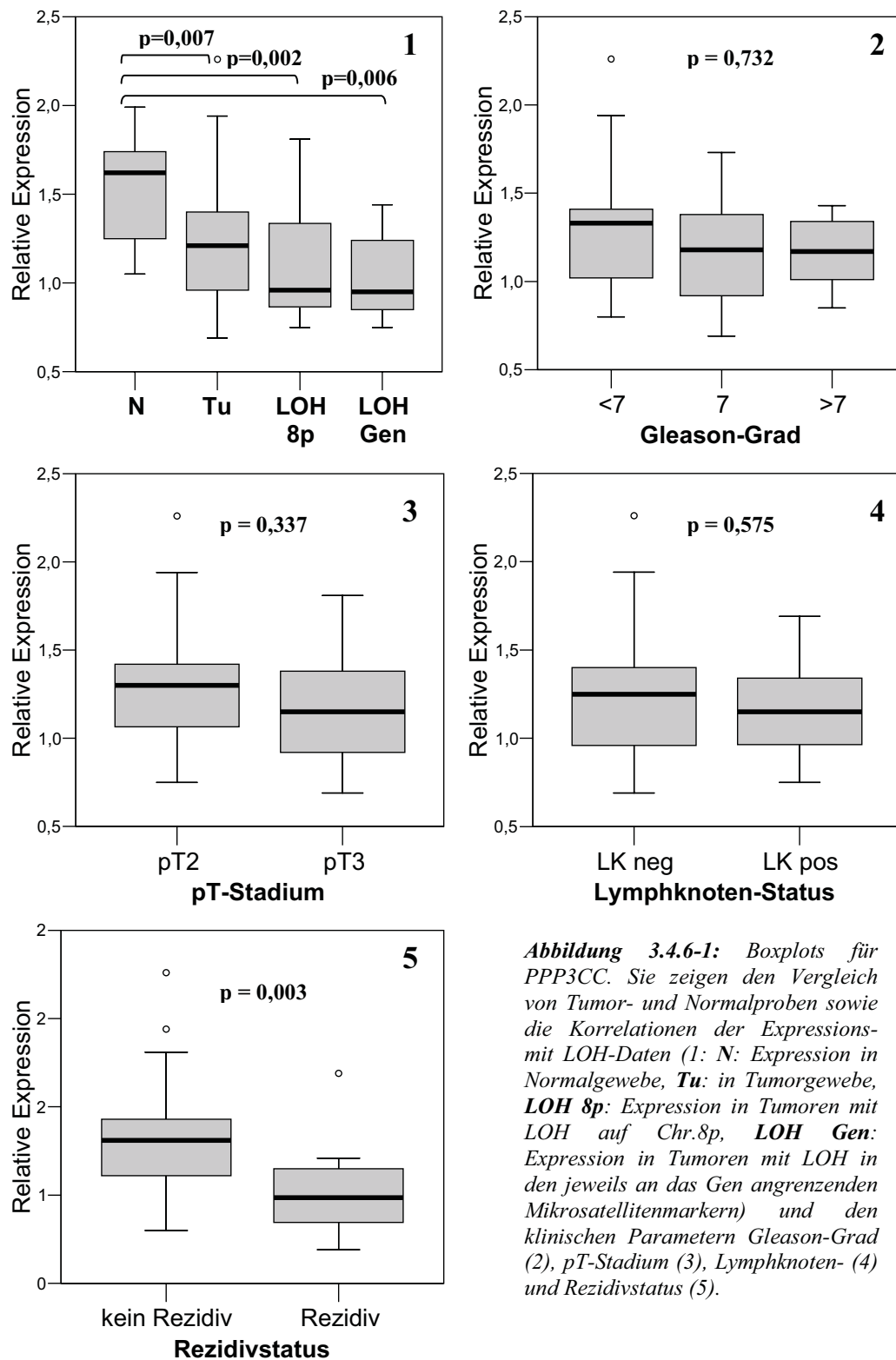


Abbildung 3.4.6-1: Boxplots für PPP3CC. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, **Tu**: in Tumorgewebe, **LOH 8p**: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, **LOH Gen**: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

3.4.8 TRAIL-Rezeptoren (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand-Receptors)

3.4.8.1 DR4/TRAIL R1/Apo2/TNFRSF10A

Keiner der durchgeführten Tests zeigte signifikante Veränderungen. Die Expression war in den Tumorgruppen leicht erniedrigt ($p = 0,569$) und zeigte bei Tumorproben mit Gleasonsumme größer sieben allenfalls eine leicht erniedrigte Expression ($p = 0,350$). Allein in der Tumorgruppe mit LOH zeigte sich die Expression im Vergleich zu der ohne LOH trendmäßig erniedrigt ($p = 0,061$).

3.4.8.2 DR5/TRAIL R2/TNFRSF10B

Während der Vergleich der Expression in Tumor- und Normalgewebeproben keinen signifikanten Unterschied lieferte, fiel dieser bei Betrachtung des Rezidivstatus deutlich signifikant aus ($p = 0,033$). Dabei lag die Expression in der Rezidivgruppe niedriger als in der ohne Auftreten eines Rezidivs. Ferner zeigte sich eine ganz deutlich reduzierte Expression in der Tumorgruppe mit LOH auf 8p verglichen mit der ohne LOH ($p = 0,00002$). Bei den sonstigen Parametern (Gleason-Summe, pT-Stadium, LK-Status) war die Expression in den prognostisch ungünstigeren Gruppen durchgehend niedriger als in jenen mit günstigeren Parametern.

3.4.8.3 DcR1/TRAIL R3/LIT/TRID/TNFRSF10C

Bei der Analyse der Expressionswerte des Decoy-Rezeptors 1 zeigte sich ein hochsignifikant erniedrigtes Niveau in den Tumorproben, das mit Eingrenzung auf die Proben mit LOH auf 8p noch zunahm ($p = 0,00016$ bis $p = 0,00002$). Auch hier lag die Expression in der Tumorgruppe mit LOH unter der ohne LOH auf 8p ($p = 0,002$).

Ebenfalls signifikant erwies sich die Expressionserniedrigungen in den Gruppen mit positivem Rezidivstatus ($p = 0,009$) und jenen im pT3-Stadium ($p = 0,049$). Zunehmende Entdifferenzierung im Sinne steigender Gleason-Summe und positiver LK-Status führten ebenfalls zu einer erniedrigten, wenn auch nicht signifikanten ($p = 0,234$, $p = 0,476$), Expression von DcR1.

3.4.8.4 DcR2/TRAIL R4/TRUNDD/TNFRSF10D

Auch DcR2 zeigte eine deutlich reduzierte Expression in den Tumorproben, die ebenfalls mit Eingrenzung auf die Proben mit LOH auf 8p im Vergleich Tumor versus Normal zunahm ($p = 0,048$, $p = 0,013$, $p = 0,016$). Sonst fanden sich keine signifikanten Veränderungen, die Expression kann in den anderen Berechnungen als allenfalls leicht erhöht, in Bezug auf prognostisch ungünstige Parameter, bezeichnet werden.

3.4.8.5 OPG/TNFRSF11B

Im Vergleich Tumor versus Normal verfehlte OPG knapp Signifikanzniveau. Die Expression lag in der Tumorgruppe unter der im Normalgewebe ($p = 0,061$). Bei Betrachtung der Boxplots von Gleason-Grad, LK- und Rezidivstatus fiel auch eine eher erniedrigte Expression bei klinischer Progression auf, die beim Rezidivstatus ebenfalls knapp das Signifikanzniveau verfehlte ($p = 0,066$). Beim pT-Stadium zeigten sich im Vergleich pT2 zu pT3 keine Expressionsunterschiede.

TRAIL R1/DR4

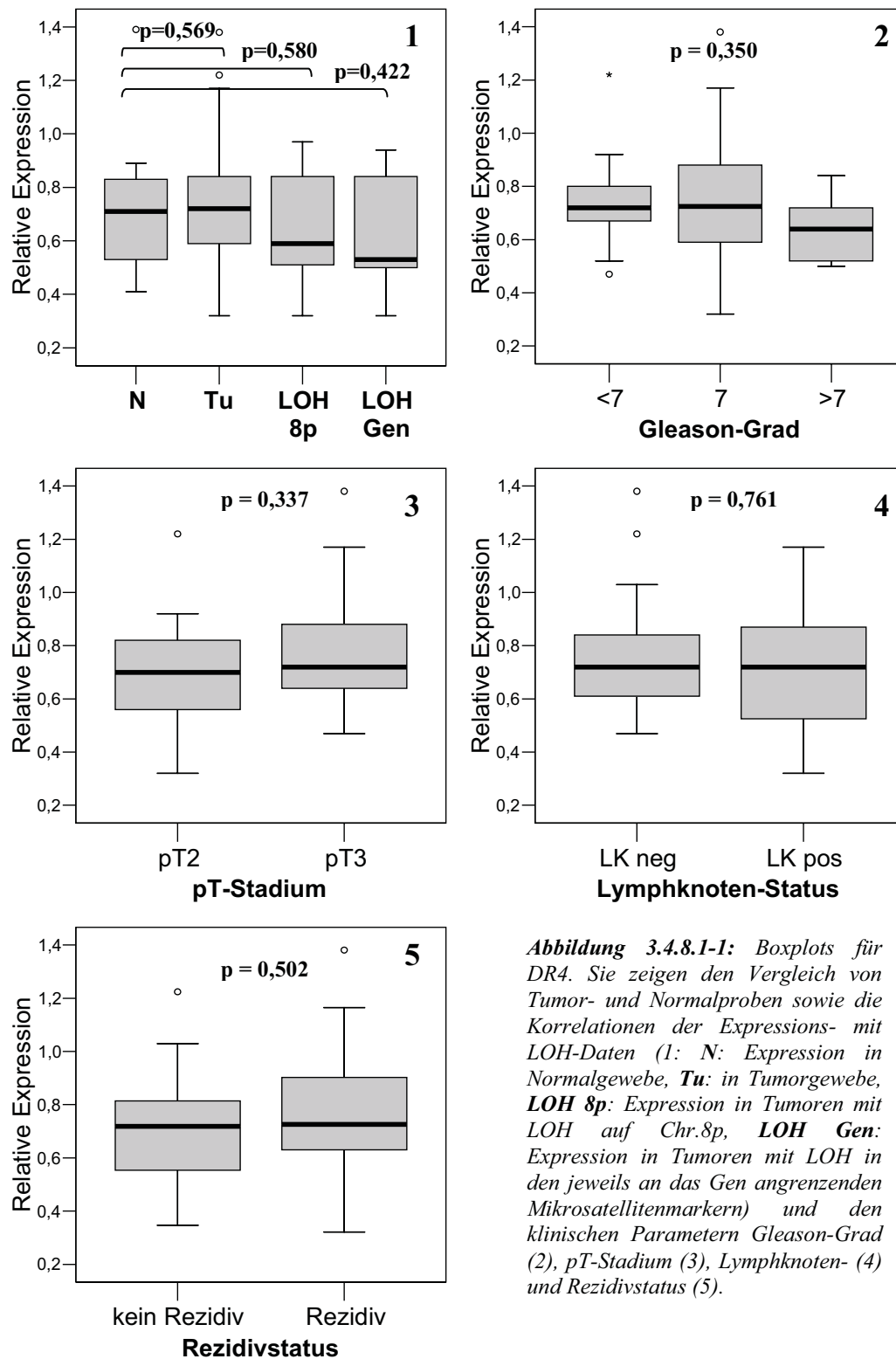


Abbildung 3.4.8.1-1: Boxplots für DR4. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, Tu: in Tumorgewebe, LOH 8p: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, LOH Gen: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

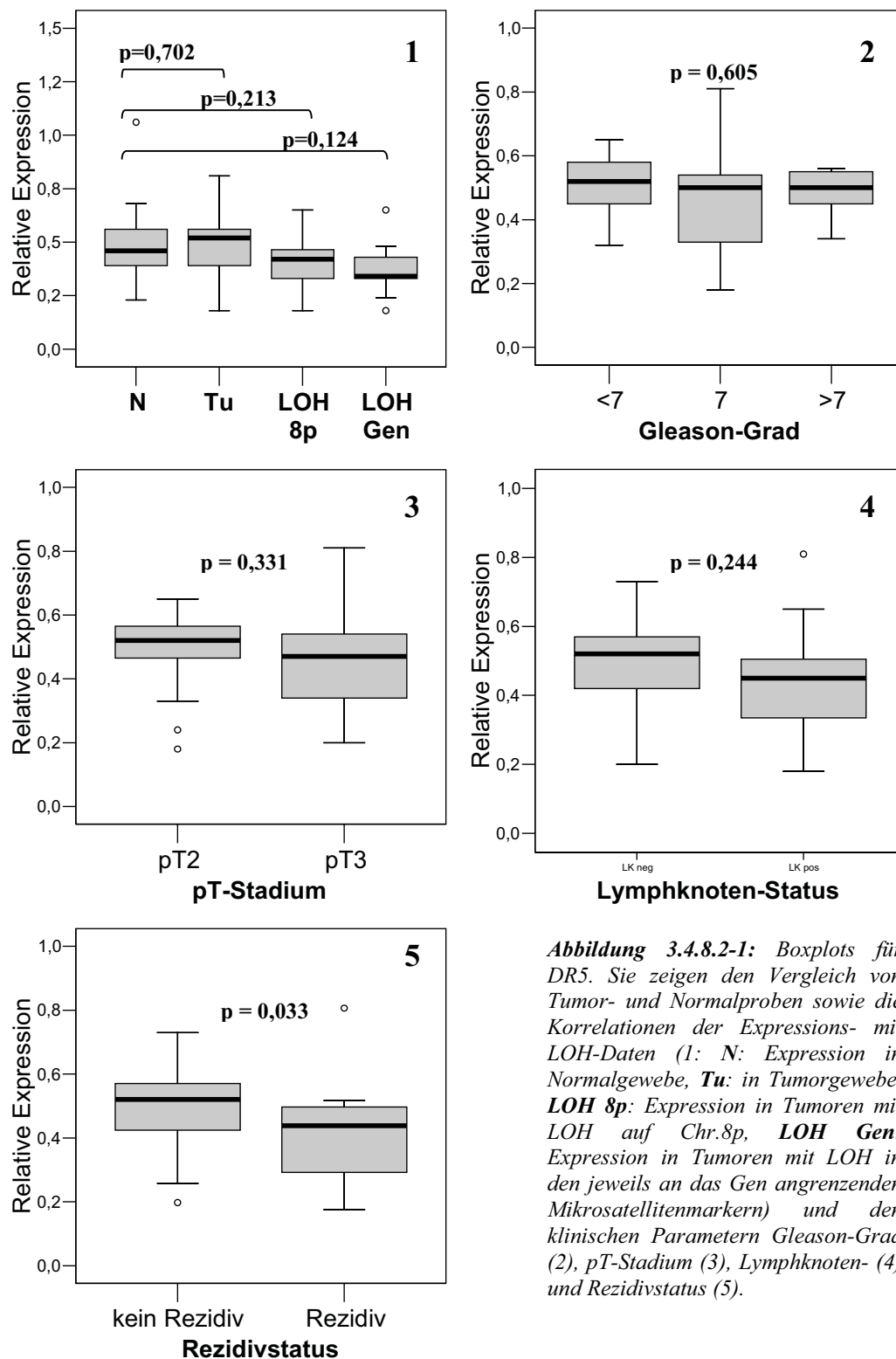
TRAILR2/DR5

Abbildung 3.4.8.2-1: Boxplots für DR5. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, Tu: in Tumorgewebe, LOH 8p: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, LOH Gen: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

TRAILR3/DcR1

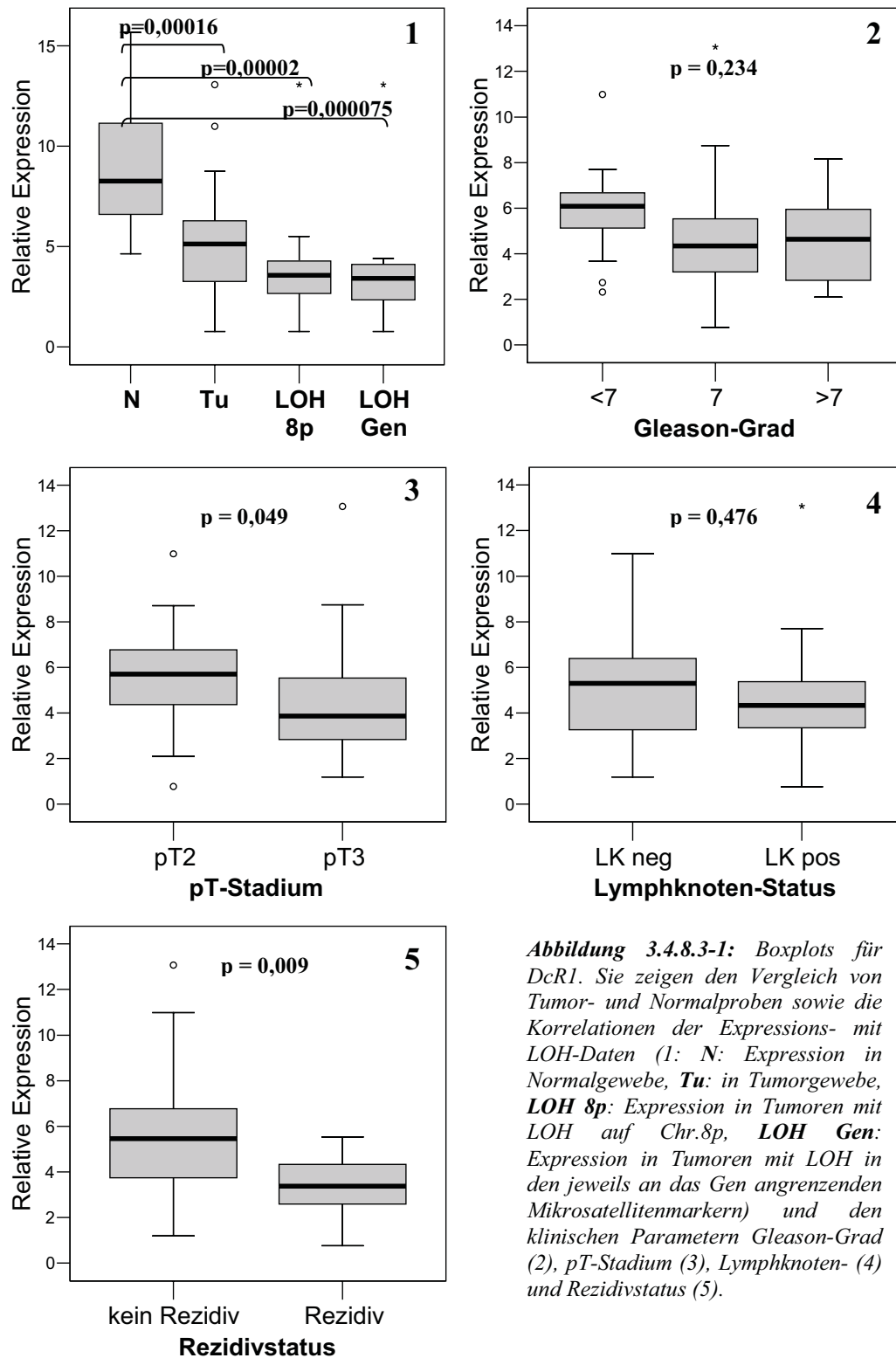


Abbildung 3.4.8.3-1: Boxplots für DcR1. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, Tu: in Tumorgewebe, LOH 8p: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, LOH Gen: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

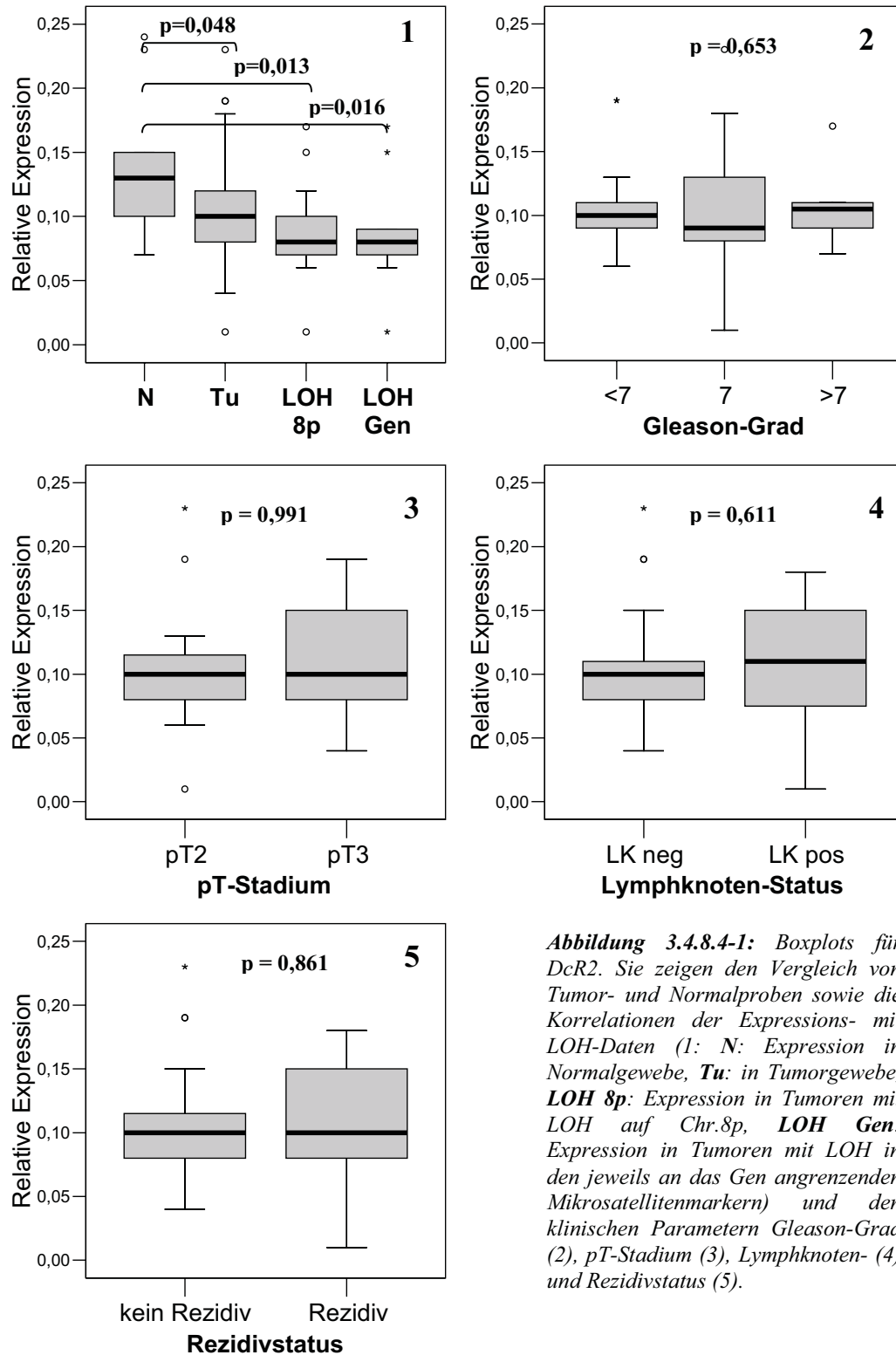
TRAILR3/DcR2

Abbildung 3.4.8.4-1: Boxplots für DcR2. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, **Tu**: in Tumorgewebe, **LOH 8p**: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, **LOH Gen**: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

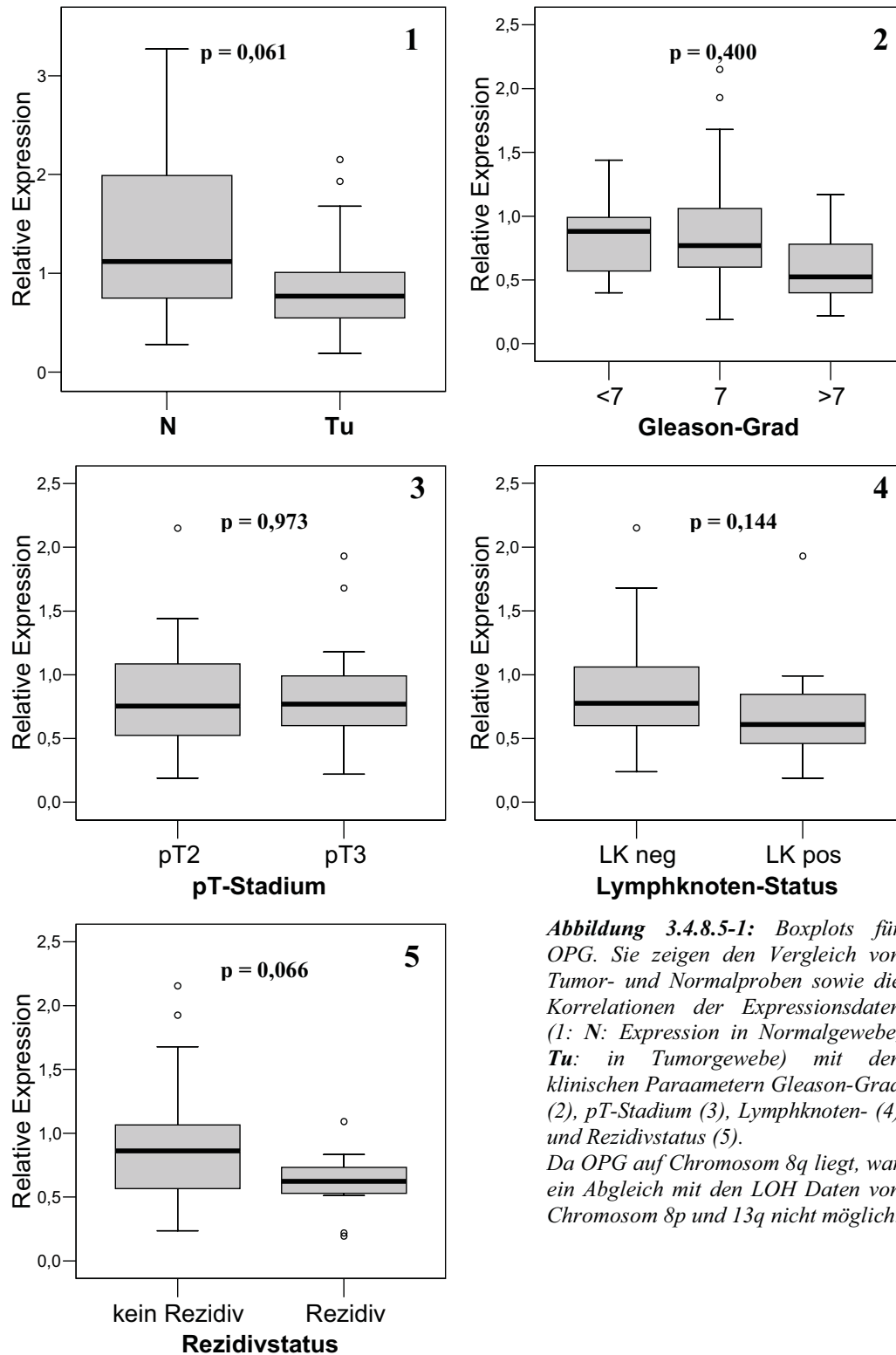
OPG

Abbildung 3.4.8.5-1: Boxplots für OPG. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressionsdaten (1: N: Expression in Normalgewebe, Tu: in Tumorgewebe) mit den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

Da OPG auf Chromosom 8q liegt, war ein Abgleich mit den LOH Daten von Chromosom 8p und 13q nicht möglich.

3.4.9 Expressionsanalyse von NKX3.1 und SPRY2

Im Rahmen von anderen Arbeiten (Masanori Yamanaka, [Fritzsche, 2006]), die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnten von den beiden Genen NKX3.1 und SPRY2 ebenfalls Expressionsdaten erhoben werden. Diese sollen hier der Vollständigkeit halber kurz zusammengefasst werden. NKX3.1 wurde in der Einleitung schon ausführlich eingeführt (*Kapitel 1.5.2*).

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Genen liegt SPRY2 auf Chromosom 13 (13q31.1). Da in der LOH-Analyse Mikrosatellitenmarker von eben diesem Chromosomenabschnitt mitgeführt wurden ist ein Abgleich mit den LOH-Daten auf Chromosom 13q möglich.

Sprouty-Proteine, die von vier bekannten SPRY-Genen kodiert werden, agieren als Modulatoren und Rückkopplungs-Inhibitoren („feedback inhibitors“) der Signalwege von Epidermis-Wachstums-Faktoren (EGFs) und Fibroblasten-Wachstums-Faktoren (FGFs). Die Überaktivität der EGF- und FGF-Signalwege, die im Prostatakarzinom bekannt ist, könnte also durch eine SPRY-Herunterregulation verstärkt werden. Tatsächlich konnte eine SPRY-1- und SPRY-2-Herunterregulation im Prostatakarzinom unabhängig nachgewiesen werden. Unter anderem stören die beiden Proteine die Interaktion der verschiedenen FGF-Rezeptoren (FGFRs) und dem Adapterprotein GRB2 und blockieren die Aktivierungsphosphorylierung von RAF [Fritzsche, 2006].

3.4.9.1 Statistische Auswertung

NKX3.1: Es fand sich eine signifikant erhöhte Expression in den Tumorproben ($p = 0,006$), die mit Eingrenzung auf die Proben mit LOH auf 8p noch deutlich zunahm ($p = 0,0008$). Die Einschränkung auf Proben mit LOH am Genlokus brachte dagegen keinen weiteren Signifikanzanstieg ($p = 0,0011$). Unerwarteterweise zeigte die Expression zwischen den Tumorgruppen mit und ohne LOH auf Chromosom 8p keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,187$). Bei Betrachtung der Gruppen pT-Stadium und LK-Status fanden sich moderat erhöhte Werte in den prognostisch ungünstigeren Gruppen, ohne Signifikanzniveau zu erreichen. Allein bei Tumorproben von Patienten mit Rezidiv lag die Expression signifikant höher als in der Gruppe ohne das Auftreten von Rezidiven ($p = 0,049$). Bei Betrachtung des Gleason-Grades schienen die Expressionswerte von Gleasonsummen ≤ 7 zu Gleasonsummen > 7 leicht abzunehmen.

SPRY2: Für SPRY2 fanden sich keine signifikanten Veränderungen. Die Expression war allenfalls im Tumor-Normalvergleich in der Gruppe mit LOH auf 13q moderat erniedrigt. Beim Vergleich der Tumorgruppen mit und ohne LOH auf Chromosom 13q zeigte sich die Expression in der Gruppe mit LOH erniedrigt, verfehlte aber knapp Signifikanzniveau ($p = 0,065$). Sonst fanden sich generell leicht erhöhte Werte für prognostisch ungünstigere Gruppen, die beim Vergleich LK neg versus LK pos mit $p = 0,074$ knapp das Signifikanzniveau verfehlte.

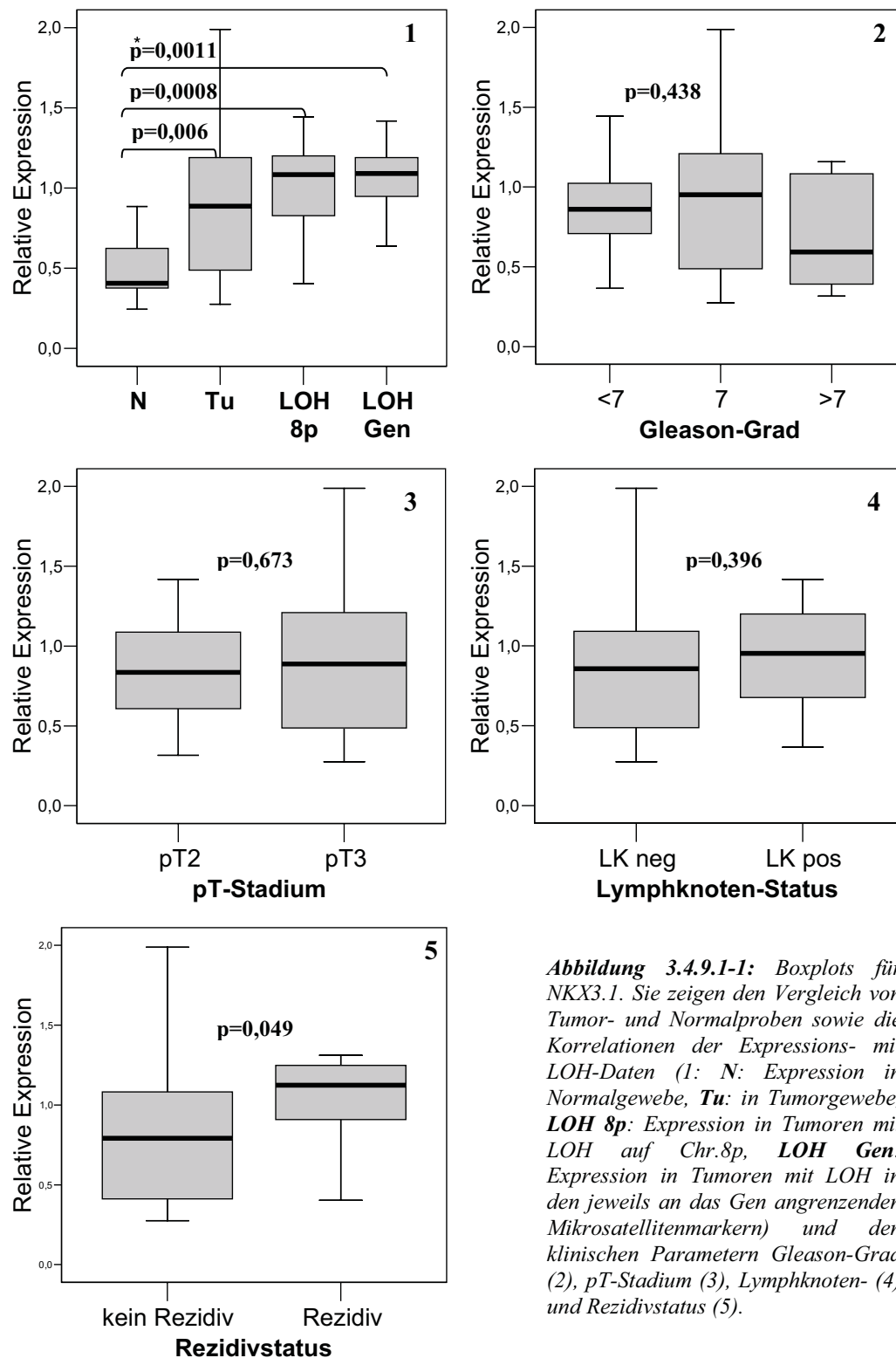
NKX3.1

Abbildung 3.4.9.1-1: Boxplots für NKX3.1. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, **Tu**: in Tumorgewebe, **LOH 8p**: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.8p, **LOH Gen**: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

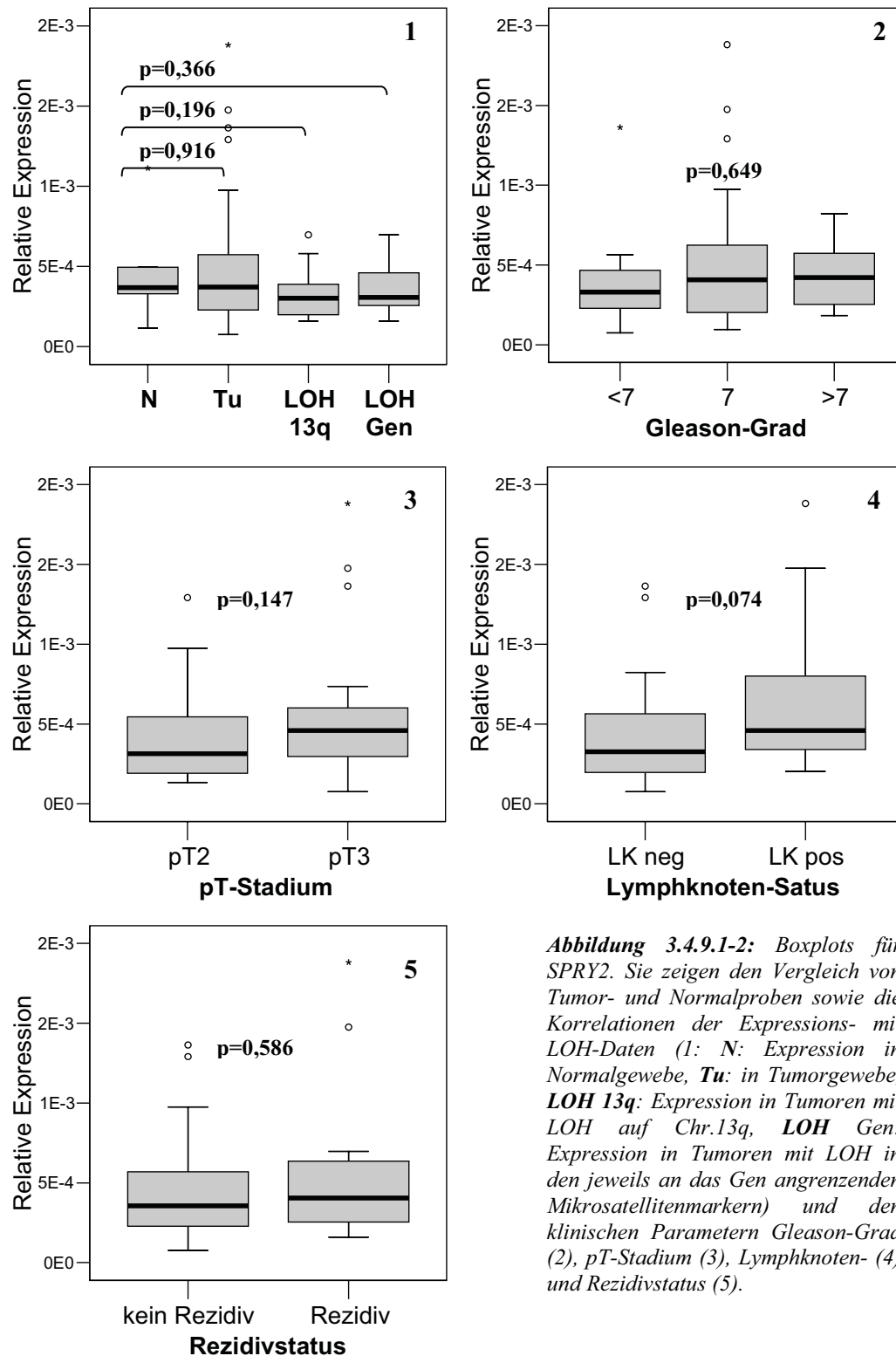
SPRY2

Abbildung 3.4.9.1-2: Boxplots für SPRY2. Sie zeigen den Vergleich von Tumor- und Normalproben sowie die Korrelationen der Expressions- mit LOH-Daten (1: N: Expression in Normalgewebe, Tu: in Tumorgewebe, **LOH 13q**: Expression in Tumoren mit LOH auf Chr.13q, **LOH Gen**: Expression in Tumoren mit LOH in den jeweils an das Gen angrenzenden Mikrosatellitenmarkern) und den klinischen Parametern Gleason-Grad (2), pT-Stadium (3), Lymphknoten- (4) und Rezidivstatus (5).

3.4.10 Überlebenszeit-Analyse mittels Kaplan Meier-Verfahren

Überlebenszeitanalysen sind statistische Tests, bei denen die Zeit bis zu einem bestimmten Ereignis ("time to event") zwischen zwei oder mehr Gruppen verglichen wird, um die Wirkung von prognostischen Faktoren, medizinischer Behandlung oder schädlichen Einflüssen zu schätzen. Die Kaplan Meier-Methode berücksichtigt die Informationen aller Patienten so lange, wie diese beobachtet worden sind. Zur Veranschaulichung dient die graphische Darstellung der Überlebensrate in Abhängigkeit von der Zeit in einer Kurve. Der statistische Test zum Vergleich zweier Überlebenszeitkurven ist der Log Rank-Test.

Bei der hier durchgeführten Analyse sollte geprüft werden, ob das Expressionsniveau der untersuchten Gene über den Beobachtungszeitraum mit dem Ereignis „Auftreten eines Rezidivs“ korreliert. Dazu wurden die Tumorproben in zwei Gruppen aufgeteilt: eine mit Expressionswerten oberhalb und eine mit Werten unterhalb des Tumor-Medians.

Abgebildet sind die Gene, bei denen signifikante Zusammenhänge dargestellt werden konnten.

Für vier der fünf Gene ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Höhe der Genexpression und dem Auftreten eines Rezidivs. Für PPP3CC, DcR1 und OPG führte eine niedrige Expression, wie sie im Tumor-Normalvergleich gefunden wurde, zu einer kürzeren Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs. Für NKX3.1 war es genau umgekehrt. Eine hohe Expression führte zu einem längeren rezidivfreien Intervall. Der Log Rank-Test für DR5 verfehlte knapp signifikantes Niveau ($p = 0,0766$) jedoch konnte man hier zwischen Expression und Auftreten eines Rezidivs einen klaren Trend von hohen Expressionswerten und geringer Rezidivwahrscheinlichkeit erkennen.

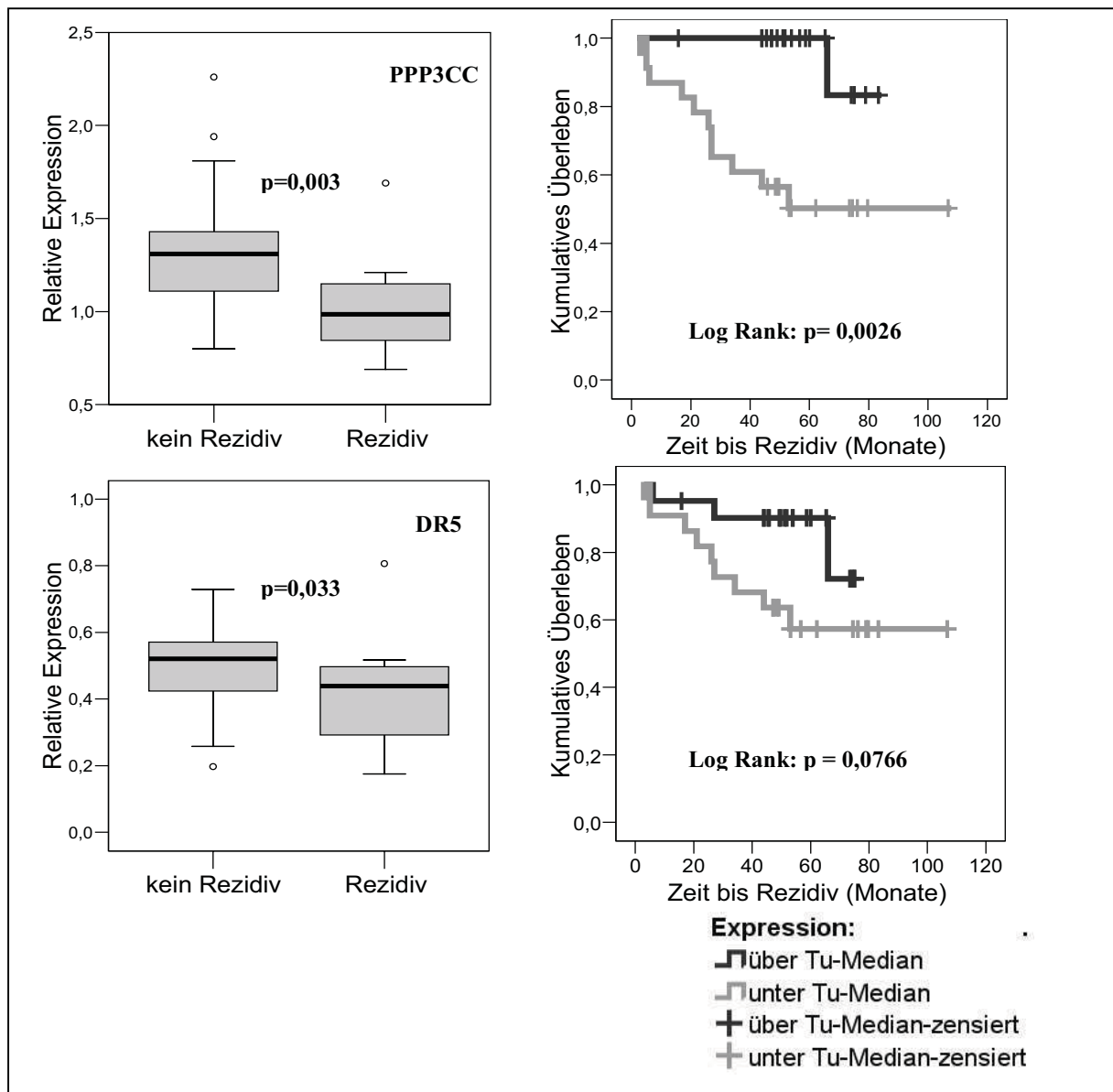


Abbildung 3.4.10-1: Überlebenskurven für das Rezidivverhalten von PPP3CC, DR5, DcR1, OPG und NKX3.1. Zum Vergleich sind die Boxplots mit den Daten des Rezidivstatus abgebildet.

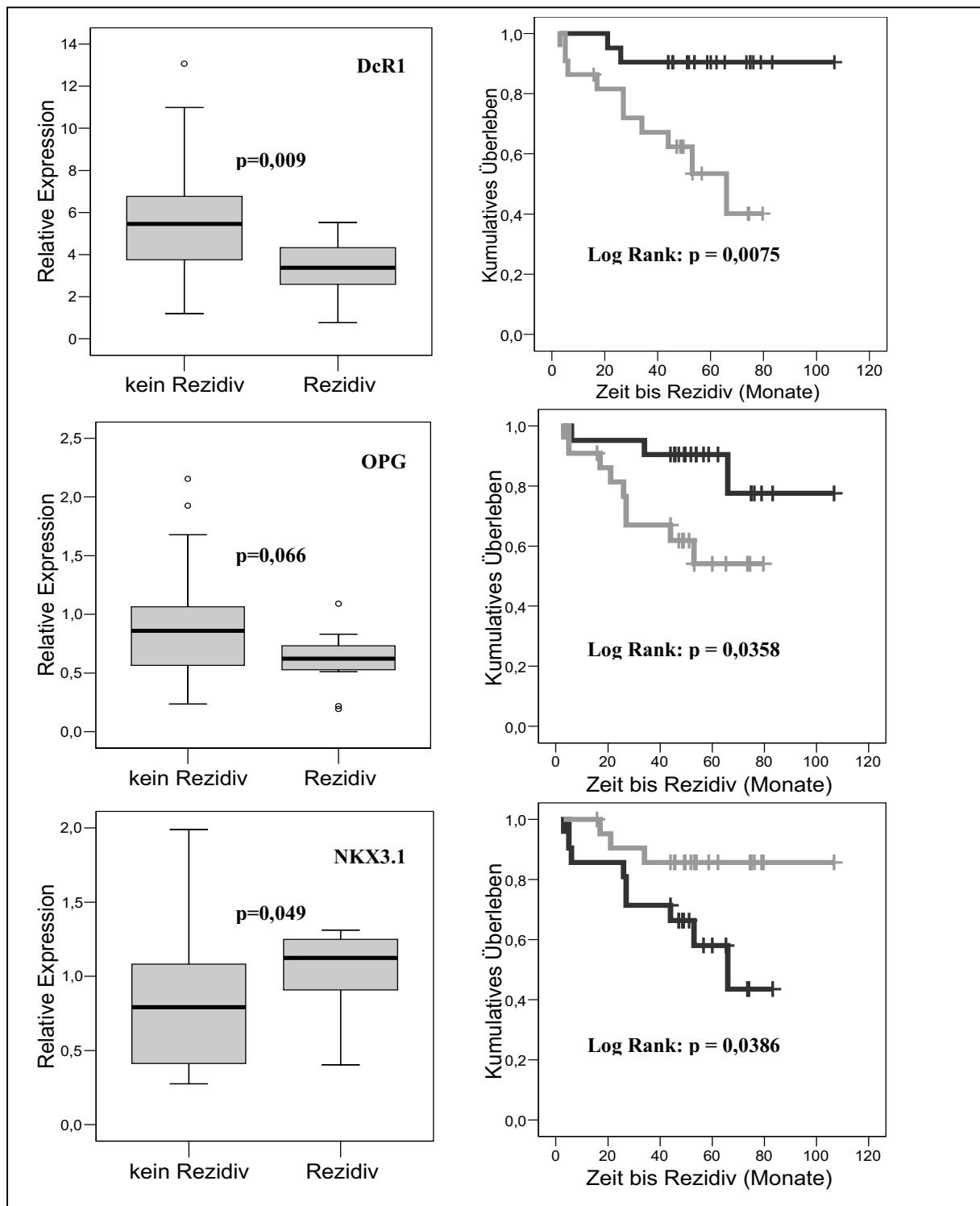


Abbildung 3.4.10-2 Fortsetzung: Überlebenskurven für das Rezidivverhalten von PPP3CC, DR5, DcR1, OPG und NKX3.1. Zum Vergleich sind die Boxplots mit den Daten des Rezidivstatus abgebildet.

3.4.11 Übersichtstabelle

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Berechnungen der Daten aus Expressions- und LOH-Analyse für alle untersuchten Gene. Aufgeführt sind die p-Werte, wobei signifikante Ereignisse fett hervorgehoben sind. Es wird deutlich, dass die meisten signifikanten Veränderungen die Proteinphosphatasen und die vier TRAIL-Rezeptoren betreffen. Um der Frage nach einem Zusammenhang des Expressionsverhaltens der untersuchten Gene nachzugehen wurde die folgende Clusteranalyse durchgeführt.

Gen	N vs. Tu	N vs. Tu LOH8p/Gen	Tu ohne vs. Tu mit LOH	Gleason Grad	pT-Stadium	LK-Status	Rezidiv-Status	Überlebensanalyse
DLC1	0,004 ↑	0,016/0,051 ↑	0,512	0,720	0,437	0,340	0,810	0,5157
FGFR1	0,663 ↑	0,567/0,230 ↑	1,000	0,842	0,508	0,223	0,470	0,6854
CSMD1	1,000	0,964/0,703	0,896	0,025	0,924	0,990	0,264	0,6112
MSR1	0,852	0,856/0,277	0,461	0,761	0,545	0,032	0,262	0,9554
ANGPT2	0,978	0,892/0,485	0,775	0,267	0,373	0,785	0,279	0,2464
PPP2CB	0,023 ↓	0,002/0,001 ↓	0,002	0,517	0,828	0,706	0,697	0,7930
PPP3CC	0,007 ↓	0,002/0,006 ↓	0,023	0,732	0,337	0,575	0,003	0,0026
DR4	0,569	0,580/0,422	0,061	0,350	0,337	0,761	0,502	0,7617
DR5	0,702	0,213/0,124	0,00002	0,605	0,331	0,244	0,033	0,0766
DcR1	0,0002 ↓	0,00002/0,00007 ↓	0,002	0,234	0,049	0,476	0,009	0,0075
DcR2	0,048 ↓	0,013/0,016 ↓	0,005	0,653	0,991	0,611	0,861	0,8726
OPG	0,061 ↓	8q	8q	0,400	0,973	0,144	0,066	0,0358
NKX3.1	0,006 ↑	0,0008/0,0011 ↑	0,187	0,438	0,673	0,396	0,049	0,0386
SPRY2	0,919	0,196/0,366 ↓	0,065	0,649	0,147	0,074	0,586	0,9132

Tabelle 3.4.11-1: Beim Vergleich Normal (N) vs. Tumor (Tu), bzw. N vs. Tumorproben mit LOH auf 8p bzw. N vs. Tumorproben mit LOH im Genbereich auf 8p beschreiben Aufwärtspfeile eine erhöhte und Abwärtspfeile eine erniedrigte Expression des entsprechenden Gens in Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe. Signifikante Ereignisse sind fett hervorgehoben. Als einziges Gen liegt SPRY2 auf Chromosom 13q.

3.5 Clusteranalyse der Genexpressionsveränderungen mittels Genesis

Bei dieser Darstellungsart, auch als „hierarchisches Clustering“ bezeichnet, wurden die Expressionsdaten aller Gene, mit Ausnahme von SPRY2, da es nicht auf Chromosom 8 liegt, miteinander verglichen, um eventuelle Zusammenhänge zwischen Genen und/oder Gewebeproben zu untersuchen. Die hierarchische Clusteranalyse wurde mit Hilfe des Programmes Genesis durchgeführt. Den dafür erforderlichen Berechnungen wurde die Pearson Korrelation als Distanzmatrix zugrunde gelegt (siehe *Kapitel 2.13*), welche die relative Änderung zweier Datensets stärker bewertet als deren absoluten Differenzen. Im Dendrogramm sind bestehende Zusammenhänge in verschiedenen Knotenebenen durch verästelte Linien dargestellt. Die Höhe der einzelnen Clusterschritte ist ein Maß für die Höhe des Distanz-Koeffizienten und die Enge des Zusammenhanges [Laatz, 2005]. Je kürzer also die „Zinken“ einer Gabel im Dendrogramm, desto stärker der Zusammenhang beziehungsweise die Ähnlichkeit im Expressionsprofil. Zum Beispiel kann bei ähnlichen Expressionsprofilen zweier Gene über alle Proben hinweg eine ähnliche Regulation vermutet werden, während Ähnlichkeiten von zwei Gewebeproben über alle Gene hinweg die Frage aufwirft, ob sie auch Ähnlichkeiten zu Bezugsgrößen wie Gleason-Summe oder pT-Stadium aufweisen. Die Expressiondaten wurden für diese Untersuchung aufbereitet. Zunächst wurden alle Gewebeproben, Tumor wie Normal, auf den Mittelwert der Normalproben skaliert. Danach wurden die Daten logarithmiert, und zwar zur Basis 2. Durch diese beiden Schritte wurde zum einen erreicht, dass die Expressionsdaten von Gen zu Gen in ihren Absolutwerten nicht zu stark streuen, zum anderen werden so Unterschiede in der stärkeren Bewertung von Expressionsanstiegen gegenüber Expressionsverlusten angeglichen (log). Des Weiteren erhalten die Proben mit Expressionswerten unter dem Mittelwert der Normalproben so negative Werte und umgekehrt. Rote Farben deuten auf eine erhöhte Expression hin, grüne Farbtöne auf eine erniedrigte Expression. Die Intensität des Farbtons korreliert positiv mit dem Expressionsunterschied zur Referenzbedingung.

Bei der Cluster-Abbildung handelt es sich um ein hierarchisches Clustering, in *Abbildung 3.5-1* (Cluster 1) nur der Tumorproben, in *Abbildung 3.5-3* aller Tumor- und Normalgewebeproben und aller Gene (Cluster 2) jeweils ohne SPRY2, da es als einziges nicht auf Chromosom 8 liegt.

- **Proben-Cluster 1:** Beim hierarchischen Clustering nur der Tumorproben zeigten sich zwei große Cluster, mit Grenze zwischen Probe Tu253 und Tu89. Die beiden Gruppen unterschieden sich in beiden Clustern vor allem in der Herauf- und Herunterregulation von CSMD1 und zu einem geringeren Anteil ANGPT2. Proben von Patienten mit Krankheitsrezidiv schienen am besten durch die Herunterregulation von DcR1 und PPP3CC charakterisiert. Dabei zeigten drei (Tu 65, 93, 96) beziehungsweise fünf (Tu 139, 247, 230, 107, 232) der rekurrenten Proben sehr ähnliche Expressionsprofile. Bei der deskriptiven Statistik (Kreuztabelle) fand sich über den Chi-Quadrat-Test eine signifikante Korrelation für die Gleason-Summe ($p = 0,043$). Dabei fanden sich in der unteren Gruppe ein deutlich erhöhter Anteil an Gewebeproben der Gleasonsumme ≥ 7 (80% vs. 50%). Siehe dazu *Abbildung 3.5-2*. Mit den Parametern Rezidivstatus, LK-Status, pT-Stadium und dem Auftreten von LOH ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge.
- **Proben-Cluster 2:** Für das Cluster mit den Normalgewebeproben fand sich kein signifikanter Zusammenhang mit prognostischen Parametern, ebenso wenig für die Verteilung der Normalproben zwischen den beiden Haupt-Probenclustern. Dabei blieb jedoch die Verteilung der Tumorproben auf die zwei Gruppen zwischen den beiden Clusteranalyse bis auf drei Tumorproben gleich.
- **Gen-Cluster:** Hierbei zeigt sich vor allem in *Abbildung 3.5-3* (Cluster 2) ein deutlicher Zusammenhang der TRAIL-Rezeptoren und ein ebenfalls sehr ähnliches Expressionsprofil der beiden Proteinphosphatasen. In der Clusteranalyse ohne die Normalproben wurde dieser Zusammenhang nur leicht „aufgeweicht“.

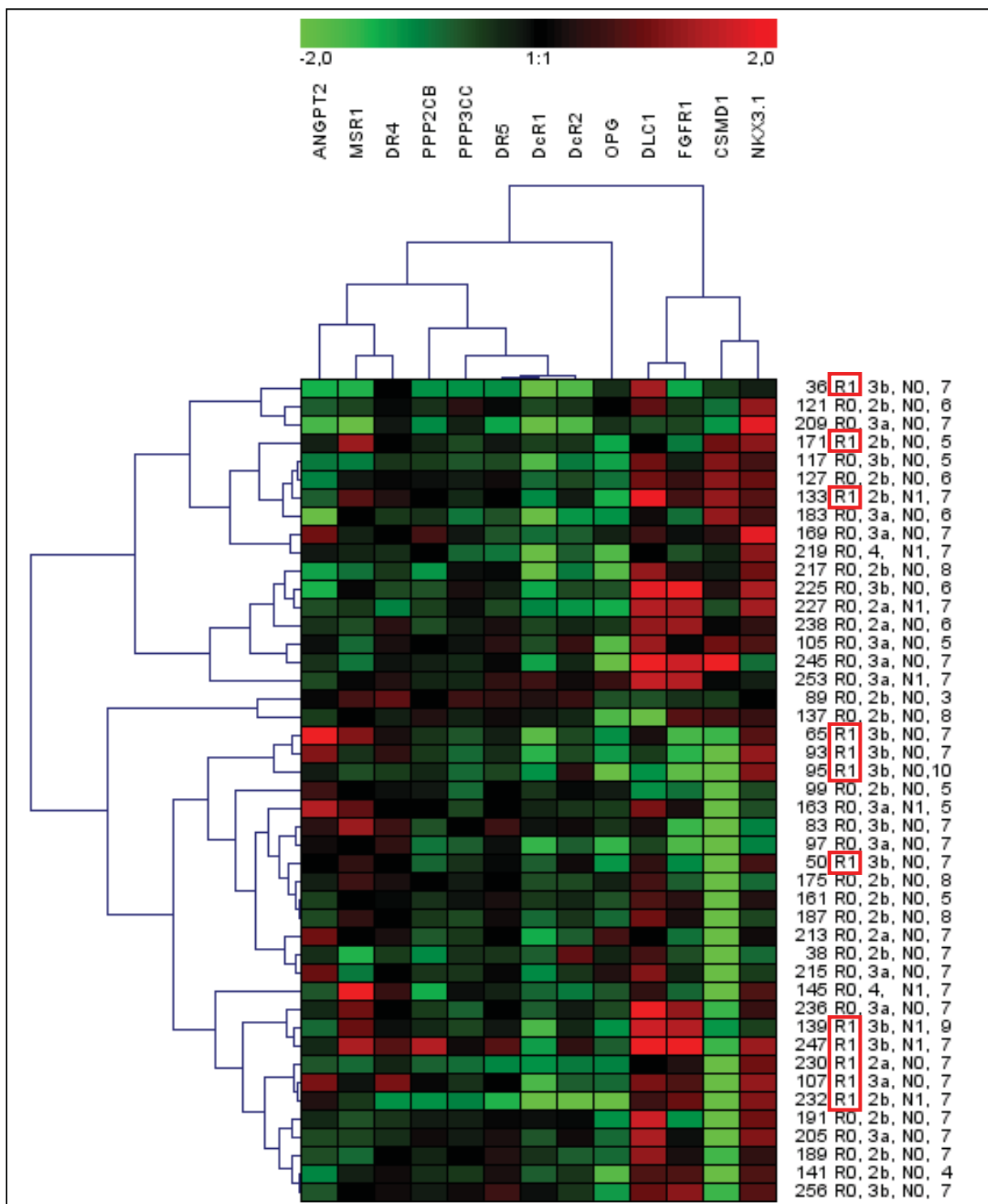


Abbildung 3.5-1: Clusteranalyse der analysierten Gene bei den untersuchten Prostatatumor-Gewebeproben (mit internen Fallnummern gekennzeichnet). Rot hinterlegte Kästchen kennzeichnen hochregulierte, grüne herunterregulierte Gene für die entsprechenden Tumorseiten. Die Farbintensität (siehe Skala oben) gibt das Ausmaß der Veränderungen an. Zusätzlich zu den Fallnummern sind Verlaufparameter angegeben: R-Rezidiv, pT-Stadium, Vorhandensein von LK-Metastasen, Gleason-Summe. Das Auftreten eines Rezidivs ist bei den entsprechenden Proben mit einem roten Rahmen gekennzeichnet.

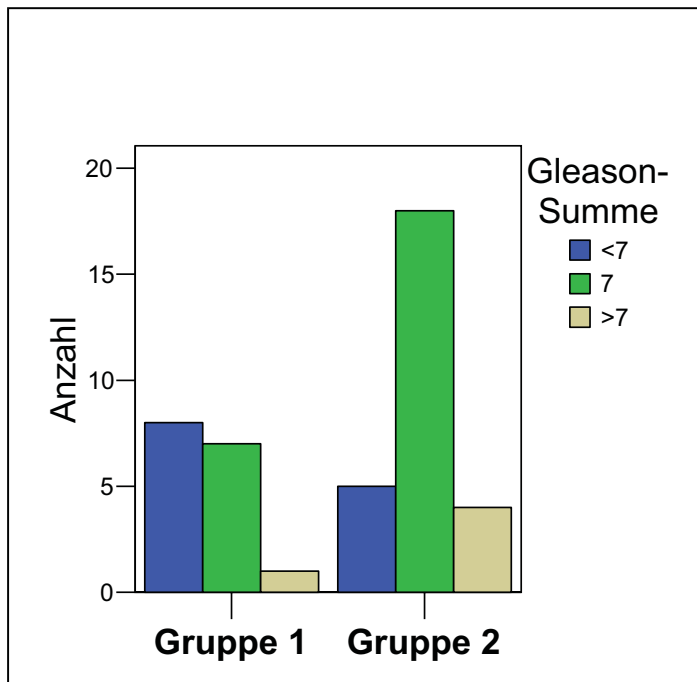


Abbildung 3.5-2: Verteilung der Tumorproben nach histologischer Gleason-Summe auf die beiden Tumorproben-Cluster. Gruppe 1 entspricht der oberen Gruppe der Clusteranalyse, Gruppe 2 der unteren aus Abbildung 3.5-1.

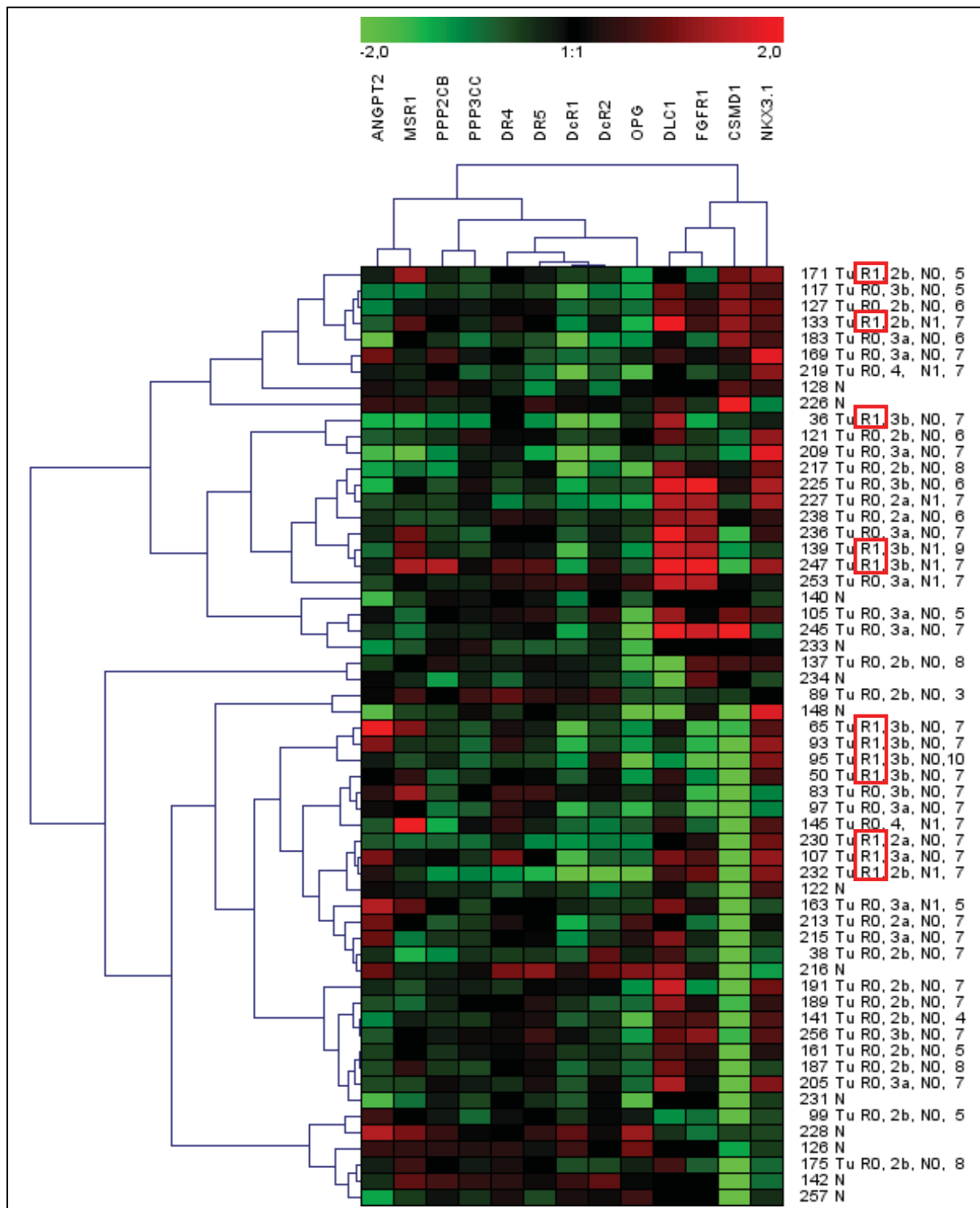


Abbildung 3.5-3: Clusteranalyse der analysierten Gene bei den untersuchten Prostatatumor- und Normalgewebeproben (mit internen Fallnummern gekennzeichnet, Tu-Tumorprobe, N-Normalgewebeprobe, R-Rezidiv, pT-Stadium, N0/N1-Vorhandensein von LK-Metastasen, Gleason-Summe). Das Auftreten eines Rezidivs ist bei den entsprechenden Proben mit einem roten Rahmen gekennzeichnet.

3.6 Spezifische Expressionsanalyse an AZA und SAHA behandelten Prostatakarzinom-Zelllinien

Um die Frage zu klären, ob epigenetische Faktoren wie DNA-Methylierung oder Histon-Acetylierung einen Einfluß auf die Expression der untersuchten Gene haben, wurde abschließend eine Expressionsanalyse mit sechs ausgewählten Genen (DR4, DR5, DcR1, DcR2, PPP2CB, OPG) an Prostatakarzinom-Zelllinien durchgeführt.

Die Methylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen von Genen führt in der Regel zu einer Transkriptionshemmung („Silencing“). Daher sollte die Behandlung mit dem DNA-Methylierungs-Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin zu einer verstärkten Expression von Genen führen, sofern DNA-Methylierung an ihrer Herunterregulation beteiligt ist. Ferner findet in transkriptionell aktiven Genomabschnitten eine Acetylierung von Histonen statt. Für sich, oder synergistisch mit DNA-Methylierung trägt Deacetylierung ebenfalls zu einer Verminderung der Transkription bei. Somit würde die Behandlung der Zelllinien mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Suberoylanilid-Hydroxamic-Acid (SAHA) ebenfalls zu einer Zunahme der Genexpression führen.

In der Literatur fanden sich Hinweise auf eine solche epigenetische Regulation, vor allem der Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 [van Noesel, 2002; Shivapurkar, 2004; Suzuki, 2006], welche sich in der Expressionsanalyse auch als herunterreguliert dargestellt hatten. Neben den Genen der TRAIL-Rezeptoren wurde noch das für eine der Threonin-Seronin-Proteinphosphatase (PPP2CB) mitgeführt. Für dieses Experiment standen cDNAs aus früheren Experimenten zur Verfügung. Die Proben waren für die Untersuchung anderer Gene gewonnen worden. Dabei war die Wirksamkeit der Behandlung für Kontrollgene gezeigt worden [Hoffmann, 2006]:

- cDNAs aus vier Prostatakarzinomzelllinien (PC3, 22Rv1, LNCaP, Du145), jeweils in unbehandelter Form und nach Behandlung mit 5-Aza-dC. Als Kontrolle dienten hier zwei Blasenepithelzellkulturen (UP118, UP46).
- Weiterhin cDNAs aus den Zelllinien PC3 und Du145 in unbehandelter Form, nach AZA-Behandlung, nach Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor SAHA, sowie nach kombinierter Behandlung mit AZA und SAHA. Für die Zelllinien 22Rv1 und LNCaP standen leider keine SAHA-behandelten Zelllinien zur Verfügung, da sie extrem empfindlich auf den Inhibitor reagierten.
- Bei der Analyse wurde als Bezugsgen wieder das Haushaltsgen TBP verwendet.

3.6.1 PPP2CB

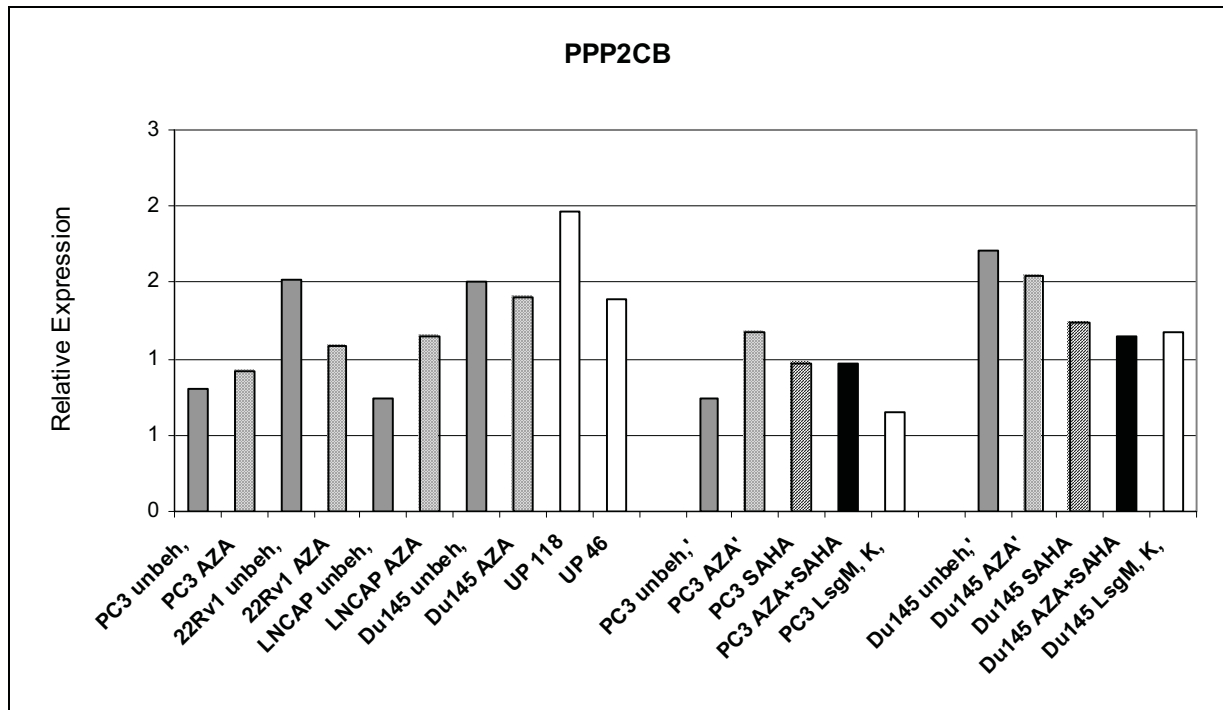


Abbildung 3.6.1-1: Zeigt das Expressionsmuster des Gens PPP2CB in den verschieden behandelten Zelllinien. LsgM.K. = Lösungsmittel-Kontrolle jeweils für PC3 und Du145 mitgeführt.

Lediglich bei den Zelllinien PC3 und LNCaP fand sich eine leicht erhöhte Expression in den mit AZA behandelten Proben. Ein synergistischer Effekt bei der Kombinationsbehandlung mit SAHA ließ sich nicht feststellen.

3.6.2 TRAIL R1/DR4

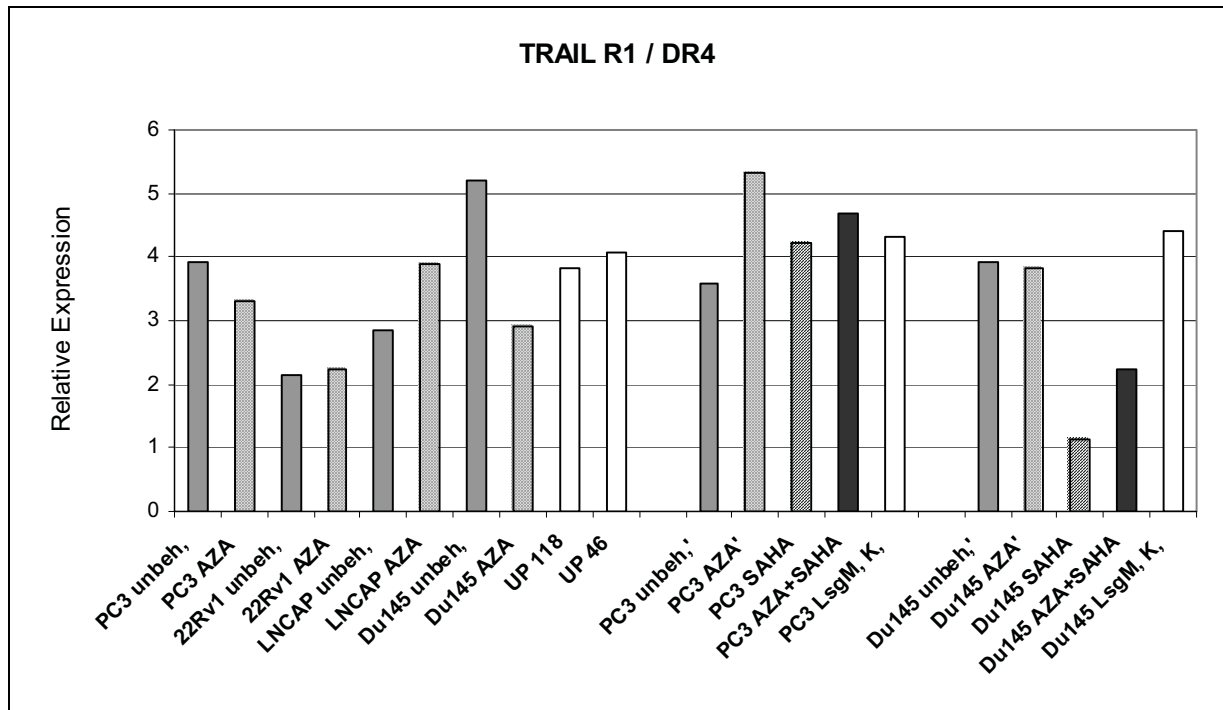


Abbildung 3.6.2-1: Zeigt das Expressionsmuster des Gens TRAIL R1 / DR4 in den verschieden behandelten Zelllinien.

Lediglich bei der Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP zeigte sich ein leichter Expressionsanstieg nach Behandlung mit AZA, wobei der Expressionsanstieg bei 22Rv1 minimal ausfiel. Im nachfolgenden Experiment (AZA, SAHA, AZA+SAHA) zeigte sich ein deutlicherer Expressionsanstieg bei PC3 nach AZA-Behandlung, wobei kein zusätzlicher Effekt von SAHA sichtbar wurde.

3.6.3 TRAIL R2 / DR5

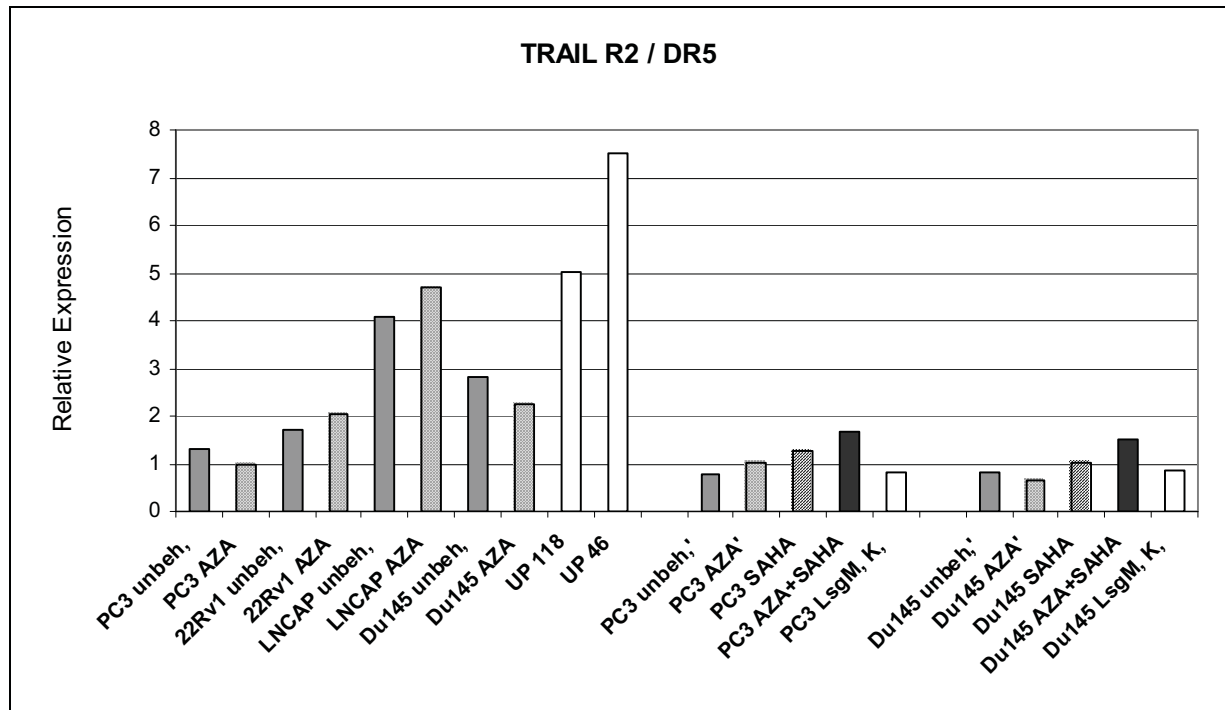


Abbildung 3.6.3-1: Zeigt das Expressionsmuster des Gens TRAIL R2 / DR5 in den verschieden behandelten Zelllinien.

Für DR5 ließen sich in dieser Untersuchung auf eine epigenetische Expressionsregulation keine signifikanten Veränderungen feststellen.

3.6.4 TRAIL R3 / DcR1

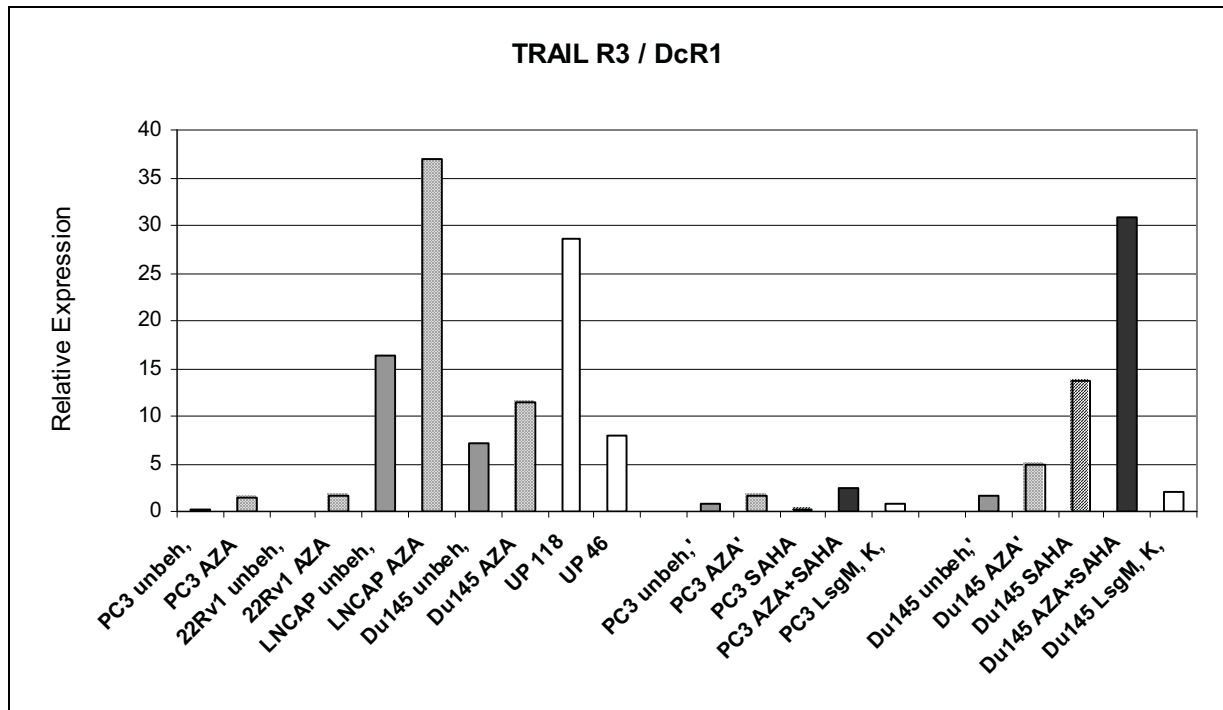


Abbildung 3.6.4-1: Zeigt das Expressionsmuster des Gens TRAIL R3 / DcR1 in den verschieden behandelten Zelllinien.

Bei DcR1 kam es zu einem Expressionsanstieg nach AZA-Behandlung in allen vier untersuchten Zelllinien, am stärksten bei LNCaP. Das zweite Experiment bestätigte dieses Ergebnis für PC3 und Du145. Bei PC3 zeigte anschließend nur die Kombination aus AZA+SAHA, nicht jedoch SAHA alleine, einen ähnlichen Effekt. Bei Du145 führte die Behandlung mit SAHA zu einer starken Expressionszunahme (fast Verdreifachung) und die Kombinationsbehandlung zu einem überadditiven Effekt.

3.6.5 TRAIL R4 / DcR2

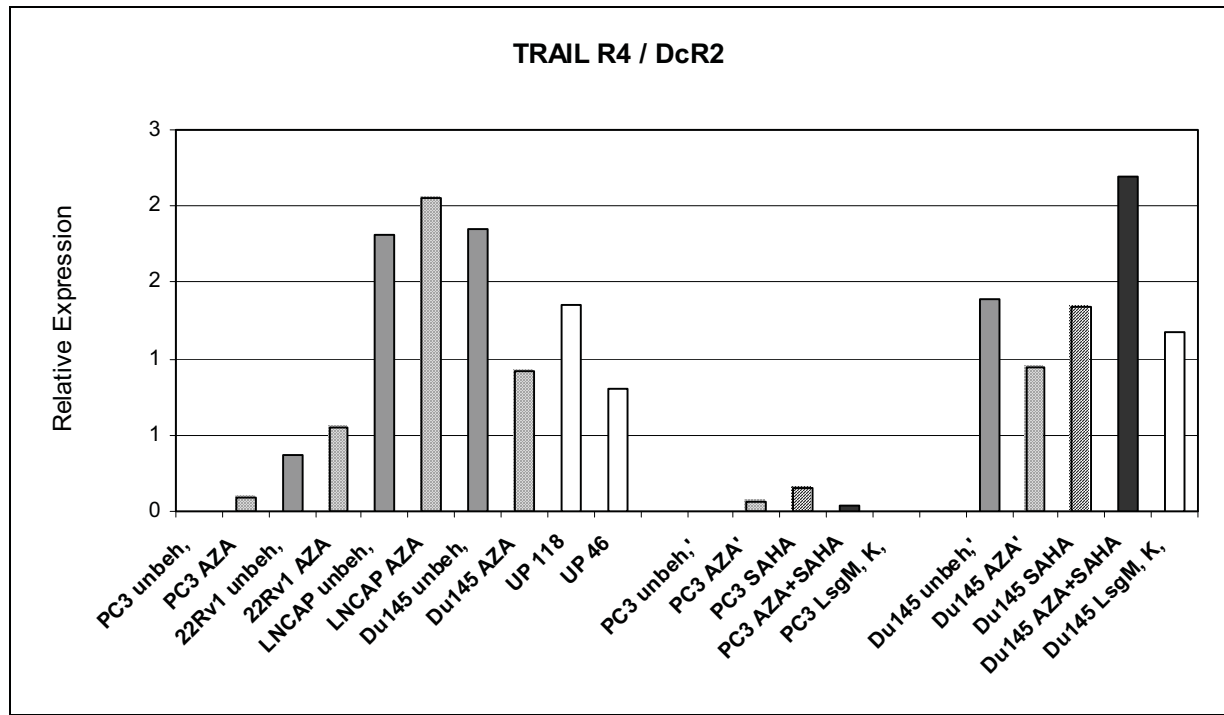


Abbildung 3.6.5-1: Zeigt das Expressionsmuster des Gens TRAIL R4 / DcR2 in den verschieden behandelten Zelllinien.

Bis auf Du145 zeigten alle Zelllinien eine leichte Expressionszunahme nach AZA-Behandlung. Bei PC3 führte allein SAHA, nicht aber die Kombination aus AZA+SAHA, zu einem Anstieg. Dagegen führte die Kombination von AZA+SAHA, bei der zunächst auf AZA nicht ansprechenden Zelllinie Du145, zu einem deutlichen Expressionsanstieg.

3.6.6 OPG

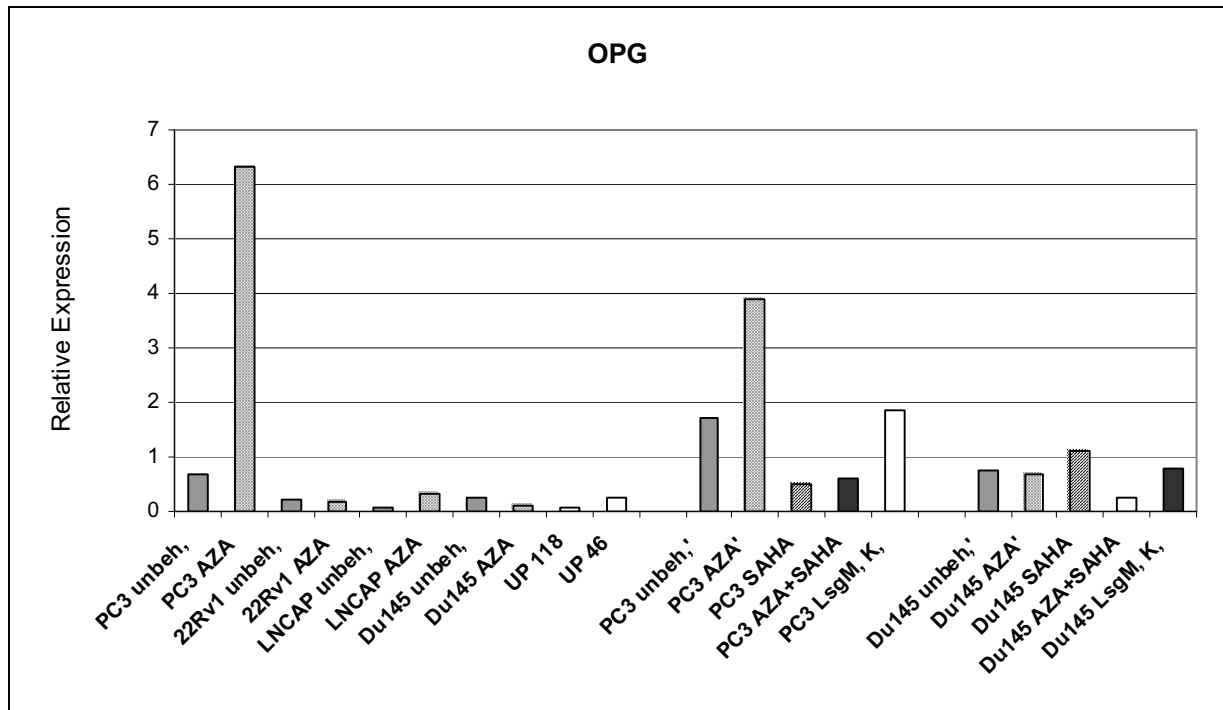


Abbildung 3.6.6-1: Zeigt das Expressionsmuster des Gens OPG in den verschieden behandelten Zelllinien.

Allein PC3 zeigte einen sehr deutlichen, im Prinzip reproduzierbaren Expressionsanstieg nach AZA-Behandlung. Es fanden sich keine relevanten Effekte der SAHA oder AZA+SAHA-Kombinationsbehandlung.

3.6.7 Übersichtstabelle

Allein DcR1 und DcR2 zeigten ein relativ konstantes und reproduzierbares Ansprechen auf die Behandlung mit Inhibitoren der epigenetischen Regulation. Vor allem bei DcR1 kam es zu einem Expressionsanstieg unter AZA- und SAHA-Behandlung bei den entsprechenden Zelllinien.

Gen	PC3 AZA	PC3 AZA'	PC3 SAHA	PC3 A+S	Du AZA	Du AZA'	Du SAHA	Du A+S	22Rv1 AZA	LNCaP AZA
PPP2CB	+	++	+	+	-	-	--	--	--	++
DR4	-	++	+	+	--	-	--	--	+	++
DR5	-	+	+	++	-	-	+	++	+	+
DcR1	+	+	-	+	+	+	++	+++	+	+++
DcR2	+	+	++	+	--	--	-	++	+	+
OPG	+++	++	--	--	-	-	+	--	0	+

Tabelle 3.6.7-1: Übersicht über die Expressionsanalyse mit verschiedenen vorbehandelten Zelllinien. Von PC3 und Du145 lag cDNA aus zwei Kultivierungsreihen vor: eine nur AZA-behandelte sowie eine zweite AZA-, SAHA- und kombiniert AZA+SAHA-behandelte Reihe. Um Verwechslungen zu vermeiden ist die zweite AZA-behandelte Zelllinie mit ' gekennzeichnet. „+“ bezeichnet eine Expressionszunahme im Vergleich zu der unbehandelten Form, „-“ eine Abnahme und „0“ keine Differenz. Das Maß bzw. der Grad der Expressionsdifferenz ist entsprechend gekennzeichnet (+ leichte, ++ starke, +++ sehr starke Zunahme).

3.7 MS-PCR-Analyse der TRAIL-Decoyrezeptor-Gene

Im Anschluss an die vorangegangene Untersuchung auf mögliche epigenetische Regulation durch DNA-Methylierungs- oder Histon-Acetylierung, sollte nun untersucht werden, ob die gefundenen Abweichungen auf einer Promotorhypermethylierung der Gene beruhten.

Dies geschah in Form einer methylierungs-spezifischen-PCR (MS-PCR) für die Gene DcR1 und DcR2, da diese Gene in der Expressionsanalyse die deutlichste Verminderung aufwiesen und durch Behandlung mit AZA und SAHA am ehesten induziert wurden (*Kapitel 3.6*). In der Literatur [van Noesel, 2002] war Promotorhypermethylierung als Ursache ihrer epigenetischen Regulation beschrieben worden war. Dabei wurden die Primer aus der letztgenannten Arbeit übernommen [van Noesel, 2002].

Wie unter *Kapitel 2.15.1* beschrieben, unterscheiden sich nach einer Bisulfitbehandlung einzelsträngiger DNA die Sequenzen der unmethylierten und methylierten DNA. Diese werden entweder von Primern spezifisch für unmethylierte DNA (U) oder von Primern spezifisch für methylierte DNA (M) erkannt (siehe auch *Kapitel 2.15.2*). Somit ist die MS-PCR eine Methode, mit der man den Methylierungsstatus von CpG-Stellen in der gesamten Population der Allele einer DNA Probe bestimmen kann. Die Aussage beschränkt sich jedoch nur auf die CpG-Stellen, die in den Primersequenzen enthalten sind.

Dabei ist einschränkend hinzuzufügen, dass man bei der Gestaltung der U- und M-Primer zwar von einem komplett unmethylierten beziehungsweise methylierten Zustand der CpG-Stellen der Ziel-DNA ausgeht, die Primer aber mit gewisser Wahrscheinlichkeit auch an teilmethylierte Sequenzen binden können. Bei der Auswertung über gelelektrophoretische Methoden kann das Fluoreszenzsignal des amplifizierten DNA-Bereichs je nach Methylierungsgrad für verschiedene Proben daher unterschiedlich stark sein und Signale für U- und M-Reaktion liefern. Außerdem können in Zelllinien, und erst recht in Geweben, methylierte und nichtmethylierte Allele nebeneinander vorkommen. Um eine relative Vergleichsgröße zur Beurteilung des Methylierungsgrades über die Signalstärke zu bekommen, benötigt man daher DNA-Sequenzen in denen die CpG-Stellen in dem untersuchten Bereich entweder komplett unmethyliert oder methyliert sind. Um solche Standards zu erhalten wurden eingangs Tests mit Prostatakarzinomzelllinien und anderen möglichen Kontrollproben durchgeführt.

Als Standard für die U-Reaktion diente letztendlich DNA aus Blutleukozyten (BT) für DcR1 und DNA aus einer Blasenepithelzellkulturen (UP) für DcR2, in der Annahme, dass hier Normalgewebe vorliegt und keine Promotorhypermethylierung vorhanden ist.

Als Standard für die M-Reaktion diente die Prostatakarzinom-Zelllinie PC3. Um sicher zu gehen, dass das PC3-Signal wirklich einer komplett methylierten Primerregion entspricht, erfolgte noch der Abgleich mit SssI-Methylase behandelte, das heißt in vitro vollständig methylierter, DNA.

Es wurden pro Gen jeweils 21 Gewebeproben untersucht: 8 Prostatakarzinom-Proben, die in der Expressionsanalyse die jeweils höchste Expression zeigten, 8 Prostatakarzinom-Proben, die in der Expressionsanalyse die jeweils niedrigste Expression zeigten und 5 Prostata-Normalproben. Diese Auswahl wurde vorgenommen um Unterschiede im Methylierungsmuster bei Proben mit hoher und niedriger Genexpression, bei Beschränkung auf ein relativ kleines Probenet, möglichst deutlich sichtbar zu machen.

3.7.1 DcR1

Bei DcR1 fand sich fast durchgehend eine teilweise Methylierung der Proben, das heißt sowohl Signale in der M- als auch der U-Reaktion einer Probe. Die Normalproben waren ebenfalls teilmethyliert, was eine Beurteilung sehr schwierig macht. Bei genauer Betrachtung findet man bei den Proben mit hoher DcR1-Expression und den Normalproben stärkere Signale der U-Reaktion, während bei den Proben mit niedriger DcR1-Expression die Signale von U- und M-Reaktion gleich intensiv erscheinen. In Zusammenhang mit den Normalproben weisen diese Ergebnisse eher auf einen quantitativen als qualitativen Unterschied in der Promotormethylierung des Gens in Prostatatumoren hin.

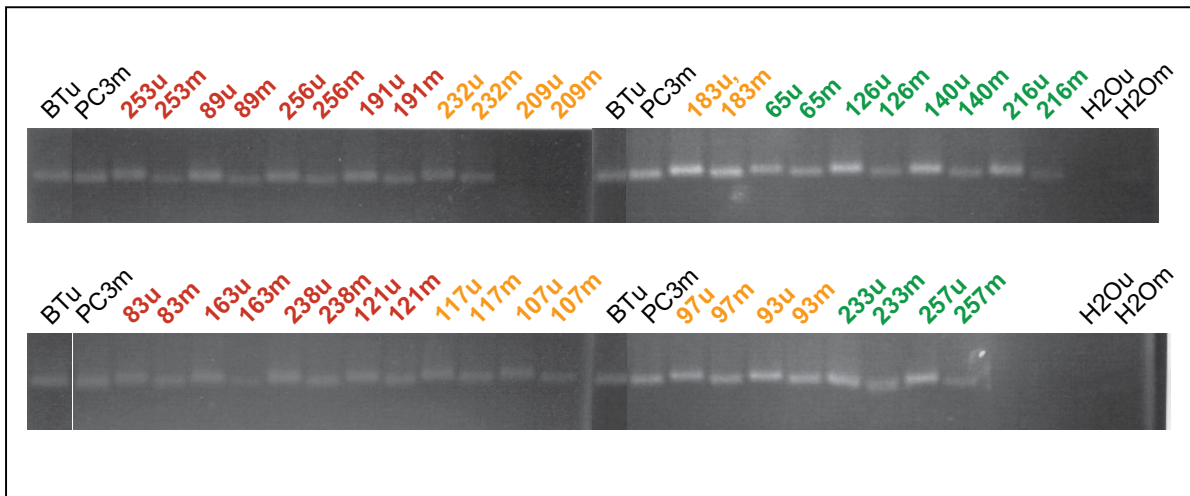


Abbildung 3.7.1-1: Ergebnisse der MS-PCR für DcR1. Abgebildet sind zwei Agarose-Gele, wobei die beiden Reihen eines Gels nebeneinander abgebildet sind. Für jede Reihe wurde jeweils ein U- und ein M-Standard aufgetragen um Verfälschungen bei der Elektrophorese zwischen oberen und unteren Gelanteilen zu berücksichtigen. Bei allen Proben ist zunächst die U-Probe und rechts daneben die M-Probe aufgetragen. **Rote Proben** kennzeichnen jene, die hohe Expressionswerte für DcR1 hatten, **orangene** diejenigen mit niedrigen Expressionswerten und **grüne** kennzeichnen die Normalproben. Die Proben wurden zu annähernd gleichen Teilen auf beide Gele aufgeteilt, um auch hier einer Verfälschung durch unterschiedliche Gelqualität etc. vorzubeugen.

3.7.2 DcR2

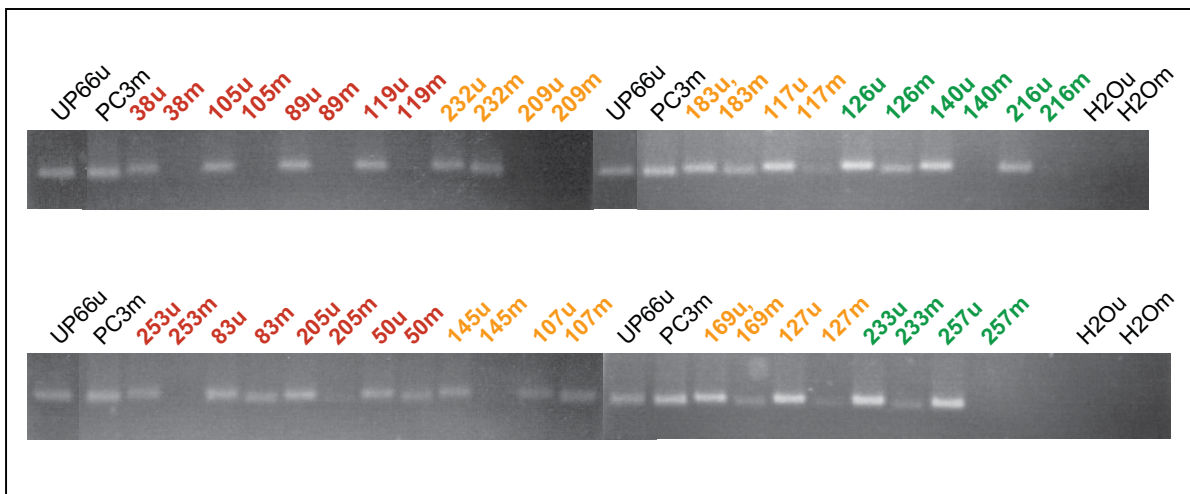


Abbildung 3.7.2-1: Ergebnisse der MS-PCR für DcR2. Aufgetragen sind zwei Agarose-Gele. **Rote Proben** kennzeichnen jene, die hohe Expressionswerte für DcR1 hatten, **orangene** diejenigen mit niedrigen Expressionswerten und **grüne** kennzeichnen die Normalproben.

Bei DcR2 fand sich ein klareres Methylierungsmuster als bei DcR1. Fünf von acht Tumorproben mit hoher DcR2 Expression wiesen einen komplett unmethylierten Promotorbereich auf (62,5%). Bei den Proben mit niedrigster Expression war es dagegen nur eine von acht (12,5%), wobei

Probe 209 weder in der U- noch in der M-Reaktion ein Signal lieferte. Die restlichen sechs Proben zeigten eine Teilmethylierung beider Reaktionen, wobei die U-Reaktion meist ein deutlich stärkeres Signal lieferte. Bei den Normalproben zeigten drei von fünf Proben einzig eine positive U-Reaktion (60%), zwei eine Teilmethylierung mit Überwiegen der U-Reaktion.

Zusammenfassend lagen in Tumorproben mit hoher Expression und Normalproben annähernd gleiche Anteile an komplett unmethylierten Zielregionen vor (62,5 bzw. 60%). Dagegen wiesen die Daten der Proben mit niedrigster DcR2-Expression auf eine, im Gegensatz zu den restlichen Proben, deutliche Hypermethylierung der untersuchten DNA-Region hin.

Daher ist zu vermuten, dass bei Tumorproben mit hohen DcR2-Expressionswerten, wie bei den Normalproben, die Expression durch Hypermethylierung nicht nachweislich beeinträchtigt wird. Somit könnte die stärkere Hypermethylierung bei Tumorproben mit reduzierter DcR2-Expression zumindest einen Teil zur epigenetischen Inaktivierung des Gens beitragen.

3.8 Bisulfitsequenzierung von DcR2⁷

In der vorangegangenen Untersuchung hatten sich Hinweise auf eine Promotorhypermethylierung als Ursache für eine reduzierte DcR2-Expression in Tumorproben ergeben. Obwohl die MS-PCR einen allgemeinen Zusammenhang zwischen Methylierungsmuster und Genexpression zeigte, lieferten viele Proben relativ schwache Signale für die Primer, die spezifisch die methylierte Sequenz amplifizierten. Die Erfahrung zeigt (siehe [Neuhausen, 2006] für ein eindrucksvolles Beispiel), dass solche Ergebnisse oft mit Sequenzen erlangt werden, die partiell in einem uneinheitlichen und lückenhaften Muster methyliert sind. Des Weiteren lagen die Primerpaare, die von van Noesel et al. konzipiert und übernommen wurden, strenggenommen nicht im Promotorbereich, sondern im ersten Intron, beziehungsweise die von DcR2 an der Grenze zum ersten Intron, also 3'-Bereich der CpG-Insel.

Daher wurde im Anschluss eine Bisulfitsequenzierung des Promotorbereichs von DcR2 durchgeführt. Insgesamt wurden 17 CpG-Dinukleotide im Sequenzbereich des DcR2-Transkriptionsstarts bei zwei Zelllinien, einer Blutprobe, zwei Normalgewebe- und fünf Tumorgewebeproben analysiert. Mit der MS-PCR-Methode hatte sich PC3 als komplett methyliert für den Promotorbereich von DcR2 gezeigt, LNCaP als fast komplett unmethyliert

⁷ Freundlicherweise durchgeführt von Frau Christiane Hader, Urologisches Forschungslabor, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

(ohne Abbildung). Die beiden Normalproben (N257 und N140) schienen ebenfalls unmethyliert für den Promotorbereich, ebenso die beiden Tumorproben Tu38 und Tu89, welche gleichzeitig eine hohe DcR2-Expression aufwiesen. Die zwei Tumorproben Tu232, Tu209 und Tu183 zeigten eine reduzierte DcR2-Expression bei positiver M-Reaktion im Falle von Tu232 und Tu183.

In *Abbildung 3.8-1* sind die einzelnen CpG-Dinukleotide des amplifizierten Sequenzbereichs als Ellipse dargestellt. Während nicht methylierte CpG-Dinukleotide als weiße Ellipsen abgebildet sind, zeigt eine schwarze Färbung eine Methylierung an. Es wurden jeweils mehrere Klone pro Zelllinie untersucht. Im Idealfall entspricht jeder Klon einem anderen Allel der DNA-Population. Im Durchschnitt gleichen sich die einzelnen Allele der Zelllinien, so dass eine klare Einteilung der untersuchten Zelllinien in Gruppen vorgenommen werden kann.

Die Analyse der Daten aus der Bisulfidsequenzierung bestätigte und vertiefte die Daten aus *Kapitel 3.7.2*: Die Proben mit hoher DcR2-Expression, das heißt die Normalproben und die Tumorproben Tu38 und Tu89, wiesen einen deutlich niedrigeren Methylierungsstatus der CpG-Inseln im Sequenzbereich des DcR2-Transkriptionsstarts auf. Dagegen zeigten die Tumorproben mit reduzierter DcR2-Expression (Tu232, 209, 183) eine gesteigerte Methylierung, vor allem der am 5'-Ende gelegenen CpG-Dinukleotide. Auffällig war weiter der Methylierungsstatus der beiden Zelllinien: PC3 zeigte sich fast komplett methyliert und LNCaP fast komplett unmethyliert. Die Daten bestätigen die Ergebnisse der MS-PCR für DcR2. Ferner unterstützen sie die Theorie einer epigenetisch bedingten Ursache für die DcR2-Herunterregulation im Prostatakarzinom, wobei das Methylierungsmuster auch in dieser Analyse nicht einheitlich war und sich in den meisten Fällen weder komplett methylierte, noch komplett unmethylierte Promotorbereiche zeigten.

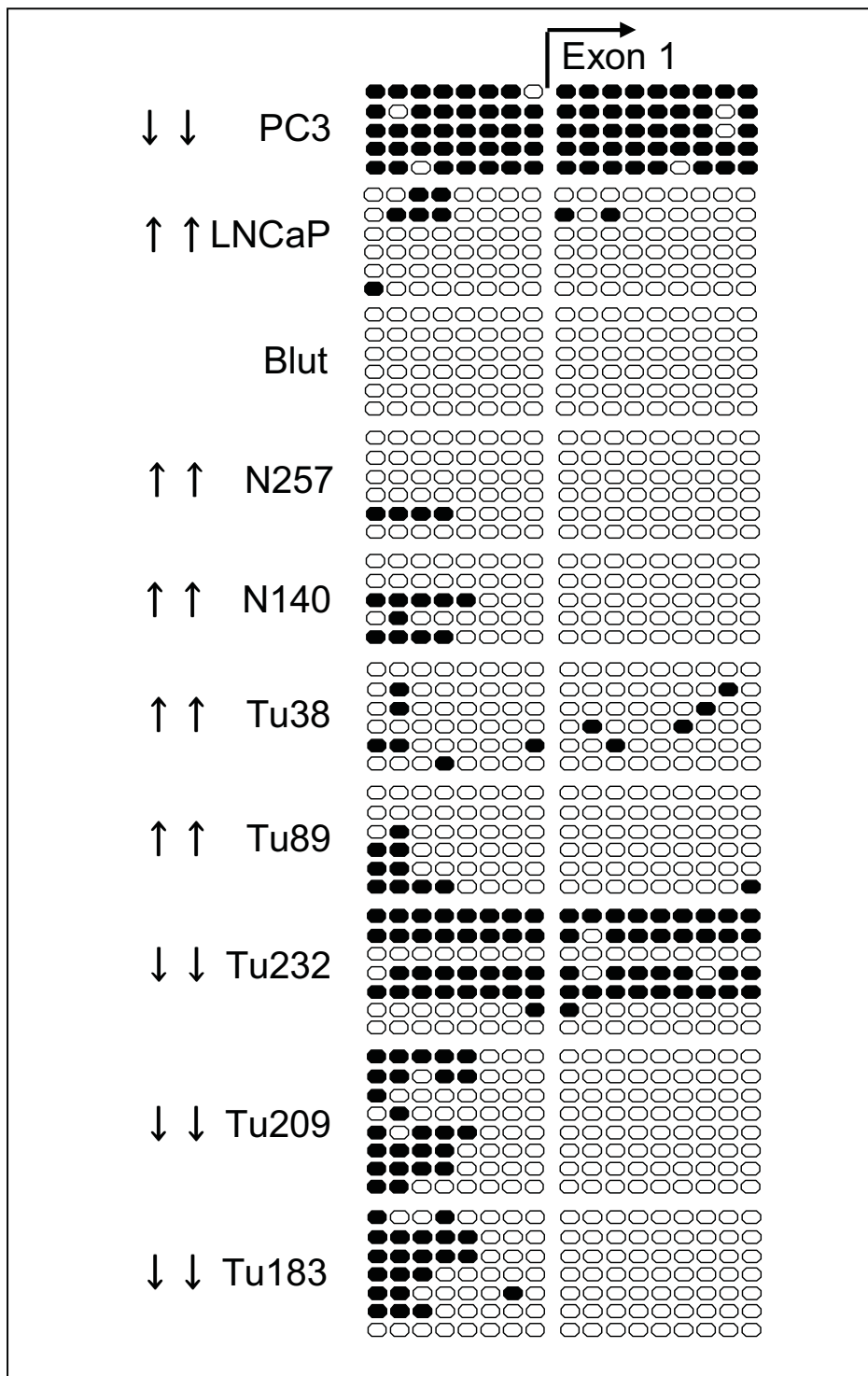


Abbildung 3.8-1: Methylierungszustand der einzelnen CpG-Dinukleotide im Sequenzbereich des DcR2 Transkriptionsstarts (schwarzes Oval: methyliertes CpG-Dinukleotid, weißes Oval: unmethyliertes CpG-Dinukleotid), Abwärtspfeile kennzeichnen bei den entsprechenden Proben eine niedrige DcR2-Expression, Aufwärtspfeile eine hohe Expression.

3.9 Funktionelle Analyse / Zellkultur

Im Anschluss an die Methylierungsanalysen der beiden Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 wurde der Einfluss des Liganden TRAIL in die Untersuchung eingeschlossen. Diese funktionelle Analyse sollte den epigenetischen Effekt auf den gesamten TRAIL-Signalweg identifizieren, vom Liganden bis zum Rezeptorvermittelten Zelltod.

Dabei wurden die Prostatakarzinom-Zelllinien PC3 und LNCaP *in vitro* mit TRAIL in ansteigender Konzentration inkubiert. Wie bei der Expressionsanalyse lagen die Zelllinien in unbehandelter Form, nach Vorbehandlung mit AZA, SAHA, oder mit der Kombination von AZA+SAHA vor.

Zunächst wurde der MTT-Assay durchgeführt, um unspezifisch die Toxizität von TRAIL auf die Zelllinien zu untersuchen. Danach folgte der Apoptose-Assay, um zu klären, ob eine eventuelle Apoptose-Induktion durch TRAIL für die Zelltoxizität verantwortlich war.

3.9.1 MTT-Assay

Der Assay wurde eingesetzt, um einen synergistischen Effekt zwischen der toxischen Wirkung verschiedenen TRAIL-Konzentrationen auf Prostatakarzinom-Zelllinien und der Vorbehandlung mit dem DNA-Methylaseinhibitor 5-Aza-dC, sowie dem Histon-Deacetylase-Inhibitor SAHA festzustellen.

Während bei PC3 die Vorbehandlung mit AZA und SAHA unter TRAIL-Inkubation einen additiven Effekt zeigten, führte bei LNCaP allein die SAHA-Behandlung zu einer deutlich verstärkten Abnahme der Zellzahl.

Dabei blieb die Konzentrationsabhängigkeit des Zelluntergangs bei steigender TRAIL-Konzentration bei den verschieden vorbehandelten Zelllinien annähernd gleich. Deutliche Reduktionen der Zellzahlen traten erst bei höheren TRAIL-Konzentrationen (ca. 200 ng/ml) auf. Bei PC3 gelang es unter der höchsten TRAIL-Konzentration bei der AZA/SAHA behandelten Zelllinie die Zellzahl auf annähernd Null zu reduzieren, während bei LNCaP bei der SAHA behandelten Zelllinie steigende TRAIL-Konzentrationen kaum noch eine Wirkung zeigten.

Der parallel verschobene Kurvenverlauf lässt eher auf einen additiven Effekt von TRAIL-Wirkung und epigenetischer Inaktivierung der TRAIL-Rezeptoren schließen. Bei einem synergistischen Effekt müsste sich die Dosiskurve deutlich verschieben.

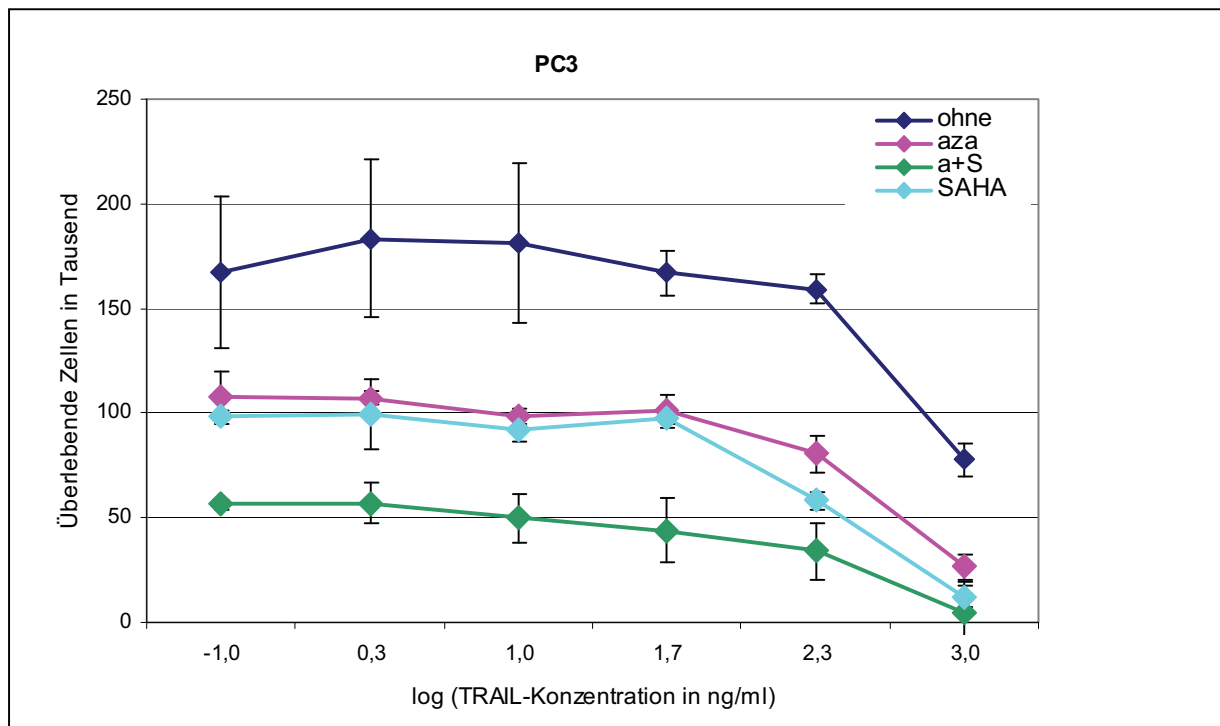


Abbildung 3.9.1-1: Ergebnisse des MTT-Assays für die Prostatakarzinom-Zelllinie PC3. Siehe Legende in der Abbildung

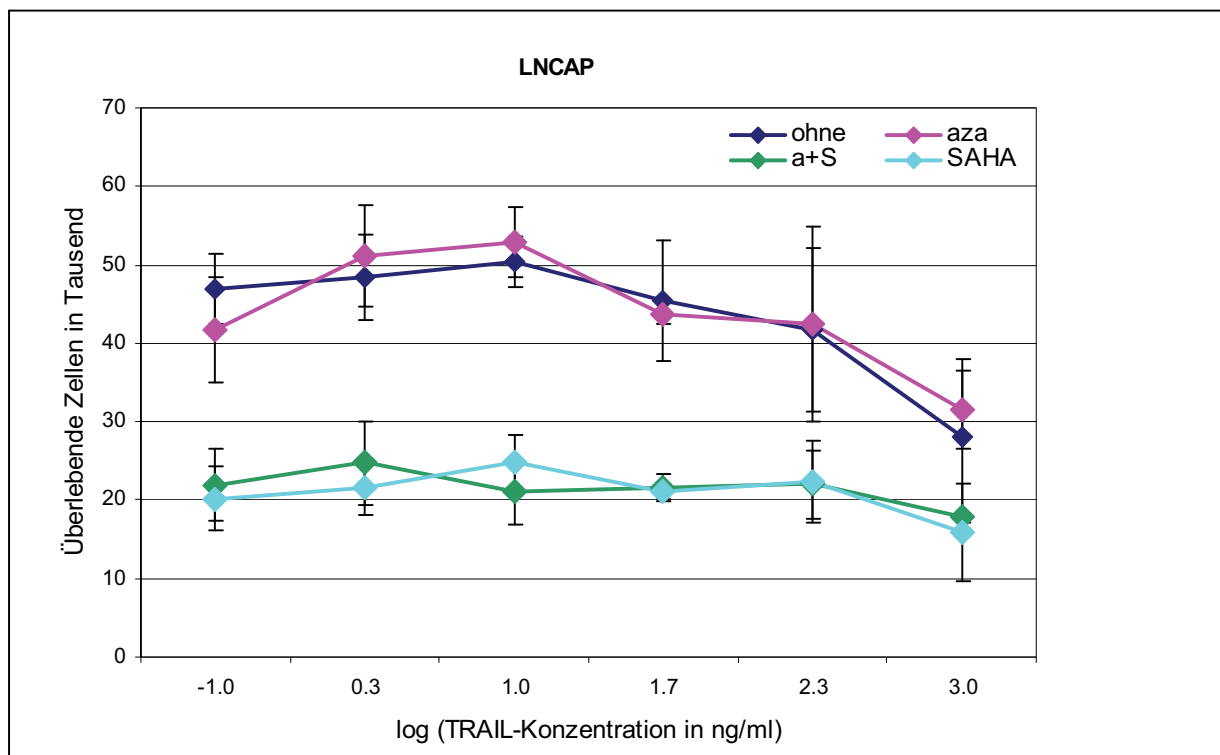


Abbildung 3.9.1-2: Ergebnisse des MTT-Assays für die Prostatakarzinom-Zelllinie PC3. Siehe Legende in der Abbildung

3.9.2 Apoptose-Assay

Der Assay wurde als funktioneller Test im Anschluss an den CellTiter-Glo® Test eingesetzt, um die Apoptoseaktivierung in Prostatakarzinom-Zelllinien durch verschiedenen TRAIL-Konzentrationen und der Vorbehandlung mit dem Methylaseinhibitor 5-Aza-dC, sowie dem Histon-Deacetylase-Inhibitor SAHA näher zu untersuchen. Die gemessene Lumineszenz ist dabei direkt proportional zu der Menge an aktivierter Caspase und somit ein direktes Maß für die Apoptoseaktivierung.

Während es bei der Zelllinie PC3 bei steigenden TRAIL-Konzentrationen zu einer zunehmenden Apoptoseaktivierung kam, war dies bei LNCaP umgekehrt.

Bei PC3 fand sich die stärkste Apoptoseaktivierung bei den unbehandelten und den SAHA-behandelten Zellen, wobei es zu einer relativ gleichmäßigen Zunahme bei steigender TRAIL-Konzentration kam. Die AZA- und die AZA-SAHA-behandelten Zellen zeigten dagegen vor allem bei niedrigen TRAIL-Konzentrationen ein Apoptosezunahme, wobei die Entwicklung zu höheren Konzentrationen hin, nach einer Plateau-Phase, eher rückläufig schien. Da auch hier die Kurven annähernd parallele Verläufe zeigten, lässt sich kaum auf einen synergistischen Effekt zwischen den hier untersuchten epigenetischen Regulationsmechanismen und der TRAIL-Wirkung schließen, zumal die unbehandelten PC3-Zellen die relativ höchste Apoptoseaktivierung zeigten.

Somit ist es fraglich, in welchem Ausmaß die TRAIL-induzierte Apoptose zu der doch deutlichen Abnahme der Zellzahl im PC3-MTT-Assay beigetragen hat – beziehungsweise welche anderen Mechanismen für den Zelluntergang verantwortlich gewesen sein könnten.

Bei LNCaP wirft sich diese Frage noch stärker auf, da mit zunehmenden TRAIL-Konzentrationen die Apoptoseaktivierung bei allen Zellen auf nahezu Null zurückging. Dabei passten zumindestens die Ausgangswerte zu den Ergebnissen des MTT-Assays: bei den mit AZA und SAHA kombiniert behandelten, sowie den SAHA-behandelten Zellen war die Apoptoseaktivierung bei der niedrigsten TRAIL-Konzentration am höchsten. Dabei zeigten die AZA-, sowie die unbehandelten Zellen, wie im vorherigen Versuch, kaum ein Ansprechen auf die TRAIL-Inkubation.

Trotzdem ist auch hier festzuhalten, dass die Apoptoseaktivierung bei steigenden TRAIL-Dosen zum Teil stark abnahm und somit nicht für den im Vorversuch festgestellten eher schwachen Rückgang der Zellzahl der Zelllinie LNCaP verantwortlich gewesen sein kann.

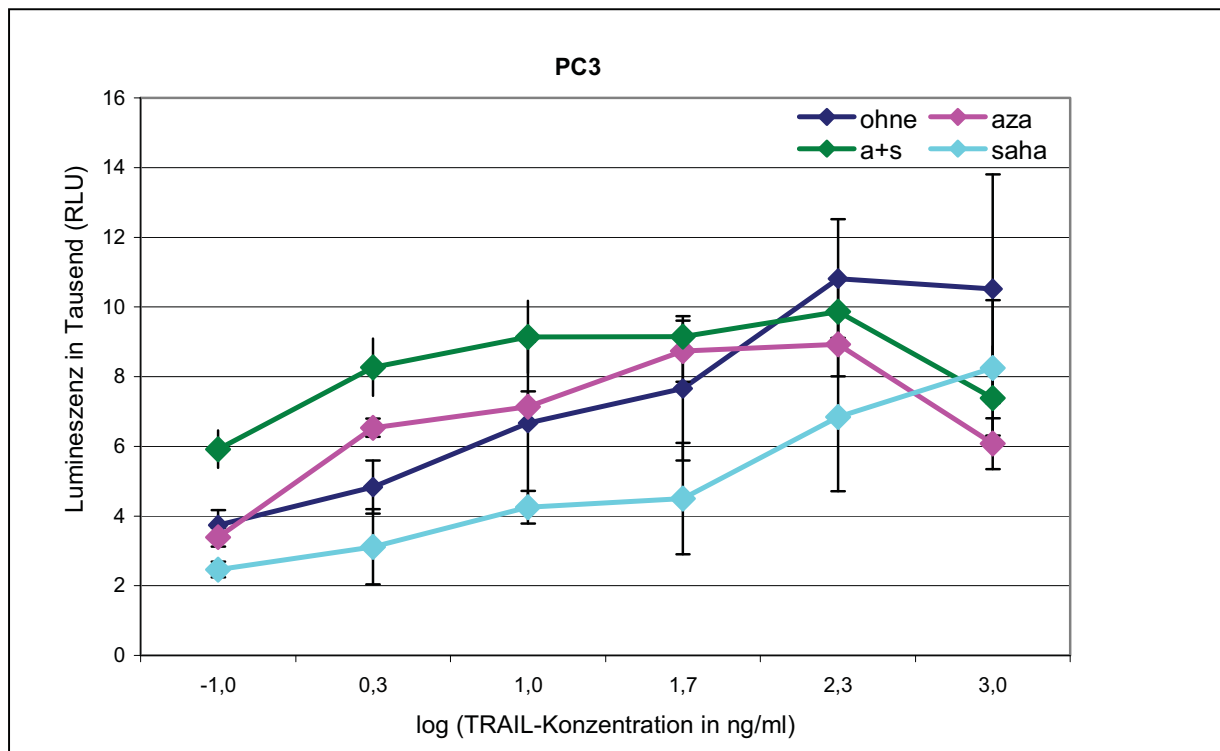


Abbildung 3.9.2-1: Ergebnisse des Apoptose-Assays für die Prostatakarzinom-Zelllinie PC3. RLU: relative light units. Siehe Legende in der Abbildung

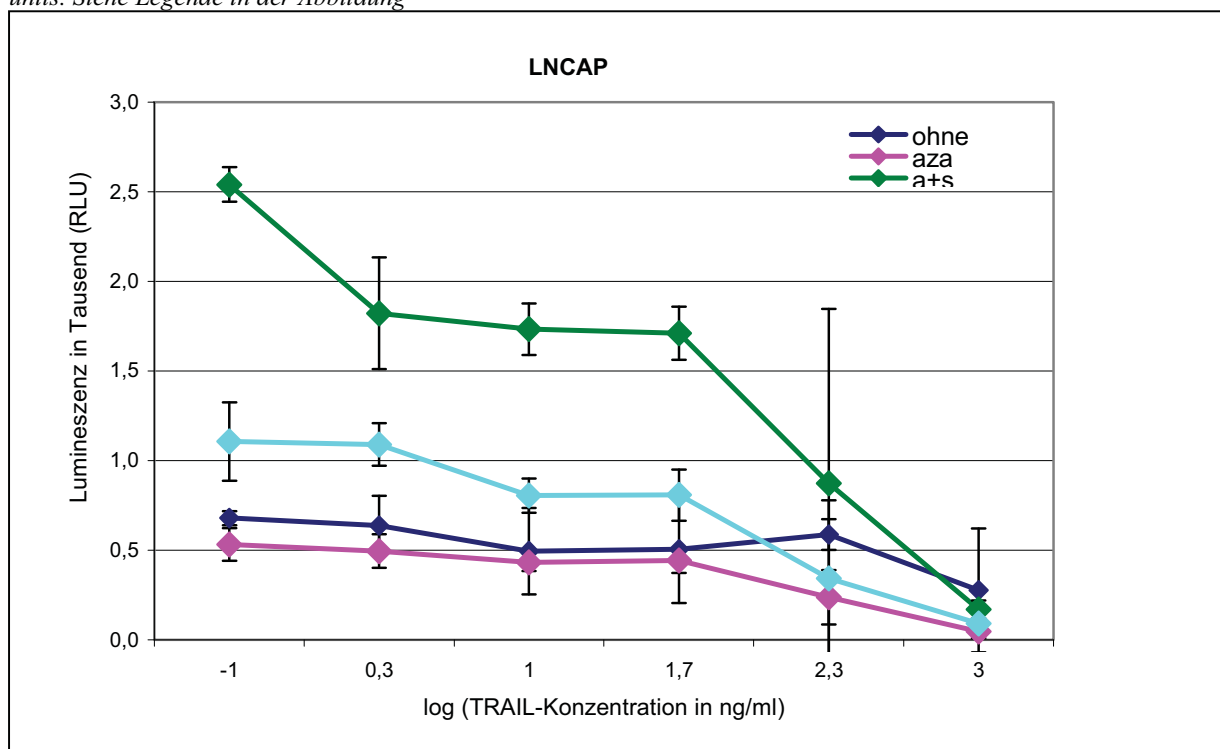


Abbildung 3.9.2-2: Ergebnisse des Apoptose-Assays für die Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP. RLU: relative light units. Siehe Legende in der Abbildung.

4 DISKUSSION

Ein wesentlicher Grundsatz der Tumorbilogie ist, dass wiederkehrende chromosomale Veränderungen in menschlichen Tumoren auf Orte hindeuten, an denen sich Gene befinden, die funktionell für deren Entwicklung und Ausbreitung wichtig sind. Diese Feststellung beruht auf der Beobachtung, dass spezifische chromosomale Verluste häufig die zweite Kopie eines Tumorsuppressor-Gens inaktivieren, während chromosomale Zugewinne oder Amplifikationen zu einer Überexpression von Onkogenen führen. Zum Beispiel kennzeichnet der Verlust von 17p häufig die funktionelle Inaktivierung von p53, während Zugewinne oder Amplifikationen von 8q24 oft mit einer Überexpression des MYC-Onkogens verbunden sind. Unglücklicherweise ist der Zusammenhang zwischen chromosomalen Verlusten und Zugewinnen und der Inaktivierung beziehungsweise onkogenetischen Aktivierung von individuellen Genen nicht immer eindeutig. Beispielsweise sind Verluste von Chromosom 8p im Prostatakarzinom sehr häufig, aber eine eindeutige Verbindung zu der Inaktivierung eines bestimmten Gens konnte noch nicht hergestellt werden. Sogar Zugewinne und Amplifikationen der 8q24-Region, die besonders häufig in fortgeschrittenen Stadien gefunden werden, sind nicht strikt mit der Überexpression des MYC-Gens verbunden [Savinainen, 2004].

Trotzdem ist die Frage wichtig, welche Gene von diesen genetischen Veränderungen betroffen sind, denn sie sind eindeutig mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert. In einer großen Anzahl von Studien konnte nachgewiesen werden, dass entweder Zugewinn von 8q, oder Verlust von 8p, oder beides, mit Tumorstadium, histologischem Grad, Metastasierung, Auftreten eines Rezidivs und krankheitsspezifischem Tod korreliert (siehe *Tabelle 1.5.1.1-1*).

Da es also keine strikte Gesetzmäßigkeit für den Zusammenhang zwischen Gendosis- und Expressionsveränderungen zu geben scheint, gilt es diesen Zusammenhang stets individuell für einzelne Gene zu prüfen und dabei die zum Teil komplexen Regulationsmechanismen von der genetischen bis zu transkriptionellen (und Translations-) Ebene miteinzubeziehen.

Daher haben wir die Auswirkungen klassischer chromosomaler Veränderungen im Prostatakarzinom auf das Expressionsverhalten von vier Kandidatengen und weiteren zehn, zumeist in einer von uns durchgeführten Arrayanalyse differentiell exprimierten Genen, näher untersucht. Im Folgenden sollen die gefundenen Ergebnisse und Zusammenhänge im Kontext der aktuellen Literatur und mit Blick auf Relevanz für klinische Anwendung wie auch Einsichten in die Biologie des Prostatakarzinoms dargestellt werden.

4.1 Veränderungen der Expression von Chromosom 8 Genen im Prostatakarzinom

4.1.1 PPP2CB

Die Serin-/Threonin-Phosphatase 2A (PP2A) umfasst eine große Familie von mindestens 72 heterodimeren Enzymen [Janssens, 2001; Sontag, 2001]. Das Kernenzym ist ein Dimer, der aus dem Zusammenschluss der katalytischen C- (PP2A-C) mit der Gerüstfunktion ausübenden A-Untereinheit (PP2A-A) entsteht. Die Substratspezifität des Kernenzym wird zum Teil durch Interaktion mit verschiedenen regulatorischen B-Untereinheiten (PP2A-B) erzielt. Die B-Untereinheiten teilen sich in vier Familien auf (B, B', B'', B'''), jede mit multiplen Isoformen und Spleiß-Varianten (siehe *Abbildung 4.1.1-1*).

Die in dieser Arbeit untersuchte Form ist PPP2CB, die β -Isoform von PP2A-C. Während die Expression von PPP2CB in der Mikroarray-Analyse erhöht war, zeigte sie sich in der Expressionsanalyse (RT-PCR) deutlich erniedrigt ($p = 0,023$). Die Diskrepanz dürfte vor allem darauf beruhen, dass bei beiden Experimenten zum Teil unterschiedliche Normal- und Prostatakarzinomproben untersucht und miteinander verglichen wurden.

Bei der RT-PCR-Analyse nahm das Signifikanzniveau bei Einengung der Proben auf jene mit LOH auf 8p ($p = 0,002$) und LOH im Genbereich ($p = 0,001$) weiter zu und die Tumorgruppe mit LOH auf Chromosom 8p zeigte eine deutlich niedrigere Expression als jene ohne LOH ($p = 0,002$). In diesem Fall besteht also ein deutlicher Zusammenhang zwischen Verlusten genetischen Materials und einem erniedrigten Expressionsniveau. Bei keinem anderen Gen war dieser Zusammenhang so deutlich. Dabei war die Anzahl von Tumorproben mit LOH im Genbereich in der Regel bei allen Genen relativ klein (fünf bis zehn Proben) und somit die statistische Auswertung erschwert. Eine Untersuchung mit anderem Versuchsdesign und höheren Probenzahlen würde hier Aufschluss liefern.

Ferner erscheint eine Regulation der PPP2CB-Expression durch methylierungsspezifische Veränderungen eher unwahrscheinlich, da kein Einfluss des Methylase-Inhibitors 5-Aza-dC zu beobachten war. Dieser Zusammenhang bedarf jedoch der weiteren Klärung (*Kapitel 3.6.1*).

Die Expression von PPP2CB im Prostatakarzinom wurde in zwei Studien untersucht [Wissmann, 2003; Prowatke, 2007]. In beiden war PPP2CB im Tumorgewebe herunterreguliert, ferner finden sich Deletionen des entsprechenden Genbereichs in konventioneller CGH und Array-CGH in 23%-31% der Fälle (Übersicht in [Prowatke, 2007]), ohne dass jedoch ein signifikanter

Zusammenhang zu prognostischen Parametern wie Gleason-Summe und pT-Stadium gezeigt werden konnte. Dies steht in Einklang mit den gefundenen Daten dieser Arbeit, wobei Prowatke et al. die Expression von PPP2CB weitestgehend auf Proteinebene untersucht haben.

Der genaue funktionelle Unterschied dieser katalytischen Untereinheit zu den anderen Untereinheiten und die Bedeutung der verringerten Expression sind bis dato schwierig einzuschätzen. Kürzlich konnte eine erniedrigte Expression von PPP2AC mit erhöhter Gleason-Summe und höherem pT-Stadium in Verbindung gebracht werden [Singh, 2007; , 2008]. Dieses Gen kodiert für eine Struktur-Variante der katalytischen Untereinheit und liegt auf Chromosom 5q31.1.

Insgesamt wird der PP2A und damit ihren zur Zeit bekannten 72 Holoenzym-Varianten eine tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben. Diese These wurde erst kürzlich durch eine Arbeit unterstützt, die PP2A in einem Tumorsuppressor-Netzwerk sieht, das die onkogene Wirkung des PKB/AKT-Signalweges hemmt [Trotman, 2006]. Im Wesentlichen beruht die Annahme aber auf der Erkenntnis, dass die PP2A Ziel vieler onkogener Faktoren ist, wie dem Tumorpromotor Okadain-Säure [Gehringer, 2004], und dem kleinen Simian-Virus 40 Antigen (SV40 small t), einem Onkoprotein. Jedoch fördert Okadain-Säure in einigen Zelltypen Wachstum und hemmt die Transformation, was die vermutete tumorsuppressive Rolle von PP2A wiederum in Frage stellt. Gezielte Untersuchung an Prostatakarzinomzelllinien liegt bisher nicht vor.

Weitere Hinweise auf eine Rolle von PP2A in der Tumorgenese stammen von der Identifizierung spezifischer Veränderungen (Mutationen, Deletionen, LOH) und herabgesetzter Expression selektiver Untereinheiten (B'/B56) in Lungen-, Kolon-, Mamma-Karzinom und Hirn-Tumoren, sowie in verschiedenen Tumor-Zelllinien [Arroyo, 2005; Janssens, 2005]. Auch im kanonischen β -Catenin/WNT-Signalweg, der vor allem im Prostatakarzinom zunehmend aktiviert wird, kommt diesem PP2A-Isoenzym eine wichtige Rolle zu: B56/PR61 reguliert hier, als Teil des β -Catenin-Abbau-Komplexes, den WNT-Signalweg negativ [Seeling, 1999; Yamamoto, 2001]. Im Gegensatz dazu scheint der PP2A-C-Enzymkomplex eben diesen Signalweg jedoch an einem späteren Schritt positiv zu beeinflussen [Ratcliffe, 2000]. Ähnliche scheinbar widersprüchliche Daten finden sich für den MAP-Kinase-Signalweg, in dem PP2A über Dephosphorylierung des RAF-1 Onkoproteins zum einen aktivierende, zum anderen aber auch inhibierende Wirkung zeigt [Schonthal, 2001].

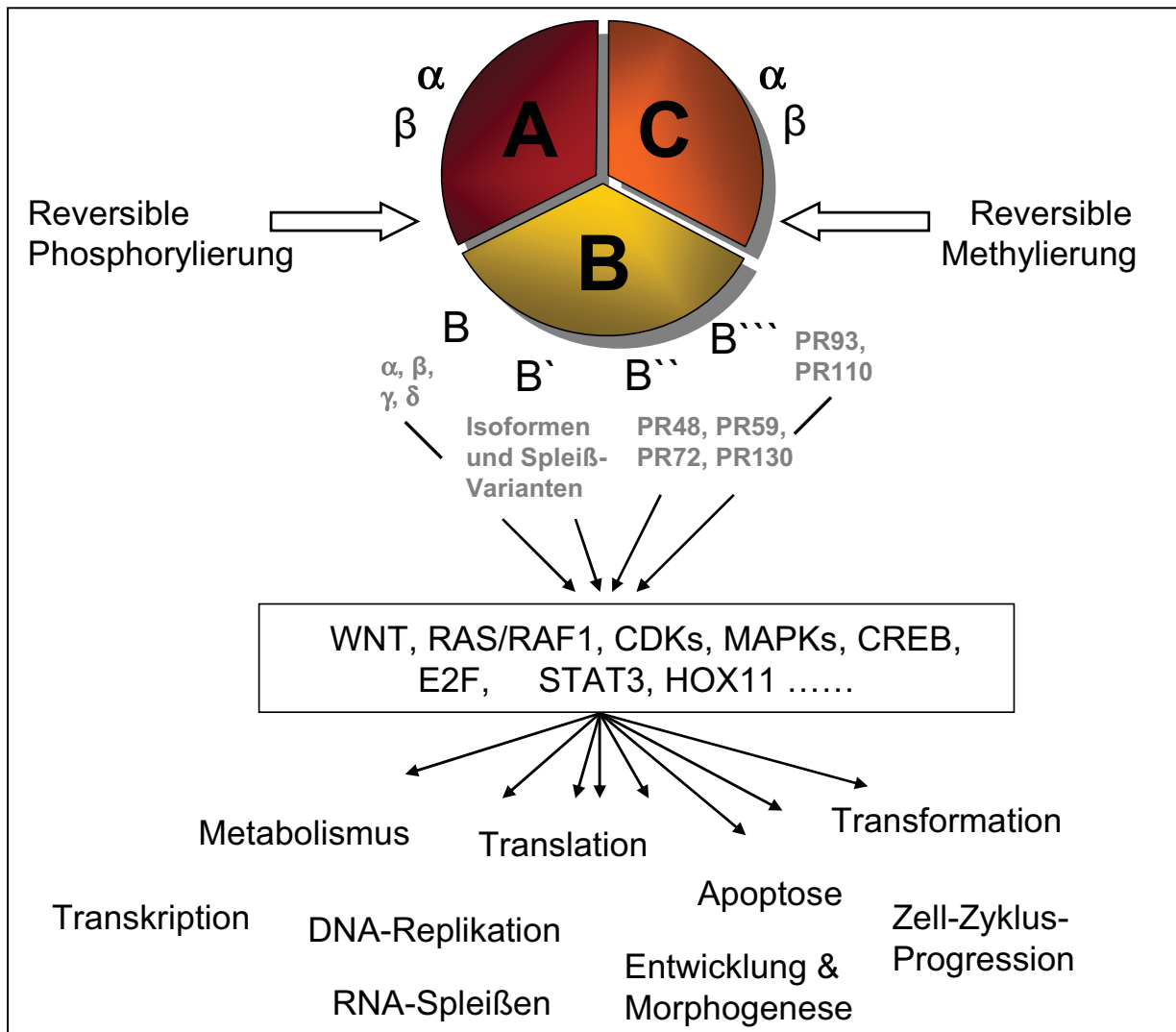


Abbildung 4.1.1-1: Übersicht über die PP2A-Holoenzymfamilie, mit der regulatorischen A-, der katalytischen C- und der hochvariablen regulatorischen B-Untereinheit. A und C bilden das Kernenzym. Weiter sind ein Auszug der Substrate und Signalwege der Proteinphosphatase abgebildet (hauptsächlich Transkriptionsfaktoren und Proteinkinase) und die zellulären Funktionen, die PP2A über diese beeinflusst. Zu Einzelheiten siehe Text.

Die genannten Beispiele verdeutlichen die Problematik: zwar kann der Proteinphosphatase 2A eine essentielle Bedeutung für Zell-Überleben, Zellzyklus-Regulation, Antwort auf DNA-Schäden und embryonale Entwicklung und entsprechenden Signalwegen zugeschrieben werden [Janssens, 2001; Sontag, 2001]. Jedoch ist die Rolle der einzelnen Holoenzym-Varianten zum einen dichotom, zum anderen völlig unbekannt. Am besten scheint noch die B-Untereinheit untersucht, die auch Gewebe- und Substratspezifität bestimmen soll [Janssens, 2005]. Dazu kommt, dass die Regulation, Substratspezifität und zelluläre Lokalisation der

Proteinphosphatase nicht nur auf der Zusammensetzung des Enzymkomplexes aus seinen Untereinheiten beruht, sondern auch Methylierungsveränderungen, reversibler Phosphorylierung und dem Zusammenspiel mit zellulären Inhibitoren unterliegt [Zolnierowicz, 2000]. Dies gilt insbesondere für die katalytische Untereinheit C, deren Aktivität stark von Phosphorylierungs- und Methylierungsveränderungen abhängt [Brautigan, 1995; Ogris, 1999; Tolstykh, 2000; Wu, 2000].

Zusammenfassend bedarf eine Interpretation der gefundenen Expressionsdaten von PPP2CB im Prostatakarzinom weiterer grundlegender Untersuchung. Als Ursache für die Herunterregulation sind Allelverluste auf 8p zumindest teilweise verantwortlich. Zwar ist eine tumorsuppressive Wirkung von PPP2CB vor dem wissenschaftlichen Hintergrund wahrscheinlich, jedoch derzeit nicht belegbar.

4.1.2 PPP3CC

Eine andere Serin-/Threoninphosphatase mit Genlokalisierung auf Chromosom 8p ist PPP3CC. Sie kodiert für die katalytische γ -Untereinheit (CNA γ) von Calcineurin (PP2B). Calcineurin besteht neben der katalytischen A-Einheit, mit drei Untereinheiten (α , β , γ), aus einer Calciumbindenden Einheit C und Calmodulin. Es sind vier Enzymvarianten bekannt (PPP3R1, PPP3CA, PPP3CC, PPP3CB), deren genaue Funktionen noch unbekannt sind, wobei bei Veränderungen im PPP3CC-Genbereich eine Anfälligkeit zur Entwicklung einer Schizophrenie nachgewiesen werden konnte [Gerber, 2003]. Die Expression von PPP3CC ist wesentlich auf Hirn und Hoden beschränkt, während die anderen Varianten ubiquitär vorkommen ([Baines, 2005], siehe *Abbildung 4.1.2-1*)

Bei der RT-PCR-Expressionsanalyse fanden sich verminderte Expressionwerte von PPP3CC in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebeprobe, die unter dem Einfluss allelischer Imbalancen noch zunahm ($p = 0,007$ bis $p = 0,002$). Bei der Korrelation mit klinischen Parametern fiel eine signifikant erniedrigte Expression in der Tumorgruppe mit Auftreten eines Rezidivs auf, die in der Überlebensanalyse bestätigt wurde: Tumorproben mit niedriger PPP3CC-Expression wiesen ein deutlich kürzeres rezidivfreies Intervall auf (Log Rank $p = 0,0026$).

Nach unserem Wissen ist dies die erste Arbeit, die die PPP3CC Expression gezielt im Prostatakarzinom untersucht hat. Die Auswirkungen der Expressionsveränderungen auf die

Proteinebene, und damit die Relevanz der gefundenen Daten für die phänotypische Ausprägung, sind im Prostatakarzinom noch nicht untersucht und bedürfen weiterer Klärung.

Calcineurin oder PP2B wird generell durch steigende Ca^{++} -Spiegel aktiviert und kann durch das Zusammenspiel mit verschiedenen Zielsubstraten völlig unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Medizinische Relevanz erlangt Calcineurin schon früh als Ziel der Chemotherapeutika Cyclosporin A und FK506, die das Enzym hemmen und breite klinische Anwendung finden (zum Beispiel in Form von Tacrolimus bei der atopische Dermatitis).

Calcineurin wurde zunächst als essentieller Faktor für die T-Zell-Aktivierung und -Reifung bekannt. Hierbei wirkt das Enzym über die Dephosphorylierung und nachfolgende Aktivierung von NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-Cells) [Liu, 2001]. Calcineurin scheint über NF-AT überwiegend positiv auf die Zelldifferenzierung in T-Zellen zu wirken. Es ist auf diesem Wege auch Mediator von Herzhypertrophie und Kardiomyopathie [Baines, 2005; Koyanagi, 2005]. Des Weiteren reguliert die Phosphatase aber auch die Ca^{++} -induzierte Apoptose. So kann sie über die Dehosphorylierung von BAD proapoptotisch [Wang, 1999; Bueno, 2004] beziehungsweise durch die Induktion von Mitgliedern der BCL-2-Familie [Iwai-Kanai, 2004] sowie die Inaktivierung von I κ B β und subsequente Aktivierung von NF κ B/Rel-Faktoren im mitochondrialem Stress-Signalweg [Biswas, 2003] antiapoptotisch wirken.

Die Relevanz von Calcineurin und PPP3CC für das Prostatakarzinom könnte auch auf ihrem Einfluss auf den WNT-Signalweg herrühren. Der kanonische β -Catenin-abhängige Signalweg unterliegt im fortschreitenden Prostatakarzinom einer zunehmenden Aktivierung. Dabei scheint die onkogene Wirkung, zumindest in Androgenrezeptor- (AR) positiven Zellen, vor allem durch AR-abhängige und weniger durch die klassischen TCF (T-Cell-Factor)-abhängigen Mechanismen vermittelt zu werden [Chesire, 2003; Cronauer, 2005]. Es findet sich eine Hochregulation von zum Beispiel WNT und β -Catenin, die auch einen signifikanten Zusammenhang mit dem Metastasierungsverhalten zeigt [Emami, 2007]. Calcineurin ist wichtiger Bestandteil des nicht-kanonischen, β -Catenin-unabhängigen WNT-Signalwegs und wirkt über NF-AT positiv auf Zelldifferenzierung und Polarisation und damit antagonistisch zu dem kanonischen Signalweg [Crabtree, 2002; Pandur, 2002; Kuhl, 2004].

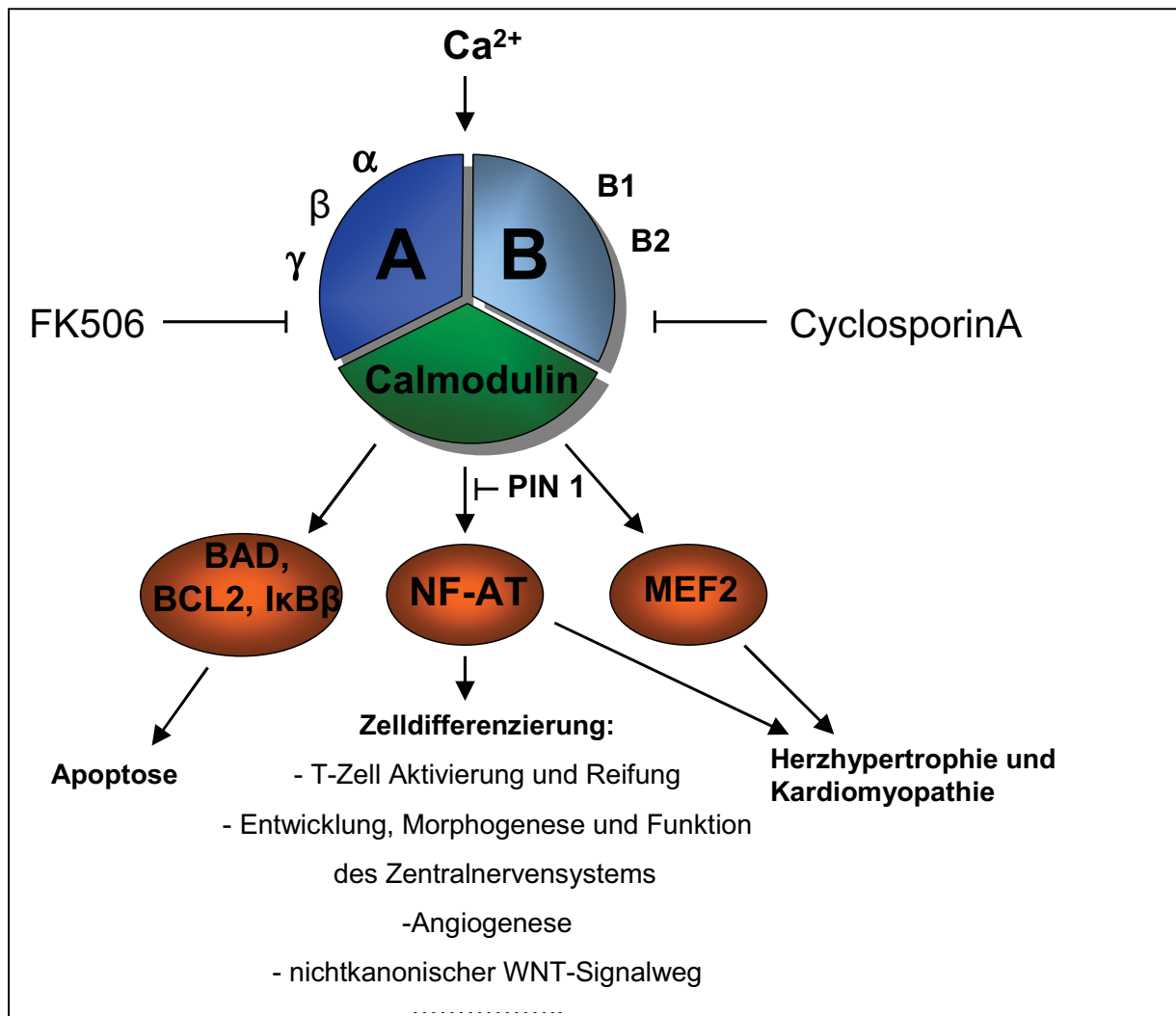


Abbildung 4.1.2-1: Übersicht über den PP2B/Calcineurin-Aufbau und Auszug der wichtigsten Calcineurin-vermittelten Funktionen (MEF2 = myocyte enhancer factor-2). Zu Einzelheiten siehe Text.

In diesem Kontext ist bemerkenswert, dass die Prolylisomerase PIN 1 im Prostatakarzinom nicht nur eine erhöhte Expression, sondern auch eine positive Korrelation mit pT-Stadium und dem frühen Auftreten eines Rezidivs zeigt [Ayala, 2003]. PIN 1 hemmt zum einen die Calcineurin-abhängige Aktivierung von NF-AT [Liu, 2001], zum anderen aktiviert die Isomerase direkt den β-Catenin-Signalweg im Prostatakarzinom wahrscheinlich über eine Aufhebung der AR-β-Catenin-Interaktion [Chen, 2006] und stabilisiert somit den β-Catenin-Spiegel in der Zelle.

Die Rolle von Calcineurin im WNT-Signalweg scheint so eine negativ regulatorische, β-Catenin-hemmende und somit tumorsuppressive zu sein. Obwohl die genaue Rolle der katalytischen γ-Untereinheit PPP3CC im Prostatakarzinom noch völlig ungeklärt ist, bestärken die gefundenen

Daten von einem kürzeren rezidivfreien Intervall bei Herunterregulation des Gens dieses Bild eines möglichen wichtigen Tumorsuppressors.

Ob die gefundenen Veränderungen von PIN 1 und Calcineurin ergänzend oder synergistisch sind und ob sie sich wirklich über den WNT-Signalweg auf den klinischen Verlauf auswirken, bedarf weiterer Klärung.

4.1.3 TRAIL-Rezeptorfamilie

Da die Apoptoseinduktion in menschlichen Tumoren eine vielversprechende Behandlungsweise darstellt, die ergänzend zu anderen Therapieverfahren durchgeführt werden kann, werden Todesliganden in letzter Zeit als potentielle therapeutische Ziele evaluiert [Sanlioglu, 2007].

Neben TNF und FASL steht TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) oder „ApoL“ wegen seiner vermuteten selektiven Apoptoseinduktion in Tumorzellen und seiner ebenfalls vermuteten geringen systemischen Nebenwirkungen besonders im Fokus des Interesses [Nagane, 2001]. Andererseits ist eine nicht geringe Anzahl von Malignomen (ca. 60%) scheinbar gegen TRAIL resistent.

Zurzeit ist jedoch weder der Mechanismus geklärt, durch den TRAIL selektiv in maligne entarteten Zellen Apoptose induzieren soll, noch, wie resistente Gewebe der Apoptoseinduktion entgehen. Es existieren jedoch zwei Theorien zu dieser Problemstellung. Die erste besagt, dass normale Zellen sogenannte Decoy-(Köder-) receptoren tragen (DcR1 und DcR2), die mit den TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 kompetitiv um die TRAIL-Bindung streiten [Sheridan, 1997]. Die zweite These postuliert die Anwesenheit von Apoptose-inhibierenden Substanzen oder Überlebens-Faktoren in TRAIL-resistenten Zellen [French, 1999].

4.1.3.1 Expression und klinische Parameter

Während die beiden Todesrezeptoren DR4 und DR5 keine differentielle Expression zwischen Tumor- und Normalgewebenproben zeigten, waren beide Decoy-Rezeptoren in Tumorgewebe herunterreguliert, besonders in Proben mit LOH auf Chromosom 8p. Die OPG-Expression war leicht erniedrigt ($p = 0,061$). Bei dem Vergleich mit prognostischen Parametern zeigte sich für DR5 und DcR1 ein signifikanter, für OPG weniger deutlicher ($p = 0,066$), Zusammenhang mit dem Rezidivstatus: DR5, DcR1 und OPG zeigten bei Tumoren mit biochemischem Rezidiv eine erniedrigte Expression. Dieser Trend konnte in der Überlebensanalyse nach Kaplan Meier für DcR1 und OPG bestätigt werden: niedrige Expressionswerte korrelierten mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall. DcR1 zeigte weiter eine signifikant erniedrigte Expression in lokal fortgeschrittenen Tumoren (pT3) im Vergleich zu organbegrenzten (pT2). An diesem Punkt scheint vor allem eine niedrige DcR1-Expression auf ein aggressiveres Tumorverhalten hinzudeuten. Da diese Ergebnisse aber auf den ersten Blick im Widerspruch zu vielen anderen

wissenschaftlichen Arbeiten zu stehen scheinen, soll hier zunächst der TRAIL-Signalweg genauer betrachtet werden.

4.1.3.2 Apoptoseinduktion durch TRAIL und seine Rezeptoren

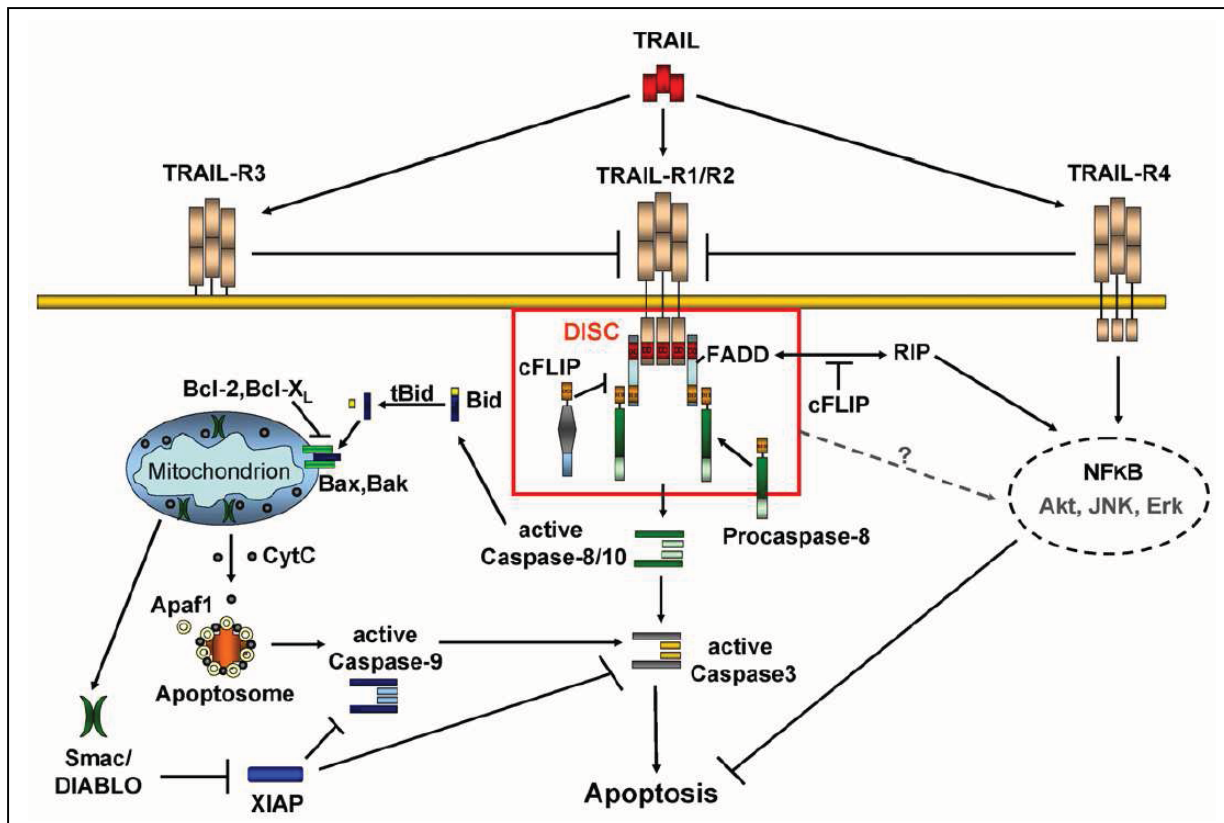


Abbildung 4.1.3.2-1: Übersicht über pro- und antiapoptotisch wirkende TRAIL-Signalwege. Zu Einzelheiten siehe Text (aus [Falschlehner, 2007]).

Die Wirkung von TRAIL auf Prostatakarzinom-Zelllinien wurde bereits vielfältig analysiert [Bucur, 2006], während die vier TRAIL-Rezeptoren (TNFRSF10A-D) mit Lage auf Chromosom 8p21.3, einer sehr häufig von Verlusten betroffenen Region im Prostatakarzinom, fast unbeachtet blieben. Es konnte gezeigt werden, dass die TRAIL-Wirkung auf verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien dramatische Unterschiede aufweist und viele Zelllinien resistent gegenüber der TRAIL-vermittelten Apoptoseinduktion sind [Bucur, 2006].

Die Relevanz einer differentiellen TRAIL-Rezeptorexpression für die TRAIL-Sensitivität von Prostatakarzinomzellen ist dagegen weitgehend unbekannt und – wenn überhaupt - liegen widersprüchliche Studiendaten vor (siehe unten).

Fest steht, dass DR4 und DR5 über ihre Todesdomäne auf TRAIL-Bindung mit einer Apoptoseinduktion reagieren. Dabei konnte zwischen beiden Rezeptoren bis jetzt kein funktioneller Unterschied festgestellt werden (Übersicht in [Falschlehner, 2007]).

Der Apoptoseweg über die Rezeptoren wird auch extrinsischer Apoptoseweg genannt. Daneben existiert noch ein intrinsischer, der vom Mitochondrium ausgeht. Mechanistisch kommt es nach Bindung von TRAIL an DR4 oder DR5 zur Trimerisierung des Rezeptors und zur Ausbildung des DISC (death inducing signalling complex). FADD (FAS Associated Death Domain) ist ein Adapterprotein, welches zum DISC transloziert und dort mit seiner Todesdomäne (DD) direkt mit der von DR4 oder DR5 interagiert (siehe *Abbildung 4.1.3.2-1*). Über seine zweite funktionelle Domäne DED rekrutiert FADD die Procaspasen 8 und 10 zum DISC, wo die Caspasen autokatalytisch aktiviert werden. Die Kaspaseaktivierung ist dabei entscheidend für die Weiterleitung des Apoptosesignals [Falschlehner, 2007]. Wird Caspase 8, oder wenn vorhanden auch Caspase 10, durch den DISC aktiviert, so hat sie zwei Hauptsubstrate im Apoptosesignalweg, nämlich Caspase 3 und BID. Spaltung und subsequente autokatalytische Aktivierung von Caspase 3 löst direkt die Caspase-Kaskade aus und führt somit zur Apoptose. Spaltung des proapoptischen BCL-2-Familienmitgliedes BID verbindet den extrinsischen mit dem intrinsischen Apoptosesignalweg.

Der intrinsische Apoptosesignalweg geht vom Mitochondrium aus und wird von Proteinen der BCL-2-Familie kontrolliert. Dabei existieren pro- (BAX, BAK, BOK) und antiapoptisch (BCL-2, BCL-X_L, MCL-1) wirksame Mitglieder. Alle sind mit der äußeren mitochondrialen Membran assoziiert. Im Falle von Apoptosestimuli destabilisieren BAX, BAK und BOK die Membran-Integrität und setzen proapoptische Faktoren aus dem Intermembranspalt frei. Letztlich führt die Freisetzung von Cytochrom C zur Apoptoseinduktion durch Caspase 9-Aktivierung.

Die Abhängigkeit vom mitochondrialen Signalweg bei der Induktion von Apoptose definiert zwei Zelltypen. Bei Typ I-Zellen wird der intrinsische Signalweg, zum Beispiel über eine BCL-2-Überexpression, blockiert, jedoch ist Apoptose durch TRAIL, wahrscheinlich durch massive Caspase 8-Aktivierung am DISC, weiter möglich. Bei Typ II-Zellen ist die DISC-Aktivierung schwächer. Sie benötigen daher eine Amplifikations-Schleife über das Mitochondrium zur

ausreichenden Aktivierung der Effektor-kaspasen und subsequenten Apoptoseinduktion [Falschlehner, 2007].

Neben den beiden apoptoseinduzierenden Rezeptoren DR4 und DR5 existieren zwei weitere TRAIL-Rezeptoren, die nach Ligandbindung kein Apoptosesignal induzieren können (Decoy- oder Köder-Rezeptoren). TRAIL-R3 oder DcR1 fehlt dabei komplett die Todesdomäne während TRAIL-R4 oder DcR2 eine trunkierte Todesdomäne besitzt. Beiden Decoy-Rezeptoren konnte in Überexpressionsstudien eine apoptoseinhibierende Wirkung nachgewiesen werden, wobei Studien unter physiologischen Bedingungen noch fehlen [Kimberley, 2004]. Daher galten sie zunächst als Onkogene.

Einige wenige Befunde zur Expression von TRAIL-Rezeptoren im Prostatakarzinom liegen jedoch vor:

- In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit [Sanlioglu, 2007] wurde die Expression der vier Rezeptoren TNFRSF10A-D in paraffin-eingebettetem Prostatagewebe von 44 Patienten immunhistochemisch untersucht. Dabei standen Proben aus BPH-Gewebe, von organbegrenzten und fortgeschrittenen Tumoren zur Verfügung. Es zeigte sich eine Hochregulation aller vier Rezeptoren sowie des Liganden TRAIL in Tumorgewebe verglichen mit Gewebe aus der BPH-Gruppe. Dabei war DcR2 in allen Gruppen am stärksten hochreguliert, besonders in fortgeschrittenen Tumoren.

Ob die gefundenen Expressionsprofile Auswirkungen auf die TRAIL-Sensitivität haben und ob die Mechanismen der TRAIL-Resistenz in Normalgewebe und Tumorgewebe die gleichen sind, konnte nicht abschließend geklärt werden.

- Eine weitere Studie [Hesry, 2006] postuliert, dass die TRAIL-Sensitivität in Prostatakarzinomzelllinien exklusiv durch DR5 mediert wird und eine DcR2-Überexpression zu einer Resistenz einiger Zelllinien (zum Beispiel LNCaP) beiträgt.
- Auf der anderen Seite konnte in mehreren Studien eine epigenetisch bedingte Suppression der DcR1 und DcR2-Expression in Prostatakarzinomen und anderen Tumorgeweben nachgewiesen werden [van Noesel, 2002; Shivapurkar, 2004; Suzuki, 2006].

Generell scheint jedoch das Verhältnis zwischen den echten Todesrezeptoren DR4 und DR5 und den Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 die TRAIL-Resistenz von Normal- wie Tumorgewebe zu bestimmen [Degli-Esposti, 1997; Pan, 1997; Sheridan, 1997; Ichikawa, 2001; Wang, 2004].

Trotzdem konnte bis jetzt in keiner Studie eine Korrelation zwischen der Decoy-Rezeptor-Expression und einer TRAIL-Resistenz in Tumorgewebe festgestellt werden.

In diesem Zusammenhang scheinen die hier gefundenen Ergebnisse zum Teil paradox, denn die Decoy-Rezeptoren (DcR1, DcR2) waren herunterreguliert und zeigten zusätzlich einen negativen Einfluss auf den Verlauf (DcR1, OPG). Dies widerspricht zunächst der postulierten tumorprotektiven Wirkung der Decoy-Rezeptoren, da eine erniedrigte Expression die TRAIL-Sensitivität des Tumors erhöhen und sich so in einem längeren rezidivfreien Intervall äußern müsste. Als mögliche Erklärung müssen hier zum einen unterschiedliche Regulationsmechanismen der TRAIL-Rezeptorexpression auf RNA- und Proteinebene bedacht werden. Zum anderen muss bei bekannter Problematik beziehungsweise begrenzter Spezifität des immunhistochemischen Nachweises strukturverwandter Proteine wie der TRAIL-Rezeptoren auf eine Bestätigung der Daten von Sanlioglu et al. gewartet werden.

Osteoprotegerin (OPG) ist der einzige lösliche TRAIL-Rezeptor. Seine Bedeutung in Bezug auf TRAIL ist aber weniger klar, da OPG eigentlich als Regulator der Entwicklung und Aktivierung von Osteoklasten während des Knochenumbaus wirkt, welche nicht durch TRAIL vermittelt wird. OPG konkurriert mit dem OPG-Liganden (auch TRANCE oder RANKL) um die Bindung mit RANK (Receptor Aktivator of NF κ B) und hemmt so die Osteoklastogenese (Übersicht in [Kimberley, 2004]). Es wird aber spekuliert, dass OPG außerdem als Überlebensfaktor fungiert, indem es eine Decoy-Funktion bei Bindung mit TRAIL entwickelt und so die Apoptoseinduktion blockiert [Emery, 1998; Pritzker, 2004]. Besondere Bedeutung hat OPG für das Prostatakarzinom in diesem Zusammenhang wegen des häufigen Auftretens von Knochenmetastasen (70% bei fortgeschrittenen Stadien). Und tatsächlich konnte ein überlebensfördernder Effekt von OPG sowohl bei metastatischen, also auch primären Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden [Holen, 2002; Nyambo, 2004]. Hingegen zeigen TRAIL^{-/-}-Mäuse keine Veränderung in der Knochendichte oder Osteoklastendifferenzierung [Sedger, 2002], wodurch eine wesentliche physiologische Rolle für TRAIL als OPG-Regulator in Frage steht.

Es scheint also wahrscheinlich, dass in malignen Tumoren einige Mechanismen abseits der Decoy-Rezeptoren existieren, die einen regulatorischen Einfluss auf die TRAIL-Wirkung haben.

4.1.3.3 Apoptose-Inhibition durch TRAIL und Überlebensfaktoren

Regulatorische Angriffspunkte des TRAIL-Signalweges finden sich schon auf Ebene der einzelnen TRAIL-Rezeptoren. Es wurden sowohl für DR4 als auch DR5 Polymorphismen beziehungsweise Mutationen gefunden, welche die Funktion der Rezeptoren zumindest teilweise beeinträchtigen (Übersicht in [Zhang, 2005]). Eine andere Studie postuliert das Vorhandensein von gemischten Rezeptorkomplexen, bestehend aus echten und Decoyrezeptoren, welche die TRAIL-Wirkung blockieren [Kimberley, 2004]. Des Weiteren ist TRAIL in der Lage über DR4 und DR5 auch antiapoptotische Signale zu vermitteln, zum Beispiel über die Induktion von NFκB.

Was die Decoy-Rezeptoren angeht, liegt der Grund für ihre TRAIL-inhibitorische Wirkung nicht nur in einem Abfangen von TRAIL, sondern auch in der Signaltransduktion antiapoptotischer Stimuli in der Zelle [Kimberley, 2004]. Besonders DcR2 ist über seine trunkierte Todesdomäne anscheinend in der Lage NFκB zu aktivieren [Degli-Esposti, 1999; Hu, 1999]. Vor diesem Hintergrund scheint der Begriff „Decoy“ nicht ganz zutreffend, da zumindest DcR2 eindeutig regulatorische Funktion auf den TRAIL-Signalweg hat und nicht nur die TRAIL-Wirkung blockiert.

Über NFκB werden zum einen überwiegend antiapoptotische Kaskaden aktiviert, zum anderen scheint der Faktor auch in der Lage die DcR1-Expression hochzuregulieren [Bernard, 2001; Shetty, 2002]. Des Weiteren reguliert der Faktor direkt nicht nur die Expression von DcR1 hoch, sondern auch die anderer antiapoptotischer Zielgene wie cIAP-1, cIAP-2, XIAP (IAP: Inhibitors of Apoptosis Proteins), cFLIP und BCL-X_L [Wajant, 2004]. Nichtsdestoweniger ist das Verhältnis pro- und antiapoptotischer Wirkungen von NFκB stark zelltypabhängig [Falschlehner, 2007]. Neben der Induktion von NFκB durch DR4, DR5 und DcR2 [Mercurio, 1997; Zandi, 1997; MacFarlane, 2003] induziert TRAIL noch andere Signalwege mit Einfluss auf die Apoptose, zum Beispiel über verschiedener MAP-Kinasen: p38-MAPK, JNK, ERK und PI3K-PKB/AKT. Speziell ist auch cFLIP Zielgen dieser Signalwege und Regulator der DISC-Formation.

Die antiapoptotische Wirkung von TRAIL wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen: Ehrhardt et al. [2003] konnten zum ersten Mal eine überlebensfördernde, proliferative und sogar mitogene Wirkung von TRAIL bei TRAIL-resistenten leukämischen Zelllinien nachweisen. Dabei war der Apoptoseweg durch Caspase-8- und/oder TRADD-Dysfunktionen blockiert und

NF κ B für die unerwartete Wirkung verantwortlich, während TRAIL bei den TRAIL-sensiblen Zellen wie erwartet Apoptose induzierte.

In einer von Baader et al. [2005] durchgeführten Studie zeigten Apoptose-resistente Zelllinien verschiedener Tumoren ebenfalls eine TRAIL-mediierte Proliferationsinduktion.

Besonderes Gewicht erlangen diese Überlegungen, wenn man bedenkt, dass während der Progression des Prostatakarzinoms die Wege der Apoptoseinduktion zunehmend umgangen werden [McKenzie, 2006]. Besonders unter hormonablativer Therapie fortgeschrittener Stadien entwickeln sich schließlich androgen-unabhängige Tumoren [Feldman, 2001], die nicht nur resistent gegen die hormonablative Therapie sind, sondern auch nicht mehr auf andere systemische Chemotherapeutika reagieren [Debes, 2004]. Dabei ist die Apoptoseinduktion der vorwiegende Mechanismus über den Chemo- wie Strahlentherapie ihre tumorsuppressive Wirkung entfaltet. Sie wirken überwiegend über den intrinsischen Apoptoseweg. Die Umgehungsmechanismen, mit denen schlussendlich eine Apoptoseresistenz im Prostatakarzinom erreicht wird, umfassen zum einen die Dysregulation von Apoptose-Schlüsselgenen und -Proteinen, wie zum Beispiel der BCL-2-Familie, NF κ B, p53, PTEN/PI3K/AKT, die zum Teil eng miteinander und mit dem AR-Signalweg verbunden sind. Zum anderen werden auch die Aktivierung von IAPs (siehe oben), Veränderungen der Epithel-Stroma-Interaktion (parakrin wie autokrin), von Wachstumsfaktor-Signalwegen (EGF, IGF, TGF- β 1) und der Antwort auf Entzündungsstimuli (vor allem über TNF- α und IL-6) in diesem Zusammenhang als wichtige Faktoren diskutiert [McKenzie, 2006].

Betrachtet man die gefundenen Daten in diesem Kontext, so scheint es durchaus möglich, dass TRAIL für entartetes Gewebe auch überlebensfördernde, antiapoptotische oder proliferative Wirkung entfalten kann, besonders wenn im Rahmen der Tumorprogression der Apoptoseweg zunehmend blockiert wird und die durch TRAIL induzierten Stimuli dann zunehmend auf den antiapoptotischen Signalweg umgeleitet werden. Somit würde eine Herunterregulation der eher TRAIL-inhibitorischen Decoy-Rezeptoren einen Überlebensvorteil für den Tumor bedeuten und somit auch in einer kürzeren rezidivfreien Zeit resultieren. Diese Theorie ist vor allem deswegen interessant, da die Wirkung von TRAIL in vivo auf Prostatakarzinomgewebe und unter normalen physiologischen Bedingungen vollkommen unklar ist (Übersicht in [Kimberley, 2004; Bucur, 2006]).

4.1.3.4 Genetische und Epigenetische Regulation der DcR1- und DcR2-Expression

Die Mechanismen der Herunterregulation der Decoy-Rezeptoren sind im Wesentlichen unbekannt. Wie in der Einleitung schon erwähnt (*Kapitel 1.5*), existieren bestimmte Wege, über die die Expression von Genen verändert werden kann. Im Wesentlichen sind dies genetische Veränderungen der Basensequenz, beispielsweise durch Deletionen (LOH) oder Punktmutation, und zum anderen epigenetische Mechanismen.

In dieser Arbeit konnte schon ein Zusammenhang zwischen Verlusten genetischen Materials und einer erniedrigten Decoy-Rezeptorexpression nachgewiesen werden, denn die Expression beider Rezeptoren war in Tumorproben mit LOH auf Chromosom 8p deutlich niedriger als in denen ohne LOH (DcR1: $p = 0,002$, DcR2: $p = 0,005$). Da der Zusammenhang zwischen Kopienzahlveränderungen und Expressionsveränderungen aber nicht immer eindeutig ist, haben wir eine epigenetische Regulation zusätzlich in Betracht gezogen, zumal Promotorhypermethylierung in einigen Studien als Grund für eine DcR1/DcR2 Herunterregulation gefunden worden war [van Noesel, 2002; Shivapurkar, 2004; Suzuki, 2006].

Für beide Gene fand sich in unseren Untersuchungen eine Hypermethylierung in Prostatagewebe und eine Assoziation mit der erniedrigten Expression. Dabei war die Methylierung jedoch nicht nur auf Tumorgewebe beschränkt, sondern fand sich, besonders bei DcR1, auch in benignem Hyperplasiegewebe. Ferner war das Methylierungsmuster keineswegs dicht. In AZA- und SAHA-behandelten Prostatakarzinom-Zelllinien stieg die Expression der beiden Decoyrezeptoren jedoch leicht an (*Kapitel 3.6.4-5*), was die gefundenen Daten weiter unterstützte und die Vermutung einer zumindest teilweise epigenetisch bedingt supprimierten Genexpression von DcR1 und DcR2 im Prostatakarzinom bestätigte.

Diese Daten stimmen mit denen anderer Gruppen überein. Suzuki et al. [2006] fanden eine Hypermethylierung der beiden Decoyrezeptoren (DcR1 45%, DcR2 37%) in Prostatakarzinomgewebe von 101 Patienten, während sie in Normalgewebe kaum methyliert waren (3% und 16%). DR4 und DR5 waren dabei weder in Normal-, noch in Tumorgewebe nennenswert methyliert. Hohe Methylierungsgrade der beiden Decoyrezeptoren korrelierten dabei mit einer längeren rezidivfreien Zeit. Allerdings korrelierte der Methylierungsgrad der beiden Rezeptoren auch mit einer prognostisch ungünstigeren Gleasonsumme.

Ähnliches beobachteten Shivapurkar sowie van Noesel et al. [2004/2002], nämlich eine deutliche Hypermethylierung der Decoyrezeptoren sowohl in Prostatakarzinomgeweben (DcR1 50%,

DcR2 46%) als auch in verschiedenen Tumor-Zelllinien und im letzten Fall einen deutlichen Zusammenhang mit einer erniedrigten Genexpression (69-90% Hypermethylierung in nichtexprimierenden Zellen).

Trotz der Übereinstimmung müssen die Methylierungsdaten der hiesigen Arbeit vorsichtig interpretiert werden. Denn trotz eines groben Zusammenhangs zwischen Hypermethylierung und Herunterregulation der Decoy-Rezeptoren fand sich kein einheitlich verändertes Methylierungsmuster und der Einfluss einer nur teilweise methylierten Promotorsequenz auf die Genexpression lässt sich schwer abschätzen. Ferner lagen die Primer, die wir aus der Arbeit von van Noesel et al. [2002] übernommen haben, nicht in dem für die (epigenetische) Expressionsregulation entscheidenden Promotorbereich, sondern im ersten Exon der beiden Gene und am intronischen Rand der CpG-Insel im Fall von DcR2. Trotzdem sprechen van Noesel et al. von Promotorhypermethylierung als Grund der Herunterregulation. Außerdem sind erfahrungsgemäß (für ein eindrucksvolles Beispiel siehe [Neuhausen, 2006]) solche Ergebnisse typisch für die Untersuchung inkomplett methylierter Genomabschnitte mittels MS-PCR. Diese Methode ist für ein so uneinheitliches Methylierungsmuster mit klaren Limitierungen behaftet und liefert relativ schwache Signale für die Primer spezifisch für die methylierte Sequenz.

Des Weiteren ist die Hypermethylierung von Genen in der alternden Prostata nicht ungewöhnlich, prominente Beispiele sind RASSF1A [Florl, 2004] und DLC1 [Guan, 2006]. Häufig sind solche Gene in BPH-Gewebe lückenhaft methyliert und zeigen dann in Karzinomzellen ein dichteres Methylierungsmuster. Es könnte sich also auch um eine physiologische Alterserscheinung handeln, welche sich unspezifisch auf die Expression der Gene auswirkt und für die Tumorprogression nicht essentiell ist.

Trotzdem kann partielle Methylierung für eine Herunterregulation von Genen verantwortlich sein, besonders wenn kritische Bindungstellen von Transkriptionsfaktoren blockiert werden. Beispielhaft ist der Promotor des TNFRSF6-Gens, das für FAS kodiert, äußerst sensibel für eine Teilmethylierung, wenn diese potentielle NF κ B-Bindungsstellen betrifft [Santourlidis, 2001]. Dies könnte auch für die TRAIL-Rezeptoren, beziehungsweise in diesem Falle für DcR2 zutreffen, welches am klarsten einen Zusammenhang zwischen Promotorhypermethylierung und erniedrigter Genexpression erkennen ließ.

4.1.3.5 In-vitro Wirkung von TRAIL

Um die oben diskutierte Relevanz von epigenetischen Regulationsmechanismen auf die TRAIL-Wirkung zu untersuchen, wurden die TRAIL-Wirkung auf die Prostatakarzinomzelllinien PC3 und LNCaP nach Vorbehandlung mit Inhibitoren der DNA-Methylierung (5-AZA) und der Histondeacetylierung (SAHA) untersucht. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass PC3 TRAIL-sensibel und LNCaP TRAIL-resistent ist [Bucur, 2006]. Ferner konnte die Expression der beiden Decoyrezeptoren durch Behandlung mit 5-AZA in verschiedenen Tumorzelllinien wiederhergestellt werden [van Noesel, 2002; Shivapurkar, 2004] und die Behandlung mit SAHA hatte einen TRAIL-sensitivierenden Effekt auf PC3 und wirkte sogar synergistisch auf die Apoptoseinduktion durch TRAIL [Sonnemann, 2005]. Teilweise konnte die Wirkung von TRAIL durch andere Chemotherapeutika verstärkt und bei zunächst resistenten Zellen durch die Kombinationstherapie wiederhergestellt werden [Bucur, 2006]. Diese Interaktion beruht vermutlich auf der gleichzeitigen Aktivierung des extrinsischen (durch TRAIL) und intrinsischen Apoptoseweges, wobei der intrinsische als Antwort auf zytotoxische Stresssignale über p53 aktiviert wird [Nguyen, 2007].

Im Prinzip konnten diese Daten hier bestätigt werden, wobei jedoch keine synergistischen Effekte zwischen TRAIL und der Applikation von AZA, SAHA oder AZA+SAHA auf Zellüberleben oder Apoptoseinduktion festgestellt werden konnten. Im Falle von PC3 fanden sich eher unspezifische, additive Effekte. Bei LNCaP kam es, wie erwartet, aufgrund der TRAIL-Resistenz zu keiner nennenswerten TRAIL-Wirkung und sogar zu einer Apoptoseinhibition. Dieser könnte eine Blockierung des Apoptoseweges und des Überwiegens der antiapoptotischen TRAIL-Wirkung zugrunde liegen.

Ob der eher unspezifischen Effekte muss zudem die Frage nach der Effektivität des verwendeten His-TRAILs gestellt werden. Laut Bucur et al. [2006] soll zumindest ein Teil der in verschiedenen Studien gefundenen widersprüchlichen Effekte von TRAIL auf Tumorzelllinien auf der Verwendung unterschiedlicher rekombinanter TRAIL-Varianten beruhen.

Darüber hinaus lassen sich aus den Daten weitere Schlussfolgerungen ziehen:

- Der Methylierungsstatus der Decoyrezeptoren scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die TRAIL-Wirkung zu haben. Denn bei Reaktivierung ihrer Expression nach 5-AZA- oder SAHA-Behandlung müssten sie ihre antiapoptotische Wirkung entfalten und die TRAIL-Wirkung deutlicher hemmen.

- Es ist vorstellbar, dass AZA und SAHA eher unspezifische Effekte auf andere Gene haben, oder aber, dass sich im komplexen Dickicht der TRAIL-Rezeptoren aus pro- und antiapoptotisch wirksamen Komponenten die epigenetische Regulationsmechanismen so ausgleichen, dass sich an der gemeinsamen Endstrecke, nämlich der Apoptoseaktivierung, kaum messbar etwas ändert.
- Die gleichzeitige Gabe von TRAIL und anderen zytotoxisch wirkenden Substanzen scheint ein wirkungsvoller Ansatzpunkt, um die TRAIL-Resistenz, zumindest in vitro zu überwinden, jedoch besteht hierbei eine Spezifität für bestimmte Zelllinien, die vermutlich auch bei Patienten zu erwarten ist.

4.1.3.6 Resümee

DcR1 und DcR2 konnte keine onkogene Rolle nachgewiesen werden. Vielmehr war ihre Expression, bedingt durch Allelverlust und Promotorhypermethylierung, supprimiert. Dabei bleibt fraglich, welche Relevanz die Herunterregulation der Decoyrezeptoren für die Wirkung von TRAIL auf Prostatakarzinomzellen hat: zum einen, weil die genaue Funktion der TRAIL-Rezeptoren noch nicht ausreichend erforscht ist, zum anderen, weil Studien unter physiologischen Bedingungen weitgehend fehlen.

Die Ergebnisse werfen die etwas beunruhigende Möglichkeit auf, als könne TRAIL unter bestimmten Bedingungen (vor allem Apoptoseresistenz) durchaus antiapoptotische und sogar proliferative Wirkung entfalten, wozu eine Supprimierung der DcR1/DcR2-Expression beitragen würde. Im Rahmen der klinischen Erprobung von TRAIL als Chemotherapeutikum beim Prostatakarzinom und anderen malignen Tumorerkrankungen sollte deswegen vorsichtig vorgegangen werden. Unter Umständen könnte die Applikation von TRAIL sogar tumorfördernde Effekte haben. Sollte es in Zukunft dennoch zu einer neuen Therapieform kommen, so muss besonderes Augenmerk auf die molekularen Determinanten der TRAIL-Sensitivität gerichtet werden. Die Herunterregulation der beiden Decoyrezeptoren DcR1 und DcR2 wäre dabei ein möglicher Indikator einer TRAIL-Resistenz.

4.1.4 NKX3.1

Sieht man die Beständigkeit, mit der 8p-Verluste in verschiedensten Studien beobachtet werden, neigt man dazu, Expressionsverluste von Tumorsuppressor-Genen, welche von diesen Verlusten betroffen sind, als genauso beständig und „reproduzierbar“ zu betrachten. Dies ist aber nicht der Fall. Zum Beispiel war NKX3.1, ein exzellenter Kandidat für ein Tumorsuppressor-Gen auf 8p, in der hiesigen Versuchsreihe weder im Durchschnitt der Tumorproben, noch in jenen mit Nachweis einer allelischen Imbalance (LOH) auf 8p herunterreguliert. Tatsächlich ist dieses Ergebnis kein Einzelfall. Eine Suche in der Oncomine-Datenbank [Rhodes, 2004] zeigte, dass nur eine einzige Microarray-Studie, die normales Prostatagewebe mit Karzinomgewebe verglich, eine eindeutige und hochsignifikante Herunterregulation des Gens erbrachte [Tomlins, 2006]. Wesentlich häufiger fand sich, wie in dieser Arbeit, ein leichter und geringsignifikanter Expressionsanstieg [Lapointe, 2004; Dhanasekaran, 2005; Varambally, 2005] oder keine differentielle Expression [Welsh, 2001; Yu, 2004]. Dagegen waren sich alle Studien darüber einig, dass NKX3.1 in metastatischen Fällen, sowie Metastasen, herunterreguliert war [Porkka, 2004]. Da in der hier untersuchten Fallgruppe nur zwei pT4-Tumoren und keine Fälle mit nachgewiesenen Fernmetastasen eingeschlossen waren, kann das Expressionverhalten von NKX3.1 zumindest teilweise so erklärt werden.

Der fehlende Zusammenhang zwischen chromosomalen Verlusten und einer erniedrigten Genexpression sollte aber nicht als allzu überraschend betrachtet werden, da die Expression von NKX3.1 nicht nur von der Gendosis abhängt, sondern auch von Androgenen [Shen, 2003] und Retinoiden [Thomas, 2006] reguliert wird. Eine kürzlich veröffentlichte Studie enthüllte, dass NKX3.1-Verluste auch während der Progression im Maus-TRAMP-Modell (transgenic adenocarcinoma of mouse prostate) auftreten, in dem die Entstehung von Prostatakarzinomen durch SV 40 large-T Antigen induziert wird [Bethel, 2007].

Zusammengenommen scheinen diese Daten darauf hinzudeuten, dass der Verlust der NKX3.1-Expression hauptsächlich mit Entdifferenzierungsprozessen im Prostatakarzinom in Verbindung steht und nicht frühe Entwicklungsstufen vorantreibt. Da auch ein androgenunabhängiger Status in vielen fortgeschrittenen Stadien erreicht wird und NKX3.1 androgenreguliert ist, stellt sich die Frage, ob der Expressionsverlust von NKX3.1 Folge oder Begleiterscheinung dieses Prozesses ist. Auch hier ist unklar, ob die Wirkung von Androgenen direkt über den NKX3.1-Promotor zu einer gesteigerten Transkription führt, oder ob sich die Effekte des Androgensignalweges

indirekt auswirken [Shen, 2003]. Weiter scheint NKX3.1 in gewisser Weise mit anderen Tumorsuppressor-Genen zu „kooperieren“. Der Verlust von NKX3.1 im Mausmodell reicht nicht aus, um ein Prostatakarzinom zu induzieren, führt aber zu Proliferationssteigerung des Prostatagewebes und prädisponiert zur Entwicklung eines malignen Tumortyps. Liegt aber gleichzeitig eine Heterozygotie für PTEN ($NKX3.1^{-/-} + PTEN^{+/-}$) vor, so entwickeln sich spontan Dysplasien und Karzinome verschiedener Gewebe, unter anderem der Prostata [Kim, 2002b; Shen, 2003]. In der Zellkultur und Xenograften konnte NKX3.1 eine moderate Hemmung der Wachstumsrate nachgewiesen werden [Kim, 2002a].

Nichtsdestoweniger besteht kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Chromosom 8p-Verlusten und Expressionsveränderungen dieses Gens. Dieser wurde auch schon ausführlich als Grundlage der problematischen Rolle von NKX3.1 als Tumorsuppressor-Gen und der Definition des Begriffs Haploinsuffizienz in der Einleitung dargestellt. Dabei findet sich bei haploinsuffizienten Genen bei Reduktion der Gendosis um die Hälfte (Allelverlust) eine phänotypisch wirksame Funktionseinschränkung des Gens (*Kapitel 1.5.2*). Obwohl der Verlust eines NKX3.1-Allels teilweise zu einer signifikant reduzierten Genexpression führt, ist völlig unbekannt, wie das verbleibende Allel in seiner Funktion beeinträchtigt wird. Mutationen (Gegenbeispiel p53) können als Ursache weitgehend ausgeschlossen werden und epigenetische Ursachen (Gegenbeispiel GSTP1) liefern zwar viel Spekulationsraum, haben aber bis dato auch kein schlüssiges Konzept zu Tage gebracht. Vielmehr könnten chromosomale Verluste in einigen Fällen für die Herunterregulation des Gens verantwortlich sein, während regulatorische Mechanismen, die additiv wie antagonistisch zu den Dosisveränderungen wirken können, für die Hochregulation von NKX3.1 in einigen Prostatakarzinomen und seine Herunterregulation in anderen verantwortlich sind.

Da die Expressionsstudien allerdings wenig einheitliche Daten liefern, könnte es also auch sein, dass sich die relevanten Veränderungen, die letztlich eine Funktionseinschränkung von NKX3.1 zur Folge haben, auf einer gänzlich anderen Ebene abspielen. Beispielsweise scheint NKX3.1 besonders auf Proteinebene herunterreguliert zu sein [Asatiani, 2005], wofür eine posttranskriptionelle Modifikation durch microRNAs (siRNAs) verantwortlich sein könnte [Kawasaki, 2005; Eltze, 2007].

Neben den Fragen rund um die Expressionsveränderungen von NKX3.1, ist seine Funktion, vor allem die im Prostatakarzinom, nicht vollständig geklärt. NKX3.1 hat in der embryonalen

Prostata anscheinend eine essentielle Rolle für die normale Prostataentwicklung und Differenzierung [Shen, 2003]. Welche Funktion genau NKX3.1 im Zusammenspiel mehrerer, mehr oder minder prostataspezifischer Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel HOXB13, FOXA1, AR) ausübt, ist jedoch nicht bekannt.

Ähnlich vage sind die Erkenntnisse zu der Rolle von NKX3.1 im Prostatakarzinom. Die guten Gründe, warum NKX3.1 als Tumorsuppressor angesehen wird, wurden weiter oben schon ausgeführt. Trotzdem ist sein Funktionsverlust nicht mit dem von klassischen Tumorsuppressoren, wie p53, PTEN oder RB1 zu vergleichen. Vielmehr scheint NKX3.1 tumormodulierenden Einfluss als Regulator der Gewebedifferenzierung auszuüben, was sich besonders bei der Kooperation mit PTEN-Verlusten zeigt.

Eine Erklärung für die erhöhte Expression von NKX3.1 in Tumorproben in dieser Arbeit wie in anderen, könnte auch an einem höheren Anteil von luminal differenzierten Zellen in Prostatakarzinomen liegen. Die Zunahme des luminalen zu Ungunsten des basalen Differenzierungstyps mit einem luminal-ähnlichem Differenzierungsmuster ist typisch für das Prostatakarzinom und äußert sich unter anderem in der erhöhten Expression luminal-epithelialer Marker, wie CK18, AR, PSA, HOXB13 und einer erniedrigten Expression basaler Marker wie p63, CK5 und CK14, die sogar diagnostische Verwendung findet ([Bonkhoff, 1996; Huang, 2007; Lawson, 2007; Letellier, 2007], siehe *Abbildung 4.1.4-1*). Da NKX3.1 ebenfalls ein prostataspezifischer Differenzierungsfaktor zu sein scheint, könnte dieser karzinomspezifische Differenzierungstyp zu einer relativen Überexpression von NKX3.1 führen. Das gemessene Expressionsmuster würde somit nur den epithelialen Aufbau des Prostatakarzinoms widerspiegeln und keine Hinweise auf die funktionelle Bedeutung von NKX3.1 in der Prostatakarzinogenese liefern.

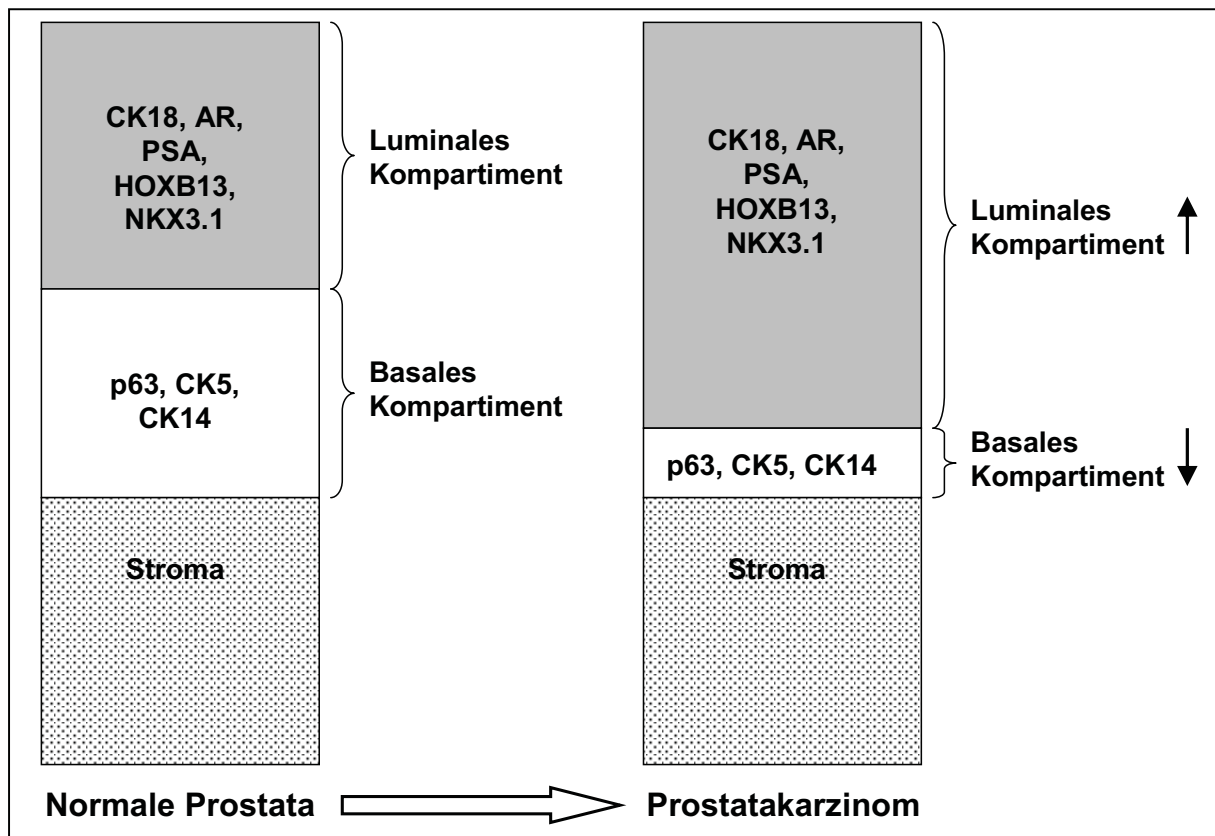


Abbildung 4.1.4-1: Änderung des Differenzierungstyps des Prostataepithels (rot, orange) während der Karzinogenese mit Auführung der kompartimentspezifischen Expressionsmarker.

NKX3.1 kann also in dieser Arbeit nicht als Tumorsuppressor bestätigt werden. Damit fügen sich unsere Daten in eine lange Reihe von uneinheitlichen Studien ob der Funktion, Regulation und Relevanz dieses Gens im Prostatakarzinom.

Die differenzierte Betrachtung lässt auch erkennen, dass die Heterogenität der Daten häufig die Heterogenität von Prostatatumoren widerspiegelt. Vergleiche von Expressionsprofilen von Tumoren unterschiedlicher Tumorstadien, die „Verunreinigung“ von Tumorproben mit nicht-malignen Zellen und das Verhältnis von luminalen zu basalen Gewebeanteilen sind nur einige Variablen, die methodische Schwierigkeiten bereiten.

4.1.5 DLC1

In einigen Microarraystudien fand sich eine Herunterregulation von DLC1 in Prostatakarzinomgewebe verglichen mit benignem Prostatagewebe [Vanaja, 2003; Varambally, 2005], während die Expression des Gens in anderen, wie in dieser Studie, erhöht war [Dhanasekaran, 2001; Luo, 2001].

Trotzdem gilt DLC1 als vielversprechender Kandidat eines Tumorsuppressor-Gens bei verschiedenen malignen Erkrankungen [Durkin, 2007]. Dies beruht hauptsächlich auf drei Erkenntnissen. Zunächst findet sich eine erniedrigte Expression auf mRNA-Ebene bei vielen menschlichen Tumoren, wie nicht nur dem Hepatozellulären Karzinom, sondern auch Tumoren der Brust, Lunge, Prostata, des Ovars, Kolons, Uterus, Magens, Pankreas und nasopharyngealen Tumoren. Dagegen finden sich aber auch reduzierte Expressionswerte unter nicht-malignen Bedingungen wie der BPH und der Uterusfibrose. Ferner liegt DLC1 in einer Region, welche in vielen soliden Tumoren und hämatologischen Malignomen häufig von genetischen Verlusten betroffen ist: 8p22. Des Weiteren konnte eine epigenetische Expressionshemmung durch Promotorhypermethylierung in einer Vielzahl von Studien bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden. Jedoch schwankt der Anteil an deutlich hypermethylierten Proben von 10% der untersuchten Fälle in einigen Mammakarzinomen bis 91% in Nasopharynxkarzinomzelllinien. In Überexpressionsstudien konnte DLC1 ein antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden (Übersicht in [Durkin, 2007]).

Über die genaue Funktion von DLC1 ist noch wenig bekannt. Grundlage ist die hohe Ähnlichkeit der DLC1 cDNA zu der p122RhoGAP-Sequenz der Ratte [Homma, 1995]. GTPasen der Rho-Familie regulieren eine große Anzahl von zellulären Prozessen, vor allem Zellzyklusprogression, Zellmorphologie, Zellmigration und Zelladhäsion mit der extrazellulären Matrix, sowie Genexpression und Zytoskelettorganisation [Hall, 1998].

Guan et al. [2006] berichteten, dass die Herunterregulation von DCL1 in Prostatakarzinomen verglichen mit Prostatanormalgewebe durch Promotorhypermethylierung bedingt sei. Diese Interpretation der Ergebnisse erscheint jedoch etwas zu sehr vereinfacht. Tatsächlich zeigt sich verglichen zu jungen Männern < 30 Jahren das Gen sowohl in benignen wie auch in karzinomatösen Prostataprobe von älteren Männern deutlich herunterreguliert. Der Anteil an Proben mit einer Herunterregulation auf RNA-Ebene zwischen den verschiedenen Gewebegruppen (Ca: Prostatakarzinomgewebe, BPH: Gewebe aus Benigen

Prostatahyperplasien, Normalgewebe) in der Arbeit von Guan et al. war wie folgt: Ca 37%, BPH: 24%, Normal: 23%. Auf Proteinebene zeigte sich folgende Zusammensetzung: Ca 30%, BPH: 52%, Normal: 23%. Hypermethylierung von DLC1 fand sich in einem ganz ähnlicher Verhältnis: Ca: 48%, BPH: 71%, Normal: 15%. Somit waren Expressionsniveau und Methylierungsstatus in Karzinom- und BPH-Gewebe zumindest ähnlich. Auf Proteinebene lag die Expression in BPH-Geweben tatsächlich unter der in Tumorgeweben. Vergleicht man Karzinom- und Normalgewebegruppe miteinander, ergeben sich erheblich signifikantere Unterschiede der Genexpression als beim Vergleich von Karzinom- und BPH-Gewebe. Hinzuzufügen ist noch, dass die differenzierte Betrachtung der Daten darauf hindeutet, dass die Herunterregulation und Hypermethylierung von DLC1 im Rahmen von physiologischen Alterungsprozessen der Prostata auftreten könnte, da die Veränderungen auch in BPH-Gewebe zu finden sind und das Methylierungsmuster allgemein eher schwach und lückenhaft war. Sie wären damit nicht karzinomspezifisch. Im Übrigen ist bekannt, dass drei Transkripte des Gens existieren, die von drei unterschiedlichen Promotoren ausgehen, von denen nur der mittlere in einer CpG-Insel liegt (siehe www.ensembl.org/vega.sanger.ac.uk). Daraus folgt, dass das von uns gefundenen Expressionsverhalten von DLC1 auf mehr oder minder unspezifischen Expressionsunterschieden zwischen der BPH- und der Prostatakarzinomgewebegruppe beruhen könnte.

Die Rolle von DLC1 als Tumorsuppressor beim Übergang zum Prostatakarzinom kann hier also nicht bestätigt werden. Vielmehr könnte die Bedeutung von DLC1 für Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms höchstens in der Etablierung eines präneoplastischen Zustandes im Gewebe insgesamt liegen.

Eine genauere Untersuchung der Funktion von DLC1, der Signalwege über die DLC1 wirkt und deren Regulation bleibt daher und aufgrund der Bedeutung für andere Tumorerkrankungen dringend notwendig.

4.1.6 CSMD1

Das CSMD1-Gen auf Chromosom 8p23.2 wird auf der Basis von Analysen häufiger Deletionen in verschiedenen Tumorarten, unter anderem auch im Prostatakarzinom, als Tumorsuppressor-Gen gehandelt [Sun, 2001; Henshall, 2003], wobei nur eine Arbeit [Sun, 2001] speziell die Expression des Gens im Prostatakarzinom untersucht hat. Die Region, welche das sehr große Gen enthält, wurde unabhängig davon mit einem hohen Risiko für das Auftreten von Metastasen und Rezidiven im Prostatakarzinom in Verbindung gebracht [Paris, 2004]. Des Weiteren scheint der distale Arm von Chromosom 8p überdurchschnittlich häufig von Mutationen betroffen zu sein [Nusbaum, 2006]. Trotzdem konnte in dieser Arbeit keine auffällige Abweichung der Genexpression nachgewiesen werden, auch nicht in Fällen mit allelischer Imbalance von distalen 8p-Bereichen.

Ob die erniedrigte Expression des Gens in Proben der Gleasonsumme 7, in Anbetracht der unbekannten Funktion von CSMD1 und der indifferenten Expression in Tumor- und Normalgewebe, relevant für die Entwicklung des Prostatakarzinoms ist, bleibt fraglich und bedarf weiterer Klärung.

4.2 Von chromosomalen Aberrationen über Gendosis- und Expressionveränderungen zur Transformation eines malignen Phänotyps: Chromosom 8p im Prostatakarzinom

4.2.1 Chromosomale Aberrationen im Prostatakarzinom

Allelische Imbalancen von 8p, typischerweise Verluste, finden sich häufig im Prostatakarzinom. In der aktuellen Untersuchung zeigten 45% der Proben einer Serie von primären M0 Prostatakarzinomen Veränderungen an mindestens einem Locus. Desgleichen war das Vorhandensein von allelischen Imbalancen auf Chromosom 8p mit höheren Gleason-Summen und einer Tendenz zum Vorliegen von Lymphknotenmetastasen assoziiert. Die am häufigsten von allelischen Imbalancen betroffenen Regionen waren 8p22 und 8p21.3 (bei jeweils 27% beziehungsweise 24% der Fälle). Diese Ergebnisse sind typisch und stehen in Einklang mit vielen anderen Studien (siehe *Tabelle 1.5.1.1-1*, [Sun, 2007]). Als Teil des experimentellen Ansatzes mittels Duplex-PCR waren wir auch in der Lage die Frequenz von allelischen Imbalancen auf Chromosom 13q zu analysieren, welche in dieser Serie zufälligerweise identisch war (45%). Die am häufigsten von allelischen Imbalancen betroffenen Regionen waren 13q14.13 und 13q31.1 (je in 18% der Fälle). Auch diese Resultate passen gut zu denen aus anderen Studien [Latil, 1998; Dong, 2001b; Karan, 2003; Torring, 2007].

Die klinische Relevanz und die Beziehung zu prognostischen Parametern dieser Daten wurde schon mehrfach erwähnt (siehe *Tabelle 1.5.1.1-1*). In diesem Abschnitt soll nun betrachtet werden, wie in diesen Bereichen Gene von den chromosomalen Verlusten beeinflusst werden. Dabei ist die im Rahmen von chromosomalen Aberrationen, im Sinne von genetischen Verlusten beziehungsweise Zugewinnen, beeinflusste Gendosis entscheidend.

4.2.2 Gendosisveränderungen im Prostatakarzinom

Die Zahl an Studien, die Gendosisveränderungen im Prostatakarzinom untersucht haben, ist riesig, gleiches gilt für Expressionsstudien.

In einer kürzlich veröffentlichten Metaanalyse von 41 CGH-Studien an 872 Prostatakarzinomen [Sun, 2007] konnten 13 Konsensusregionen (> 10% aller 872 Tumoren) gefunden werden: 8 häufig deletierte und 5 häufig hinzugewonnene Regionen. 8p21.3 (34%, 22,7 Mb groß) war dabei

zum einen die häufigste von Verlusten betroffene Region, gefolgt von 13q21.33 (28%, 29,5 Mb groß). 8q22.2 (25%, 52,9 Mb groß) war die am häufigsten von Zugewinnen betroffene Region.

Dabei hat die Methode der konventionellen CGH, die bei den meisten eingeschlossenen Studien angewandt wurde, klare Limitierungen. Das Auflösungsvermögen liegt bei ca. 10 Megabasen. Gendosisveränderungen kleinerer Größe werden häufig nicht detektiert und dadurch ist die Eingrenzung auf kleinere Konsensusregionen erschwert. Die gefundenen Regionen sind sehr groß (22,7-52,9 Mb) und enthalten eine kaum überschaubare Anzahl an möglichen in Frage kommenden Tumorgenen, von denen vielen wahrscheinlich keine besondere Rolle bei der Tumorgenese zukommt. Dies dürfte einen der Hauptgründe für die bisher eher frustrane Suche nach Tumorsuppressor-Genen auf Chromosom 8p darstellen.

Um trotzdem eine genauere Kartierung von Veränderungen auf Chromosom 8p zu erlangen wurden in einer kürzlich veröffentlichten Studie Konsensusregionen deletierter Chromosomenabschnitte von hereditären und sporadischen Prostatakarzinomen untersucht [Chang, 2007]. Dabei traten zwei kleine gemeinsam deletierte Regionen hervor: 8p23.1 (ca. 1,4 Mb groß) und 8p21.3 (ca. 3,1 Mb groß). Die Suche nach Konsensusregionen ist dabei nichts Neues und wurde schon vielfach angewandt um bei Chromosomen, die wiederkehrendes Ziel von Aberrationen sind, Regionen zu identifizieren, welche überdurchschnittlich häufig von genetischen Verlusten oder Zugewinnen betroffen sind. Dadurch kann die Suche nach Tumorgenen auf einen kleineren und besonders vielversprechenderen Bereich fokussiert werden. Die Arbeit von Chang [2007] allerdings ist die erste, welche solche gemeinsamen Regionen zwischen hereditären und sporadischen Fällen von Prostatakarzinomen für 8p untersucht. Die gefundenen Konsensusregionen erlangen somit besondere Relevanz, da ihnen eine wichtige Rolle in beiden Tumorformen zugeschrieben werden kann. Während in der ersten, kleineren distalen Region, relativ wenige Gene liegen, enthält die größere sowohl die Proteinphosphatase PPP3CC und die TRAIL-Rezeptoren 1-4, als auch NKX3.1.

Lässt man NKX3.1 zunächst außer Acht, so handelt es sich bei PPP3CC und DcR1 und DcR2 um die in dieser Arbeit am signifikantesten herunterregulierten Gene, welche sich gleichzeitig als die vielversprechendsten Kandidatengene herausstellten [Hornstein, 2008]. Drei von vier, der in dieser Arbeit auf Chromosom 8p gefundenen herunterregulierten Gene liegen in der Konsensusregion 8p21.3.

Ferner, und vielleicht noch interessanter, liegen von den hier untersuchten 12 Genen auf Chromosom 8p sechs in dieser Konsensusregion. Von diesen sechs zeigen vier einen deutlichen und signifikanten Bezug zum Auftreten von allelischer Imbalance. Bei DR4, DcR1, DcR2 und PPP3CC lag die Expression in der Tumorgruppe mit allelischer Imbalance auf 8p deutlich unter der ohne allelische Imbalance. DR4 verfehlte diesen Trend knapp ($p = 0,061$). Allerdings wird dieser Zusammenhang dadurch relativiert, dass allein PPP3CC, DcR1 und DcR2 eine Herunterregulation in Bezug auf die Normalgewebe zeigten, allerdings auch mit weiter supprimierten Expressionswerten in Proben mit allelischer Imbalance (LOH) auf Chromosom 8p. Die vier TRAIL-Rezeptoren und PPP3CC zeigten weiter in der Clusteranalyse ein ähnliches Expressionprofil, was darauf beruhen könnte, dass sie in der Konsensusregion häufig von den gleichen genetischen Aberrationen betroffen sind und reguliert werden. Somit wäre die besondere Relevanz dieser Region für die Tumorgenese des Prostatakarzinoms durch die von uns gefundenen Daten weiter bestärkt, umgekehrt die Bedeutung der hier identifizierten Kandidatengene.

NKX3.1 ist sicherlich ein Sonderfall und wurde in aller Ausführlichkeit in *Kapitel 4.1.4* diskutiert. Trotzdem ist es erstaunlich, dass NKX3.1 als einziges Gen dieser Region hochreguliert scheint. Von den von Chang et al. [2007] untersuchten 29 Prostatatumoren mit Deletionen auf 8p zeigten allerdings nur zwei homozygote Deletionen von denen keine im Bereich von NKX3.1 lag. Somit wäre jeweils zumindest noch ein Allel des Gens vorhanden um über andere Regulationsmechanismen den Expressionanstieg auf mRNA-Ebene zu ermöglichen.

4.2.3 Genotypveränderungen im Prostatakarzinom

Es existieren über 80 cDNA Microarray-Studien alleine in der Oncomine-Datenbank, welche sich mit Expressionsprofilen des Prostatakarzinoms beschäftigen. Leider zeigen die in diesen Studien gefundenen, statistisch mit dem Krankheitsverlauf assoziierten, Gengruppen selten eine Korrelation miteinander [Nelson, 2004; Kopper, 2005].

Trotz der teilweise schwierigen Reproduzierbarkeit gehen diese Hochdurchsatz-Analysen einen neuen und erfolgversprechenderen Weg. Ob der langjährigen Schwierigkeiten einzelne für die Pathogenese des Prostatakarzinoms verantwortliche Gene zu identifizieren, werden hier Gengruppen aus tausenden analysierten Genen zusammengefasst, die in ihrem gemeinsamen Expressionsprofil mit klinischen Parametern korrelieren. Da es sich beim Prostatakarzinom um

eine Erkrankung mit sowohl heterogenem Verlauf als auch histologischem Bild handelt und sich auch sonst wenige einheitliche Zusammenhänge finden (Ausnahme zum Beispiel Chromosom 8p-Verluste), könnte sich diese Heterogenität auf molekularer Ebene fortsetzen. Die Wahrscheinlichkeit über die Analyse von differentiell exprimierten Gengruppen und eventuell ihrem Verhältnis zueinander pathogenetisch relevante Muster zu entdecken ist dabei wesentlich höher, als bei der Analyse einzelner Gene. Beispielhaft soll hier eine Arbeit aufgeführt werden.

Lapointe et al. [2004] konnten anhand unterschiedlicher Expressionsprofile drei Subtypen von Prostatakarzinomen identifizieren, wobei Typ I frühe Tumorstadien repräsentiert und die Typen II und III eher fortgeschrittene, rezidiv-assoziierte Tumoren. Typ III schloss die meisten Lymphknotenmetastasen ein. Im Anschluss wurden als stellvertretende Marker zwei über die Gruppen differentiell exprimierte Gene analysiert. Dabei zeigten die Gene MUC1 und AZGP1 eine deutliche Korrelation mit prognostischen Markern wie Rezidivverhalten, Tumorstadium, Differenzierungsgrad und präoperativem PSA-Spiegel. Diese Marker könnten so der Klassifikation von Prostatatumoren dienen [Lapointe, 2004]. Auch Singh et al. und Ramaswamy et al. konnten fünf respektive 17 solcher Marker-Gene identifizieren [Singh, 2002; Ramaswamy, 2003]. Allein, kein einziges dieser Gene taucht in mehr als einer der Gen-Gruppen verschiedener Studien auf.

Die Gründe für die Unterschiede in Mikroarray-Analysen sind vielfältig. Zunächst wurden verschiedene Patientenproben, Microarrays mit unterschiedlicher Genrepräsentation, und andere experimentelle und analytische Ansätze benutzt. Weiter sind meist relativ wenige Proben eingeschlossen, beziehungsweise die Spanne reicht von einer bis 72 Tumorproben, und nicht immer wurde mikrodisektiertes Gewebe verwendet. Aufgrund dessen und der schieren Heterogenität neoplastischen Prostatagewebes, ist es wahrscheinlich, dass die Gewebeproben unterschiedliche Mengen von Stroma-, Entzündungs-, Blutzellen und anderen Beimengungen enthalten. Während die Expressionsveränderungen bestimmter Gene in unterschiedlichen Proben ähnlich sein könnten, macht der variable Anteil dieser Zelltypen verschiedene Studien schwer vergleichbar [Nelson, 2004]. Weiter existieren auch patientenspezifische Variablen, wie zum Beispiel Immunantwort, Ernährungseinflüsse und Hormonmilieu, die ebenfalls Einfluss auf die Fähigkeit und Effizienz des Tumors in Bezug auf Zellproliferation, Invasion und Metastasierungsverhalten nehmen können [Nelson, 2004].

Daher muss der prädiktive Wert dieser Studien, trotz statistischer Gültigkeit, in zusätzlichen unabhängigen Datensets und in prospektiven Studien validiert werden.

4.2.4 Beziehung zwischen Gendosis und Genexpression

Die Beziehung zwischen Kopienzahlveränderungen und den Expressionsveränderungen ist in dieser Arbeit eine zentrale Fragestellung, denn über sie könnten pathogenetische Zusammenhänge geklärt werden, die für Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms entscheidend sind.

Was bei der Diskussion der Kandidatengene schon deutlich wurde, ist, dass ebendieser Zusammenhang nicht immer so eindeutig ist, wie man vielleicht erwarten würde.

Die Theorie, dass es sich bei Genen, die in häufig von Verlusten betroffenen Regionen (wie Chromosom 8p) liegen, typischerweise um Tumorsuppressor-Gene handelt, ist sicherlich zu undifferenziert. Trotzdem wurde diese Beziehung bis dato nur in wenigen Studien untersucht.

Tabelle 4.2.4-1 gibt hier einen Überblick.

Auf den ersten Blick scheint der Zusammenhang zwischen Veränderungen der Genexpression und Kopienzahlveränderungen offensichtlich. In der überwiegenden Anzahl der Arbeiten findet sich dieser Zusammenhang.

Betrachtet man die Ergebnisse aber im Detail, so muss dieser Blickwinkel relativiert werden. Es scheint häufig eine Frage der Interpretation statistischer Größen zu sein, die über die Klarheit des Zusammenhangs entscheidet.

Tabelle 4.2.4-1: Übersicht über Studien, die die Beziehung von Kopienzahlveränderungen und Expressionsveränderungen in verschiedenen Geweben untersucht haben. Fokus auf das Prostatakarzinom. Als signifikant in Bezug auf die gefundenen Gendosisveränderungen wurden Expressionsabweichungen um den Faktor 2 oder 3 gewertet. CGH: array-CGH, kCGH: konventionelle CGH, SKY: Spectral Karyotyping. Zu Einzelheiten siehe Text.

Tumorart und Gewebeform	Art der Kopienzahlveränderung	Assoziation mit Expressionsveränderung betroffener Gene	Sonstiges, Methodik	Referenz
Prostata-Ca, Zelllinie	Allg. Kopienzahlveränderungen	41-51% siehe Text (Unter bzw. Überexpression)	Keine absolute Korrelation zwischen Kopienzahl und Genexpression cDNAMicroarray + kCGH,	[Phillips, 2001]
Kolon-Ca, nicht mikrodissektiert	Amplifikation	3,8% (Expressionsanstieg)	Expressionsveränderung > Faktor 2, DNAMicroarray + kCGH	[Platzer, 2002]
Mamma-Ca, mikrodissektiert	Hochgradige Amplifikation	62% (Expressionsanstieg)	Im Durchschnitt hatte eine Gendosisveränderung um den Faktor 2 eine 1,4-1,5 fache Veränderung der Expression zur Folge cDNAMicroarray + aCGH	[Pollack, 2002]
Mamma-Ca, Zelllinien	Hochgradige Amplifikation	44% (Expressionsanstieg)	cDNAMicroarray + aCGH	[Hyman, 2002]
Pankreas-Ca, Zelllinien+Gewebe, nicht mikrodissektiert	Amplifikation bzw. Deletion	5-13% (Über- bzw. Unterexpression)	Expressionsveränderung > Faktor 2 cDNAMicroarray + aCGH	[Aguirre, 2004]
Prostata-Ca, Zelllinien, Xenografte	Verlust und Zugewinn genet. Materials	63% (Über- bzw. Unterexpression)	cDNAMicroarray + aCGH	[Wolf, 2004]
Prostata-Ca, Zelllinien	Allg. Kopienzahlveränderungen	11% (Über- bzw. Unterexpression)	Genexpression $\geq$ Faktor 3 DNAMicroarray + aCGH	[Zhao, 2005]
Pankreas-Ca, Zelllinien	Hochgradige Amplifikation	60% (Überexpression)	cDNAMicroarray + aCGH	[Heidenblad, 2005]
Kolon-Ca, mikrodissektiert	Verlust und Zugewinn genet. Materials	60% (Über- bzw. Unterexpression)	cDNAMicroarray + aCGH	[Tsafrir, 2006]
Prostata-Ca, Zelllinien	Allelverlust (Hemizygotie)	68% (Haploinsuffizienz)	cDNAMicroarray + SKY	[Begley, 2006]
Prostata-Ca, mikrodissektiert	Hochgradige Amplifikation	20-44% (Expressionsanstieg)	cDNAMicroarray + aCGH	[Kim, 2007]

- In der ersten aufgeführten Arbeit zum Beispiel [Phillips, 2001] finden sich zwar 51% der hochregulierten Gene und 41% der herunterregulierten Gene in Regionen, mit entsprechenden genetischen Zugewinnen und Verlusten, jedoch finden sich auch ca. 50% aller signifikanten Genexpressionsveränderungen in chromosomalen Bereichen, die keine, oder sogar gegensätzliche Kopienzahlveränderungen zeigen. So lagen 14% der herunterregulierten Gene in Regionen, die von Zugewinnen und 9% der hochregulierten

Gene in Regionen, die von Verlusten betroffen waren. Trotzdem korrelierte das durchschnittliche Genexpressionsniveau mit genetischen Verlusten und Zugewinnen ($p < 0,0001$). Allerdings wurde bei dieser und der Arbeit von Platzer [2002] die konventionelle CGH eingesetzt, was teilweise die Diskrepanz zu anderen Arbeiten erklären könnte. Die Analyse von Metaphasenchromosomen überschätzt nämlich generell die Größe amplifizierter Segmente, was zu der Analyse einer hohen Anzahl von nichtamplifizierten Genen führen kann und so subsequent zu einer Reduzierung des Anteils überexprimierter Gene [Heidenblad, 2005]. Ferner wurde von Platzer et al. kein mikrodissektiertes Tumorgewebe verwendet (siehe unten).

- Auch bei Wolf et al. [2004] fand sich ein signifikante Einfluss von Kopienzahlveränderungen auf die Genexpression ($p < 0,0001$) bei der Betrachtung des gesamten Genoms. Trotzdem waren nur 12,1% der Gene mit einer reduzierten Kopienzahl auch herunterreguliert und 6,9% der Gene mit normaler Kopienzahl zeigten sich hochreguliert.
- Tsafrir et al. [2006] fanden ebenfalls Gene, deren Expressionsniveau nicht oder sogar negativ mit Kopienzahlveränderungen der entsprechenden Genregion korrelierte.
- Begley et al. [2006] zeigten in einer Untersuchung von Prostatakarzinomzelllinien, dass 68% der untersuchten Gene in Zelllinien hemizygot für Chromosom 8p mit einem haploinsuffizienten Transkriptionsniveau (ca. 50% von dem heterozygoter Zellen) assoziiert waren. Weiter zeigten 25% eine weitere Reduktion auf sub-haploinsuffizienz-Niveau, mit der Frage nach einer epigenetischen supprimierten Genexpression. Trotzdem zeigten 8% der Gene mit nur einem Allel ein Expressionsniveau über dem Haploinsuffizienz-Niveau von $<50\%$ der Norm. Hier müssen komplexe transkriptionelle und translationale Regulationsmechanismen vorliegen.
- Lapointe et al. [2007 supplementary material] konnten bei der Untersuchung der wohl drei bekanntesten Tumorgene für das Prostatakarzinom (NKX3.1 auf 8p21, MYC auf 8q24 und PTEN auf 10q23) allein für PTEN einen signifikanten Zusammenhang zwischen Kopienzahlveränderung des Chromosomenabschnitts 10q23 und der Herunterregulation des Gens feststellen. Bei NKX3.1 und MYC zeigten die Gene, trotz signifikanter Korrelation der Kopienzahlveränderung mit der allgemeinen Genexpression, bezogen auf den speziellen Chromosomenabschnitt keine differentielle Expression.

- Kim et al. [2007] zeigten für das Prostatakarzinom, dass bei 26% der metastasierten und 20% der lokal begrenzten Karzinome ein Zusammenhang zwischen hoher Genexpression und Genamplifikation bestand, während dieses Verhältnis bei moderater Überexpression 42% beziehungsweise 22% betrug.

Insgesamt besteht also ein deutlicher Zusammenhang zwischen Kopienzahlveränderung und Expressionsniveau, der jedoch bei Betrachtung individuelle Gene und Tumoren unterschiedlich sein kann. Betrachtet man die drei Studien mit mikrodisektiertem Mama, Kolon- und Prostatakarzinomgewebe, welche für das in vivo Verhalten sicherlich die größte Relevanz haben, so findet sich, abhängig vom Stadium, eine Veränderung des Expressionsniveaus von in von Kopienzahlveränderungen betroffenen Regionen bei 20-62% der Gene [Pollack, 2002; Tsafrir, 2006; Kim, 2007].

Bei dieser Spanne wird deutlich, dass die DNA-Kopienzahl zwar die Transkriptionskontrolle in unterschiedlichem Maße beeinflussen kann, aber andere schon vorhandene Kontrollmechanismen nicht außer Kraft setzen muss [Phillips, 2001]. Ferner wird deutlich, dass die Lage von einzelnen Genen in einer von genetischen Verlusten oder Zugewinnen betroffenen Region keinesfalls bedeutet, dass ihre Expression gleichsinnig verändert ist. Vielmehr finden sich solche Gene häufig nicht oder sogar manchmal gegensinnig in ihrer Expression verändert, wie es bei NKX3.1 und DLC1 in dieser Arbeit der Fall war.

Letztlich kann eine veränderte Genexpression auf der Veränderung eines Faktors, oder der Kombination mehrerer Faktoren, beruhen. Dazu gehören hereditäre genetische und erworbene somatische Veränderungen ([Sun, 2007], siehe *Tabelle 1.5-1*).

Daneben existiert aber noch eine Vielzahl an Regulationsmechanismen, von der Transkription, bis zur post-transkriptionellen Modifikation von Proteinen, welche nicht auf die Veränderung der DNA-Sequenz angewiesen sind. Dazu gehören epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung und Histonphosphorylierung, -methylierung und -acetylierung, aber auch der große Komplex von Faktoren, die den Promotorbereich eines Gens direkt beeinflussen (Transkriptionsfaktoren, Repressoren, Aktivatoren, Enhancer etc.), sowie die posttranskriptionelle Modifikation (Capping, Spleißen, Anfügen eines Poly-A-Schwanzes), RNA-Transport und -Degradierung sowie die posttranslationelle Modifikation.

Trotzdem liefert die simultane Analyse von Kopienzahl- und Expressionsaberrationen bei gleichen Gewebeproben wichtige Aufschlüsse über die Pathogenese des Prostatakarzinoms und trägt somit zum molekularen Verständnis dieser Erkrankung bei.

So konnten Lapointe et al [2007] in einer konsequenten Fortsetzung ihrer früheren Arbeit ([Lapointe, 2004] siehe *Kapitel 4.2.3*) spezifische chromosomale Aberrationen den von ihnen vorher identifizierten Prostatakarzinom-Subtypen zuordnen, welche sich in ihrem Genotyp und der Assoziation mit prognostischen Parametern unterschieden. Resultat war ein Modell alternativer genetischer Wege der Prostatatumorgenese (siehe *Abbildung 4.2.4-1*) im Gegensatz zu dem linearen Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz des sporadischen Kolorektalen Karzinoms. Dieses galt allerdings schon 1990 [Fearon, 1990] als Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis.

Beim Mammakarzinom konnten über Mikroarray-Analysen fünf genotypisch-differente Subtypen klassifiziert werden, welche mit unterschiedlichen prognostischen Parametern [Sorlie, 2001] und kürzlich auch mit verschiedenen Mustern von Kopienzahlveränderungen [Bergamaschi, 2006; Chin, 2006] assoziiert waren.

Bei genauerer Betrachtung dieser drei Beispiele zeigen sich jedoch drei Tumortypen mit unterschiedlichen Modellen ihrer Karzinogenese. Das einfachste Modell betrifft sicherlich das Kolorektale Karzinom, bei dem es in einer immer ähnlichen Abfolge von molekularen Aberrationen zu einer schrittweisen, sequenziellen und linearen Entdifferenzierung des Tumors kommt [Fearon, 1990]. Beim Mamma- und Prostatakarzinom konnte das lineare Modell bisher nicht bestätigt werden, wahrscheinlich aufgrund der Heterogenität beider Erkrankungen.

Da „Krebs“ im Wesentlichen eine Störung der Organogenese bedeutet, könnten die zellulären Kategorien, die von diesen Genexpressionsprofilen definiert werden, die verschiedenen Abstammungslinien und Stufen der Epitheldifferenzierung widerspiegeln, wie sie unter normalen Bedingungen stattfinden. Im Gegensatz zum hämatologischen System, sind die zellulären Hierarchien in Mamma- wie Prostataepithel aber bisher nur teilweise aufgeklärt und erschweren die Zuordnung einer bestimmten Mutation oder Tumorzelleigenschaft zu einem spezifischen Epithelzelltyp [Lawson, 2007; Stingl, 2007]. Für die Entstehung der unterschiedlichen Tumorsubtypen, vornehmlich aufgrund von Expressionsstudien, existieren daher im Wesentlichen zwei Theorien, die dem hämatologischen Modell der Tumorgenese ähneln.

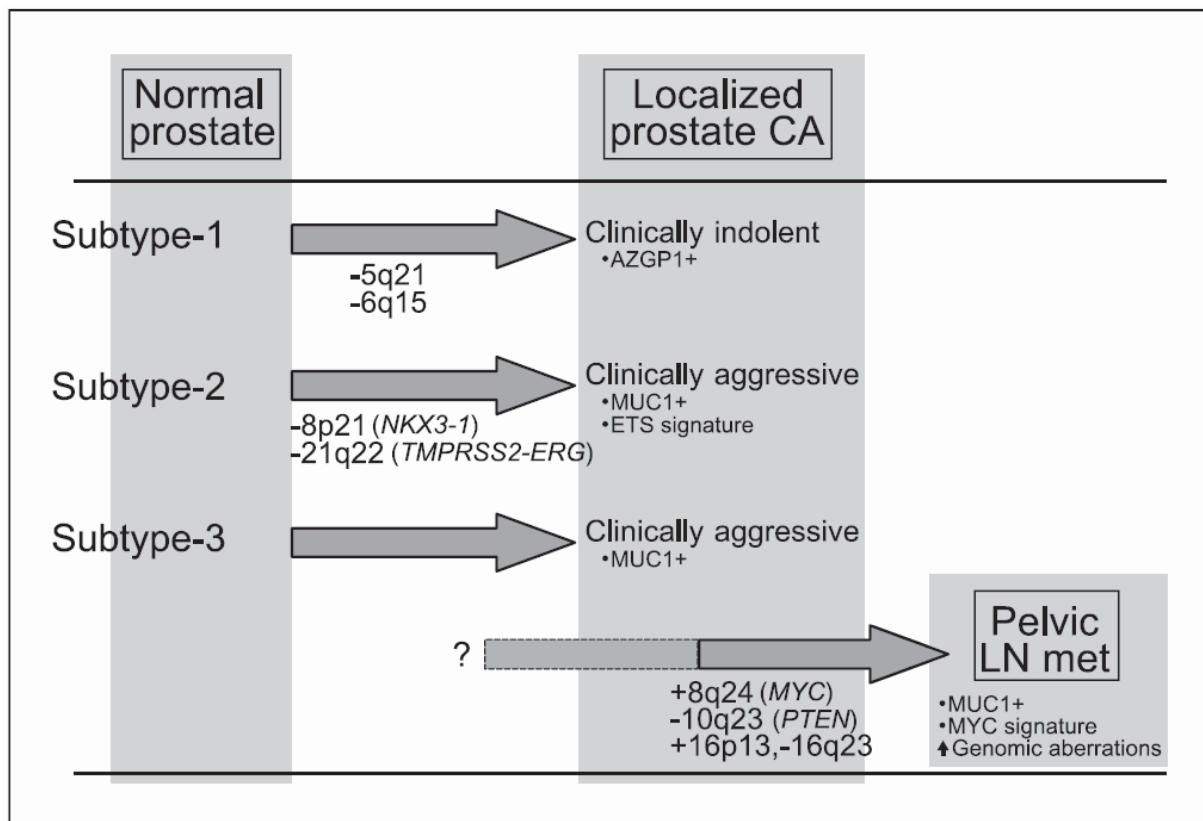


Abbildung 4.2.4-1: Alternative genetische Wege der Prostatatumorgenese (aus [Lapointe, 2007])

Zunächst wäre es möglich, dass jeder dieser Tumorsubtypen (zum Beispiel drei beim Prostatakarzinom und fünf beim Mamma-Karzinom) von einer anderen Stammzelle ausgeht, eventuell sogar von unterschiedlich differenzierten Zelltypen innerhalb des Epithels [Stingl, 2007].

Die andere Theorie besagt, dass Ausgangspunkt der Entwicklung unterschiedlicher Tumorsubtypen zwar dieselbe Vorläuferzelle/Stammzelle ist, jedoch spezifische Kombinationen von Mutationen den malignen Klon entlang eines spezifischen (De-) Differenzierungsweges treiben, der sich im Tumorphänotyp widerspiegelt [Stingl, 2007]. Dabei ist weiter möglich, dass eine Mutation zwar in einer Stammzelle initiiert wird, die phänotypische Ausprägung aber erst durch subsequeute Mutationen in Nicht-Stammzell-Nachläufern zu Tage tritt [Stingl, 2007]. Entscheidender Unterschied zwischen beiden Modellen ist, dass im ersten eher die Ursprungszelle, im zweiten vornehmlich die Art und Kombination von genetischen Aberrationen den malignen Phänotyp bestimmt. Zum Beispiel findet sich die Translokation $t(9;22)$

(Philadelphia-Chromosom) charakteristisch bei der CML (>90%), ist aber auch in Tumorzellen der ALL in einem Teil der Fälle nachweisbar. Ausgangspunkte sind aber verschiedene Vorläuferzellen mit myeloischer oder lymphoider Differenzierung. Andererseits sind die Subtypen der ALL prognostisch wie molekularbiologisch durch Kombinationen verschiedener Chromosomenaberrationen charakterisiert [Herold, 2004; Schulz, 2005].

Unabhängig vom Ursprung und der molekularen Entstehung der Subtypen ist das Ziel dieser Studien die Identifikation von charakteristischen Subtyp-Markern, die sowohl Genexpressions-Signaturen (zum Beispiel ETS-Signatur im Prostatakarzinom), ausgewählte immunhistochemische Färbemuster oder genetische Marker (5q21/6q15 Deletionen), als auch eine Kombination dieser (AZGP1 Expression + 5q21/6q15 Deletionen) darstellen können. Von besonderem Interesse sind hier Marker, die weniger aggressive Tumoren identifizieren und zur besseren Identifikation von niedrig-malignen Tumoren beitragen könnten. Diese könnten in Kombination mit dem Fehlen von Markern schlechter Prognose (zum Beispiel MUC1-, EZH2-Expression, TMPRSS2-Fusion, 8p-Verlust [Varambally, 2002; Lapointe, 2004; Paris, 2004; Demichelis, 2007]) dann abwartend behandelt werden.

Überträgt man dieses Konzept auf die in dieser Arbeit gefundenen Daten, so könnten 8p21.3-Deletionen und PPP3CC- beziehungsweise DcR1- und DcR2-Herunterregulation als Marker für einen prognostisch ungünstigen Subtyp des Prostatakarzinoms gelten.

Regulationsmechanismen abseits des Allelstatus oder der Gendosis scheinen aber im Einzelfall entscheidenden Einfluss auf die Genexpression zu nehmen (siehe NKX3.1).

Neben diesen und anderen epigenetischen Mechanismen, scheint jedoch der Hauptangriffspunkt expressionregulatorischer Mechanismen der Promotorbereich eines Gens zu sein. Dieser Punkt wird im folgenden Kapitel genauer ausgeführt.

4.2.4.1 Dosis-Balance in der Genregulation

Es gibt wachsende Hinweise darauf, dass die Effekte der Aneuploidie entarteter Zellen auf die Entwicklung eines malignen Phänotyps nicht nur alleine von dem regulatorischen Einfluss der Kopienzahlveränderung abhängen, sondern vielmehr von einer Veränderung der relativen Dosis-Balance verschiedener regulatorischer Komponenten (Gene) herrühren [Birchler, 2005].

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Kopienzahlveränderungen nicht nur die Expression der auf dem betroffenen Chromosomenabschnitt liegende Gene modulieren, sondern auch die anderer über das Genom verteilter Gene (Übersicht in [Birchler, 2005]). Allerdings beruhen diese Ergebnisse überwiegend auf Untersuchungen von Modellorganismen wie *Drosophila* und sollen daher hier nur beispielhaft erwähnt werden. Dieser Aneuploidie-Effekt tritt besonders dann zu Tage, wenn Transkriptionsfaktoren, Chromatinproteine und Mitglieder von Signal-Transduktionskaskaden durch die Kopienzahlveränderung betroffen sind [Birchler, 2001]. Es scheint eine Art Hierarchie dosisabhängiger Regulatoren zu geben, die Einfluss auf bestimmte Zielgene nehmen und deren Gleichgewicht die Genexpression ebendieser Zielgene moduliert. Zum Beispiel wurden für das Gen für weiße Augenfarbe bei *Drosophila* 47 dosisabhängige Modifikatoren identifiziert, die wahrscheinlich in einem regulatorischen Netzwerk die Genexpression und die phänotypische Ausprägung des Gens beeinflussen ([Birchler, 2001], siehe auch NKX3.1-PTEN-Kooperation in *Kapitel 4.1.4*). Diese These könnte auch teilweise den Sachverhalt der Dosiskompensation erklären, bei dem sich die Genexpression eines Gens nicht der Dosisveränderung anpasst, sondern unverändert oder gar gegensinnig verändert ist. Diesen finden wir nicht nur scheinbar bei NKX3.1 und DLC1, sondern auch bei genauerer Betrachtung der Studien aus *Tabelle 4.2.4-1* [Phillips, 2001; Wolf, 2004; Begley, 2006; Tsafrir, 2006]. Ursächlich dafür könnte sein, dass die große Mehrheit der dosisabhängigen Modifikatoren dieser regulatorischen Netzwerke negativen Einfluss auf die Expression des Zielgens haben. Geht nun bei der Deletion eines bestimmten Genomabschnittes nicht nur das Allel des Zielgens, sondern auch das eines wichtigen Modifikators verloren, könnte der Wegfall der negativen Expressionsregulation den Effekt des Dosisverlustes ausgleichen [Birchler, 1981; Birchler, 1990].

4.2.5 Methodische Limitierungen

Bei den aufgeführten Studien, wie auch dieser Arbeit ist zunächst zu bedenken, dass Veränderungen von Chromosomenabschnitten die Expression über große Bereiche beeinflussen können und somit auch solche Gene, die in keiner Beziehung zur malignen Progression der untersuchten Tumorentität stehen [Masayeva, 2004]. Denn trotz eines besseren Auflösungsvermögens der aCGH ist eine genaue Kartierung und die Identifikation von kleinen Bereichen von Gendosisveränderungen immer noch schwierig. In *Kapitel 4.2.2* konnte gezeigt werden, dass sich die Expressiondaten dieser Arbeit wesentlich besser mit den Daten der CGH-Analyse [Chang, 2007] in Einklang bringen lassen konnten, wenn der betroffene Chromosomenbereich auf eine möglichst kleine Konsensusregion eingeschränkt wurde. Daher wird die Beziehung zwischen Gendosis- und Expressionsveränderungen in diesen CGH-Studie wohl eher unterschätzt.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode der LOH-Analyse hat sicherlich auch ihre Grenzen. Zwar hat sie eine sehr hohe Auflösung im Gegensatz zur konventionellen-, aber auch Array-CGH, allerdings wurden nur 7 Mikrosatellitenmarker für den ganzen Chromosomenarm 8p eingesetzt, wodurch die Kartierung mit nicht unerheblich großen Lücken erfolgte. Somit ist nicht auszuschließen, dass ein LOH im Mikrosatellitenbereich nachgewiesen werden kann, der Genbereich, der einige Megabasen entfernt liegt, allerdings von diesem Verlust gar nicht betroffen ist.

Die Limitierungen der cDNA-Expressions-Arrays wurde schon in *Kapitel 4.2.4* dargestellt und sie treffen in vielen Punkten auch auf die Expressionsanalyse dieser Arbeit zu (siehe auch NKX3.1). Hier sollte noch kritisch angemerkt werden, dass Dobbin und Simon [Dobbin, 2005] in ihrer Arbeit postulieren, dass für die Entwicklung prognostischer Marker bei humanen Genexpressionsstudien eine Fallzahl von 50 oder größer verwendet werden sollte (mit Varianz eines Gens über die Proben von 0,5, Fehler 1. Art = 0,001, Fehler 2. Art = 0,005). Dieser Anspruch trifft sicherlich auf die wenigsten Studien zu, einschließlich der hier zu Grunde liegenden.

Neben diesen methodischen Einschränkungen sind auch die Art der Gewebegewinnung und das Probendesign von entscheidender Bedeutung. Mikrodissektion ist sicherlich zurzeit der Goldstandard der Gewebegewinnung, aber mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Ferner lassen sich kaum ausreichende Mengen von sowohl DNA wie RNA aus einer so

mikrodissektierten Probe gewinnen, um größere Versuchreihen zu analysieren. Für die Expressionsanalysen (Microarray) steht deswegen häufig nur eine geringe Probenanzahl zur Verfügung, welche zum einen die Validität der einzelnen Studien herabsetzt, zum anderen einen Vergleich erschwert. Nicht umsonst finden sich beim Vergleich verschiedener Microarray-Studien kaum Überlappungen.

Weiter ist bei der Gewinnung von Gewebeproben in der Regel völlig unklar, ob es sich um einen aggressiven, oder einen möglicherweise latent verlaufenden Tumor handelt. Denn im Zeitalter des PSA-Screenings werden die meisten Tumoren in einem organbegrenzten Stadium entdeckt und operiert. Problematisch ist dies vor allem deswegen, da hier der größte Forschungsbedarf besteht, nämlich in einer differenzierten kurativen Therapieplanung. Ferner ist die Gewinnung von juvenilem, völlig gesundem Prostatagewebe aufwendig; meist handelt es sich um Unfallopfer, die der Organspende zugewilligt haben. Daher wird zum Vergleich mit Tumorgewebe häufig Benignes Prostatahyperplasie-Gewebe herangezogen, das zwar keine Präkanzerose darstellt, aber häufig ähnliche Veränderungen wie das eigentliche Tumorgewebe aufweist (siehe *Kapitel 4.1.5: DLC1-Expression und Methylierungsstatus in Tumor- und Benignem Prostatahyperplasie-Gewebe*). Genauso finden sich auch in unserer Messreihe wenige Proben aus metastatischen Tumoren, die eindeutig aggressiven Charakter haben. Denn häufig befinden sich diese Patienten in inoperablem Zustand und werden einer palliativen, nicht-operativen, Chemo- und Strahlentherapie zugeführt.

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die in dieser Arbeit gefundenen Veränderungen auf genetischer (und epigenetischer) Ebene lassen sich teilweise nur mühsam in den Bereich von Transkription und Translation übersetzten beziehungsweise übertragen. Es zeigt sich uns das molekulare Spiegelbild einer klinisch wie makroskopisch und histologisch sehr heterogenen Erkrankung,

Bei differenzierter Betrachtung und Vergleich unserer Daten mit Erkenntnissen von anderen Gruppen, bietet sich jedoch das Bild eines zunehmenden molekularen Verständnisses der Prostatakarzinogenese. Vor allem der simultane Gebrauch von Hochdurchsatz-Verfahren wie der aCGH und Microarray-Analysen ermöglicht, trotz aller Beschränkungen, erstmals die Untersuchung der Beziehung zwischen chromosomalen Aberrationen in Form von Kopienzahlveränderungen und Expressionsveränderungen in größeren Umfang. Weiterer Forschungsbedarf scheint besonders in einer möglichst genauen, hochauflösenden Kartierung von Kopienzahlveränderungen häufig von chromosomalen Aberrationen betroffener Chromosomenabschnitte zu liegen. Weiter scheinen standardisierte, mittels Genchips durchgeführter Expressionanalysen dringend notwendig.

Über denselben Ansatz, wenn auch in kleinerem Stil, waren wir in dieser Arbeit in der Lage, Verluste genetischen Materials auf Chromosom 8p (8p21.3) mit der Herunterregulation von drei potentiellen Tumorgenen (PPP3CC, DcR1, DcR2) zu assoziieren, die nicht nur als molekulare Marker eines prognostisch ungünstigen Tumortyps dienen könnten (8p21.3-Verluste + PPP3CC-, DcR1-, DcR2-Herunterregulation), sondern auch Relevanz für zur Zeit in präklinische Studien befindlichen Therapieverfahren haben (DcR1, DcR2).

Weiter hat uns das unerwartete Expressionsverhalten einiger Gene (besonders NKX3.1, DLC1) zu einem sehr differenzierten Blick auf die Expressionkontrolle und -regulation gezwungen. Dabei wurde deutlich, dass eine unglaubliche Vielzahl von Faktoren abseits des Allelstatus die Genexpression beeinflussen kann. Das Verhältnis von Kopienzahl- und Expressionsveränderungen sollte deswegen, trotz eines globalen Zusammenhangs, im Einzelfall stets kritisch hinterfragt werden.

6 L I T E R A T U R

- Abate-Shen C and Shen MM: Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* **14**: 2410-34, 2000.
- ACS: Cancer Statistics. www.cancer.org, 2005.
- Adolfsson J: Deferred treatment of low grade stage T3 prostate cancer without distant metastases. *J Urol* **149**: 326-8; discussion 328-9, 1993.
- Aguirre AJ, Brennan C, Bailey G, Sinha R, Feng B, Leo C, Zhang Y, Zhang J, Gans JD, Bardeesy N, Cauwels C, Cordon-Cardo C, Redston MS, DePinho RA and Chin L: High-resolution characterization of the pancreatic adenocarcinoma genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9067-72, 2004.
- Alers JC, Krijtenburg PJ, Rosenberg C, Hop WC, Verkerk AM, Schroder FH, van der Kwast TH, Bosman FT and van Dekken H: Interphase cytogenetics of prostatic tumor progression: specific chromosomal abnormalities are involved in metastasis to the bone. *Lab Invest* **77**: 437-48, 1997.
- Alers JC, Krijtenburg PJ, Vis AN, Hoedemaeker RF, Wildhagen MF, Hop WC, van Der Kwast TT, Schroder FH, Tanke HJ and van Dekken H: Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies : early cancers may contain aggressive genetic features. *Am J Pathol* **158**: 399-406, 2001.
- Alers JC, Rochat J, Krijtenburg PJ, Hop WC, Kranse R, Rosenberg C, Tanke HJ, Schroder FH and van Dekken H: Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest* **80**: 931-42, 2000.
- Aramburu J, Heitman J and Crabtree GR: Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep* **5**: 343-8, 2004.
- Arbieva ZH, Banerjee K, Kim SY, Edassery SL, Maniatis VS, Horrigan SK and Westbrook CA: High-resolution physical map and transcript identification of a prostate cancer deletion interval on 8p22. *Genome Res* **10**: 244-57, 2000.
- Arroyo JD and Hahn WC: Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* **24**: 7746-55, 2005.
- Asatiani E, Huang WX, Wang A, Rodriguez Ortner E, Cavalli LR, Haddad BR and Gelmann EP: Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res* **65**: 1164-73, 2005.
- Ashkenazi A: Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2**: 420-30, 2002.

- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z and Schwall RH: Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* **104**: 155-62, 1999.
- Aus G, Robinson D, Rosell J, Sandblom G and Varenhorst E: Survival in prostate carcinoma--outcomes from a prospective, population-based cohort of 8887 men with up to 15 years of follow-up: results from three countries in the population-based National Prostate Cancer Registry of Sweden. *Cancer* **103**: 943-51, 2005.
- Ayala G, Wang D, Wulf G, Frolov A, Li R, Sowadski J, Wheeler TM, Lu KP and Bao L: The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer. *Cancer Res* **63**: 6244-51, 2003.
- Baines CP and Molkenstein JD: STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* **38**: 47-62, 2005.
- Bastacky SI, Wojno KJ, Walsh PC, Carmichael MJ and Epstein JI: Pathological features of hereditary prostate cancer. *J Urol* **153**: 987-92, 1995.
- Bedford MT and van Helden PD: Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res* **47**: 5274-6, 1987.
- Begley L, Keeney D, Beheshti B, Squire JA, Kant R, Chaib H, MacDonald JW, Rhim J and Macoska JA: Concordant copy number and transcriptional activity of genes mapping to derivative chromosomes 8 during cellular immortalization in vitro. *Genes Chromosomes Cancer* **45**: 136-46, 2006.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N and Golani I: Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**: 279-84, 2001.
- Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, Sorlie T, Hernandez-Boussard T, Lonning PE, Tibshirani R, Borresen-Dale AL and Pollack JR: Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **45**: 1033-40, 2006.
- Bernard D, Quatannens B, Vandenbunder B and Abbadie C: Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1. *J Biol Chem* **276**: 27322-8, 2001.
- Bethel CR and Bieberich CJ: Loss of Nkx3.1 expression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Prostate* **67**: 1740-50, 2007.
- Bigler D, Gioeli D, Conaway MR, Weber MJ and Theodorescu D: Rap2 regulates androgen sensitivity in human prostate cancer cells. *Prostate* **67**: 1590-9, 2007.

- Birchler JA: The Genetic Basis of Dosage Compensation of Alcohol Dehydrogenase-1 in Maize. *Genetics* **97**: 625-637, 1981.
- Birchler JA, Bhadra U, Bhadra MP and Auger DL: Dosage-dependent gene regulation in multicellular eukaryotes: implications for dosage compensation, aneuploid syndromes, and quantitative traits. *Dev Biol* **234**: 275-88, 2001.
- Birchler JA, Hiebert JC and Paigen K: Analysis of autosomal dosage compensation involving the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **124**: 679-86, 1990.
- Birchler JA, Riddle NC, Auger DL and Veitia RA: Dosage balance in gene regulation: biological implications. *Trends Genet* **21**: 219-26, 2005.
- Birnbaum D, Adelaide J, Popovici C, Charafe-Jauffret E, Mozziconacci MJ and Chaffanet M: Chromosome arm 8p and cancer: a fragile hypothesis. *Lancet Oncol* **4**: 639-42, 2003.
- Biswas G, Anandatheerthavarada HK, Zaidi M and Avadhani NG: Mitochondria to nucleus stress signaling: a distinctive mechanism of NFkappaB/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of IkappaBbeta. *J Cell Biol* **161**: 507-19, 2003.
- Blümke K: Molekulargenetische Charakterisierung disseminierter Tumorzellen von Nierenzellkarzinom-Patienten. *Klinik für Urologie und Pathologie, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg*,
- Böcker D, Heitz: Pathologie, 2.Auflage. *Urban&Fischer*, 2000.
- Bonkhoff H and Remberger K: Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* **28**: 98-106, 1996.
- Bostwick DG and Foster CS: Predictive factors in prostate cancer: current concepts from the 1999 College of American Pathologists Conference on Solid Tumor Prognostic Factors and the 1999 World Health Organization Second International Consultation on Prostate Cancer. *Semin Urol Oncol* **17**: 222-72, 1999.
- Bova GS and Isaacs WB: Review of allelic loss and gain in prostate cancer. *World J Urol* **14**: 338-46, 1996.
- Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, Gasser TC, Koivisto P, Lack EE, Kononen J, Kallioniemi OP and Gelmann EP: Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* **60**: 6111-5, 2000.
- Bratt O: Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* **168**: 906-13, 2002a.
- Bratt O, Damber JE, Emanuelsson M and Gronberg H: Hereditary prostate cancer: clinical characteristics and survival. *J Urol* **167**: 2423-6, 2002b.

- Bratt O, Kristoffersson U, Lundgren R and Olsson H: Familial and hereditary prostate cancer in southern Sweden. A population-based case-control study. *Eur J Cancer* **35**: 272-7, 1999.
- Brautigan DL: Flicking the switches: phosphorylation of serine/threonine protein phosphatases. *Semin Cancer Biol* **6**: 211-7, 1995.
- Brawley OW, Knopf K and Merrill R: The epidemiology of prostate cancer part I: descriptive epidemiology. *Semin Urol Oncol* **16**: 187-92, 1998a.
- Brawley OW, Knopf K and Thompson I: The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. *Semin Urol Oncol* **16**: 193-201, 1998b.
- Breslow RA, Sorkin JD, Frey CM and Kessler LG: Americans' knowledge of cancer risk and survival. *Prev Med* **26**: 170-7, 1997.
- Bucur O, Ray S, Bucur MC and Almasan A: APO2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer therapy. *Front Biosci* **11**: 1549-68, 2006.
- Bueno OF, Lips DJ, Kaiser RA, Wilkins BJ, Dai YS, Glascock BJ, Klevitsky R, Hewett TE, Kimball TR, Aronow BJ, Doevendans PA and Molkentin JD: Calcineurin A β gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction. *Circ Res* **94**: 91-9, 2004.
- Bunting PS: A guide to the interpretation of serum prostate specific antigen levels. *Clin Biochem* **28**: 221-41, 1995.
- Caine GJ, Blann AD, Stonelake PS, Ryan P and Lip GY: Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1. *Eur J Clin Invest* **33**: 883-90, 2003.
- Campbell W: Urology, 9. Auflage. 2007.
- Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, Faruque M, Moses T, Ewing C, Gillanders E, Hu P, Bujnovszky P, Makalowska I, Baffoe-Bonnie A, Faith D, Smith J, Stephan D, Wiley K, Brownstein M, Gildea D, Kelly B, Jenkins R, Hostetter G, Matikainen M, Schleutker J, Klinger K, Connors T, Xiang Y, Wang Z, De Marzo A, Papadopoulos N, Kallioniemi OP, Burk R, Meyers D, Gronberg H, Meltzer P, Silverman R, Bailey-Wilson J, Walsh P, Isaacs W and Trent J: Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* **30**: 181-4, 2002.
- Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB and Walsh PC: Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* **150**: 797-802, 1993.
- Chang BL, Liu W, Sun J, Dimitrov L, Li T, Turner AR, Zheng SL, Isaacs WB and Xu J: Integration of somatic deletion analysis of prostate cancers and germline linkage analysis of prostate cancer families reveals two small consensus regions for prostate cancer genes at 8p. *Cancer Res* **67**: 4098-103, 2007.

- Chen SY, Wulf G, Zhou XZ, Rubin MA, Lu KP and Balk SP: Activation of beta-catenin signaling in prostate cancer by peptidyl-prolyl isomerase Pin1-mediated abrogation of the androgen receptor-beta-catenin interaction. *Mol Cell Biol* **26**: 929-39, 2006.
- Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB and Jensen RH: Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res* **56**: 3091-102, 1996.
- Cher ML, MacGrogan D, Bookstein R, Brown JA, Jenkins RB and Jensen RH: Comparative genomic hybridization, allelic imbalance, and fluorescence in situ hybridization on chromosome 8 in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **11**: 153-62, 1994.
- Chesire DR and Isaacs WB: Beta-catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. *Endocr Relat Cancer* **10**: 537-60, 2003.
- Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, Lapuk A, Neve RM, Qian Z, Ryder T, Chen F, Feiler H, Tokuyasu T, Kingsley C, Dairkee S, Meng Z, Chew K, Pinkel D, Jain A, Ljung BM, Esserman L, Albertson DG, Waldman FM and Gray JW: Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* **10**: 529-41, 2006.
- Crabtree GR: Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**: 611-4, 1999.
- Crabtree GR and Olson EN: NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**: S67-79, 2002.
- Cronauer MV, Schulz WA, Ackermann R and Burchardt M: Effects of WNT/beta-catenin pathway activation on signaling through T-cell factor and androgen receptor in prostate cancer cell lines. *Int J Oncol* **26**: 1033-40, 2005.
- Cunha GR and Donjacour A: Stromal-epithelial interactions in normal and abnormal prostatic development. *Prog Clin Biol Res* **239**: 251-72, 1987.
- Cunningham JM, Shan A, Wick MJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Tester DJ, Qian J, Takahashi S, Jenkins RB, Bostwick DG and Thibodeau SN: Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **56**: 4475-82, 1996.
- Debes JD and Tindall DJ: Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med* **351**: 1488-90, 2004.
- Degli-Esposti M: To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* **65**: 535-42, 1999.

- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA and Goodwin RG: The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* **7**: 813-20, 1997.
- DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB and Epstein JI: Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* **361**: 955-64, 2003.
- Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, Setlur SR, Hoshida Y, Mosquera JM, Pawitan Y, Lee C, Adami HO, Mucci LA, Kantoff PW, Andersson SO, Chinnaiyan AM, Johansson JE and Rubin MA: TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* **26**: 4596-9, 2007.
- Devilard E, Bladou F, Ramuz O, Karsenty G, Dales JP, Gravis G, Nguyen C, Bertucci F, Xerri L and Birnbaum D: FGFR1 and WT1 are markers of human prostate cancer progression. *BMC Cancer* **6**: 272, 2006.
- Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA and Chinnaiyan AM: Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* **412**: 822-6, 2001.
- Dhanasekaran SM, Dash A, Yu J, Maine IP, Laxman B, Tomlins SA, Creighton CJ, Menon A, Rubin MA and Chinnaiyan AM: Molecular profiling of human prostate tissues: insights into gene expression patterns of prostate development during puberty. *Faseb J* **19**: 243-5, 2005.
- Dobbin K and Simon R: Sample size determination in microarray experiments for class comparison and prognostic classification. *Biostatistics* **6**: 27-38, 2005.
- Dong JT: Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* **20**: 173-93, 2001a.
- Dong JT, Boyd JC and Frierson HF, Jr.: Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate* **49**: 166-71, 2001b.
- Duesberg PH: Are cancers dependent on oncogenes or on aneuploidy? *Cancer Genet Cytogenet* **143**: 89-91, 2003.
- Durkin ME, Ullmannova V, Guan M and Popescu NC: Deleted in liver cancer 3 (DLC-3), a novel Rho GTPase-activating protein, is downregulated in cancer and inhibits tumor cell growth. *Oncogene* **26**: 4580-9, 2007.
- Durkin ME, Yuan BZ, Thorgeirsson SS and Popescu NC: Gene structure, tissue expression, and linkage mapping of the mouse DLC-1 gene (Arhgap7). *Gene* **288**: 119-27, 2002.
- Ehrlich M: DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J Nutr* **132**: 2424S-2429S, 2002.

- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO and Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14863-8, 1998.
- Eisenberger MA, Crawford ED, Wolf M, Blumenstein B, McLeod DG, Benson R, Dorr FA, Benson M and Spaulding JT: Prognostic factors in stage D2 prostate cancer; important implications for future trials: results of a cooperative intergroup study (INT.0036). The National Cancer Institute Intergroup Study #0036. *Semin Oncol* **21**: 613-9, 1994.
- Eltze E, Semjonow A, Korsching E and Brandt B: Loss of NKX3.1 indicates early PSA recurrence in prostate cancer patients. 5. *DPKK Meeting, Dec. 2007, Otzenhausen*, 2007.
- Emami KH and Corey E: When prostate cancer meets bone: control by wnts. *Cancer Lett* **253**: 170-9, 2007.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC and Young PR: Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* **273**: 14363-7, 1998.
- Emmert-Buck MR, Vocke CD, Pozzatti RO, Duray PH, Jennings SB, Florence CD, Zhuang Z, Bostwick DG, Liotta LA and Linehan WM: Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* **55**: 2959-62, 1995.
- Eydmann ME and Knowles MA: Mutation analysis of 8p genes POLB and PPP2CB in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **93**: 167-71, 1997.
- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B and Walczak H: TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 1462-75, 2007.
- Farkas A, Schneider D, Perrotti M, Cummings KB and Ward WS: National trends in the epidemiology of prostate cancer, 1973 to 1994: evidence for the effectiveness of prostate-specific antigen screening. *Urology* **52**: 444-8; discussion 448-9, 1998.
- Fearon ER and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**: 759-67, 1990.
- Feldman BJ and Feldman D: The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* **1**: 34-45, 2001.
- Florl AR, Steinhoff C, Muller M, Seifert HH, Hader C, Engers R, Ackermann R and Schulz WA: Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer* **91**: 985-94, 2004.
- Fossa SD, Wachre H and Paus E: The prognostic significance of prostate specific antigen in metastatic hormone-resistant prostate cancer. *Br J Cancer* **66**: 181-4, 1992.

- Fowler M, Borazanci E, McGhee L, Pylant SW, Williams BJ, Glass J, Davis JN and Meyers S: RUNX1 (AML-1) and RUNX2 (AML-3) cooperate with prostate-derived Ets factor to activate transcription from the PSA upstream regulatory region. *J Cell Biochem* **97**: 1-17, 2006.
- French LE and Tschopp J: The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* **5**: 146-7, 1999.
- Fritzsche S, Kenzelmann M, Hoffmann MJ, Muller M, Engers R, Grone HJ and Schulz WA: Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **13**: 839-49, 2006.
- Garcia MJ, Pole JC, Chin SF, Teschendorff A, Naderi A, Ozdag H, Vias M, Kranjac T, Subkhankulova T, Paish C, Ellis I, Brenton JD, Edwards PA and Caldas C: A 1 Mb minimal amplicon at 8p11-12 in breast cancer identifies new candidate oncogenes. *Oncogene* **24**: 5235-45, 2005.
- Gehring MM: Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett* **557**: 1-8, 2004.
- Gerber DJ, Hall D, Miyakawa T, Demars S, Gogos JA, Karayiorgou M and Tonegawa S: Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8993-8, 2003.
- Giri D, Ropiquet F and Ittmann M: Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* **5**: 1063-71, 1999.
- Gisselsson D: Chromosome instability in cancer: how, when, and why? *Adv Cancer Res* **87**: 1-29, 2003.
- Gonzalgo ML and Isaacs WB: Molecular pathways to prostate cancer. *J Urol* **170**: 2444-52, 2003.
- Gowardhan B, Douglas DA, Mathers ME, McKie AB, McCracken SR, Robson CN and Leung HY: Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. *Br J Cancer* **92**: 320-7, 2005.
- Gronberg H: Prostate cancer epidemiology. *Lancet* **361**: 859-64, 2003.
- Guan M, Zhou X, Soultzis N, Spandidos DA and Popescu NC: Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: potential clinical applications. *Clin Cancer Res* **12**: 1412-9, 2006.
- Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-14, 1998.

- Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI and Walsh PC: Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am* **28**: 555-65, 2001.
- Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, Hayes RB, Legler JM, Prorok PC, Ries LA, Merrill RM and Kaplan RS: Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1017-24, 1999.
- Hautmann h: Urologie, 2. Auflage. *Springer Verlag*, 2000.
- Heidenblad M, Lindgren D, Veltman JA, Jonson T, Mahlamaki EH, Gorunova L, van Kessel AG, Schoenmakers EF and Hoglund M: Microarray analyses reveal strong influence of DNA copy number alterations on the transcriptional patterns in pancreatic cancer: implications for the interpretation of genomic amplifications. *Oncogene* **24**: 1794-801, 2005.
- Henshall SM, Afar DE, Hiller J, Horvath LG, Quinn DI, Rasiah KK, Gish K, Willhite D, Kench JG, Gardiner-Garden M, Stricker PD, Scher HI, Grygiel JJ, Agus DB, Mack DH and Sutherland RL: Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res* **63**: 4196-203, 2003.
- Hermeking H: 14-3-3 proteins and cancer biology. *Semin Cancer Biol* **16**: 161, 2006.
- Herold G: Innere Medizin. 2004.
- Hesry V, Piquet-Pellorce C, Travert M, Donaghy L, Jegou B, Patard JJ and Guillaudeau T: Sensitivity of prostate cells to TRAIL-induced apoptosis increases with tumor progression: DR5 and caspase 8 are key players. *Prostate* **66**: 987-95, 2006.
- Hoffmann MJ, Muller M, Engers R and Schulz WA: Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. *Biochem Pharmacol* **72**: 1577-88, 2006.
- Holen I, Croucher PI, Hamdy FC and Eaton CL: Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* **62**: 1619-23, 2002.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R and Gelfand DH: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7276-80, 1991.
- Homma Y and Emori Y: A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *Embo J* **14**: 286-91, 1995.
- Hornstein M, Hoffmann M, Alexa A, Xamanaka M, Müller M, Jung V, Rahnenführer J, Schulz WA: Protein Phosphatase and TRAIL Receptor Genes as New Candidate Tumor Genes on Chromosome 8p in Prostate Cancer. *Cancer Genomics & Proteomics* **5**: 123-136, 2008.

- Hsing AW, Sakoda LC, Chen J, Chokkalingam AP, Sesterhenn I, Gao YT, Xu J and Zheng SL: MSR1 Variants and the risks of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: a population-based study in China. *Carcinogenesis*, 2007.
- Hu WH, Johnson H and Shu HB: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* **274**: 30603-10, 1999.
- Huang L, Pu Y, Hepps D, Danielpour D and Prins GS: Posterior Hox gene expression and differential androgen regulation in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* **148**: 1235-45, 2007.
- Huber W, von Heydebreck A, Sultmann H, Poustka A and Vingron M: Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**: S96-104, 2002.
- Humphrey PA, Walther PJ, Currin SM and Vollmer RT: Histologic grade, DNA ploidy, and intraglandular tumor extent as indicators of tumor progression of clinical stage B prostatic carcinoma. A direct comparison. *Am J Surg Pathol* **15**: 1165-70, 1991.
- Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, Ringner M, Sauter G, Monni O, Elkahoul A, Kallioniemi OP and Kallioniemi A: Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res* **62**: 6240-5, 2002.
- Hyytinen ER, Frierson HF, Jr., Sipe TW, Li CL, Degeorges A, Sikes RA, Chung LW and Dong JT: Loss of heterozygosity and lack of mutations of the XPG/ERCC5 DNA repair gene at 13q33 in prostate cancer. *Prostate* **41**: 190-5, 1999.
- Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP and Zhou T: Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* **7**: 954-60, 2001.
- Iwai-Kanai E and Hasegawa K: Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis. *Mol Cell Biochem* **259**: 163-8, 2004.
- Janssens V and Goris J: Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**: 417-39, 2001.
- Janssens V, Goris J and Van Hoof C: PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 34-41, 2005.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ and Thun MJ: Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* **54**: 8-29, 2004.

- Jenkins RB, Qian J, Lieber MM and Bostwick DG: Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* **57**: 524-31, 1997.
- Karan D, Lin MF, Johansson SL and Batra SK: Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* **103**: 285-93, 2003.
- Kawasaki H, Taira K and Morris KV: siRNA induced transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Cell Cycle* **4**: 442-8, 2005.
- Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK and Lipkowitz S: Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* **59**: 734-41, 1999.
- Keetch DW, Humphrey PA, Smith DS, Stahl D and Catalona WJ: Clinical and pathological features of hereditary prostate cancer. *J Urol* **155**: 1841-3, 1996.
- Kim JH, Dhanasekaran SM, Mehra R, Tomlins SA, Gu W, Yu J, Kumar-Sinha C, Cao X, Dash A, Wang L, Ghosh D, Shedden K, Montie JE, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB and Chinnaiyan AM: Integrative analysis of genomic aberrations associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* **67**: 8229-39, 2007.
- Kim MJ, Bhatia-Gaur R, Banach-Petrosky WA, Desai N, Wang Y, Hayward SW, Cunha GR, Cardiff RD, Shen MM and Abate-Shen C: Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res* **62**: 2999-3004, 2002a.
- Kim MJ, Cardiff RD, Desai N, Banach-Petrosky WA, Parsons R, Shen MM and Abate-Shen C: Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2884-9, 2002b.
- Kim TY, Jong HS, Song SH, Dimtchev A, Jeong SJ, Lee JW, Kim TY, Kim NK, Jung M and Bang YJ: Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells. *Oncogene* **22**: 3943-51, 2003.
- Kimberley FC and Screaton GR: Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* **14**: 359-72, 2004.
- Kindich R, Florl AR, Kamradt J, Lehmann J, Muller M, Wullich B and Schulz WA: Relationship of NKX3.1 and MYC gene copy number ratio and DNA hypomethylation to prostate carcinoma stage. *Eur Urol* **49**: 169-75; discussion 175, 2006.
- Knudson AG: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* **1**: 157-62, 2001.
- Kopper L and Timar J: Genomics of prostate cancer: is there anything to "translate"? *Pathol Oncol Res* **11**: 197-203, 2005.

- Koyanagi M, Haendeler J, Badorff C, Brandes RP, Hoffmann J, Pandur P, Zeiher AM, Kuhl M and Dimmeler S: Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of human circulating progenitor cells to cardiomyogenic cells. *J Biol Chem* **280**: 16838-42, 2005.
- Kuhl M: The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci* **9**: 967-74, 2004.
- Laatz Ju: Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows. *Springer Verlag, Heidelberg*, 2005.
- Lamlum H, Papadopoulou A, Ilyas M, Rowan A, Gillet C, Hanby A, Talbot I, Bodmer W and Tomlinson I: APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2225-8, 2000.
- Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, Ferrari M, Hernandez-Boussard T, Brooks JD and Pollack JR: Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* **67**: 8504-10, 2007.
- Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD and Pollack JR: Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 811-6, 2004.
- Latil A, Bieche I, Pesche S, Volant A, Valeri A, Fournier G, Cussenot O and Lidereau R: Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and RB1 status in human prostate cancer. *Hum Pathol* **30**: 809-15, 1999.
- Latil A and Lidereau R: Genetic aspects of prostate cancer. *Virchows Arch* **432**: 389-406, 1998.
- Lau WL and Scholnick SB: Identification of two new members of the CSMD gene family small star, filled. *Genomics* **82**: 412-5, 2003.
- Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D and Ashkenazi A: Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med* **7**: 383-5, 2001.
- Lawson DA and Witte ON: Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *J Clin Invest* **117**: 2044-50, 2007.
- Letellier G, Perez MJ, Yacoub M, Levillain P, Cussenot O and Fromont G: Epithelial phenotypes in the developing human prostate. *J Histochem Cytochem* **55**: 885-90, 2007.
- Leung HY, Dickson C, Robson CN and Neal DE: Over-expression of fibroblast growth factor-8 in human prostate cancer. *Oncogene* **12**: 1833-5, 1996.

- Li R, Sonik A, Stindl R, Rasnick D and Duesberg P: Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3236-41, 2000.
- Lind AJ, Wikstrom P, Granfors T, Egevad L, Stattin P and Bergh A: Angiopoietin 2 expression is related to histological grade, vascular density, metastases, and outcome in prostate cancer. *Prostate* **62**: 394-9, 2005.
- Lindmark F, Jonsson BA, Bergh A, Stattin P, Zheng SL, Meyers DA, Xu J and Gronberg H: Analysis of the macrophage scavenger receptor 1 gene in Swedish hereditary and sporadic prostate cancer. *Prostate* **59**: 132-40, 2004.
- Liu W, Youn HD, Zhou XZ, Lu KP and Liu JO: Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl cis-trans isomerase Pin1. *FEBS Lett* **496**: 105-8, 2001.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W and Deetz K: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **4**: 357-62, 1995.
- Loeb LA: Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* **51**: 3075-9, 1991.
- Luo J, Duggan DJ, Chen Y, Sauvageot J, Ewing CM, Bittner ML, Trent JM and Isaacs WB: Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res* **61**: 4683-8, 2001.
- MacFarlane M: TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol Lett* **139**: 89-97, 2003.
- Macoska JA, Trybus TM, Benson PD, Sakr WA, Grignon DJ, Wojno KD, Pietruk T and Powell IJ: Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res* **55**: 5390-5, 1995.
- Macoska JA, Trybus TM and Wojno KJ: 8p22 loss concurrent with 8c gain is associated with poor outcome in prostate cancer. *Urology* **55**: 776-82, 2000.
- Malmstrom PU: Lymph node staging in prostatic carcinoma revisited. *Acta Oncol* **44**: 593-8, 2005.
- Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, Sole F, Rubio-Moscardo F, Terol MJ, Climent J, Sarsotti E, Tormo M, Andreu E, Salido M, Ruiz MA, Prosper F, Siebert R, Dyer MJ and Garcia-Conde J: Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* **98**: 3479-82, 2001.
- Marx J: Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* **297**: 544-6, 2002.

- Masayeva BG, Ha P, Garrett-Mayer E, Pilkington T, Mao R, Pevsner J, Speed T, Benoit N, Moon CS, Sidransky D, Westra WH and Califano J: Gene expression alterations over large chromosomal regions in cancers include multiple genes unrelated to malignant progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8715-20, 2004.
- Matsuura H, Shiraishi T, Yatani R and Kawamura J: Interphase cytogenetics of prostate cancer: fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis of Japanese cases. *Br J Cancer* **74**: 1699-704, 1996.
- Matsuyama H, Oba K, Matsuda K, Yoshihiro S, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiya K, Takei M, Yamaguchi A, Sasaki K and Naito K: Haploinsufficiency of 8p22 may influence cancer-specific survival in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **174**: 24-34, 2007.
- Matsuyama H, Pan Y, Oba K, Yoshihiro S, Matsuda K, Hagarth L, Kudren D, Naito K, Bergerheim US and Ekman P: Deletions on chromosome 8p22 may predict disease progression as well as pathological staging in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **7**: 3139-43, 2001.
- Matsuyama H, Pan Y, Oba K, Yoshihiro S, Matsuda K, Hagarth L, Kudren D, Naito K, Bergerheim US and Ekman P: The role of chromosome 8p22 deletion for predicting disease progression and pathological staging in prostate cancer. *Aktuelle Urol* **34**: 247-9, 2003a.
- Matsuyama H, Pan Y, Yoshihiro S, Kudren D, Naito K, Bergerheim US and Ekman P: Clinical significance of chromosome 8p, 10q, and 16q deletions in prostate cancer. *Prostate* **54**: 103-11, 2003b.
- McCracken M, Olsen M, Chen MS, Jr., Jemal A, Thun M, Cokkinides V, Deapen D and Ward E: Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities. *CA Cancer J Clin* **57**: 190-205, 2007.
- McKenzie S and Kyprianou N: Apoptosis evasion: the role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *J Cell Biochem* **97**: 18-32, 2006.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A and Rao A: IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**: 860-6, 1997.
- Mickelson CA: Department of Health and Human Services National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. Minutes of meeting March 8-10, 2000. *Hum Gene Ther* **11**: 2159-92, 2000.
- Mizutani Y, Yoshida O, Miki T and Bonavida B: Synergistic cytotoxicity and apoptosis by Apo-2 ligand and adriamycin against bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* **5**: 2605-12, 1999.
- Nagane M, Huang HJ and Cavenee WK: The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* **6**: 191-7, 2001.

- Nelson PS: Predicting prostate cancer behavior using transcript profiles. *J Urol* **172**: S28-32; discussion S33, 2004.
- Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO and Schulz WA: DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol Ther* **5**: 993-1001, 2006.
- Newcomer LM, Stanford JL, Blumenstein BA and Brawer MK: Temporal trends in rates of prostate cancer: declining incidence of advanced stage disease, 1974 to 1994. *J Urol* **158**: 1427-30, 1997.
- Nguyen DM and Hussain M: The role of the mitochondria in mediating cytotoxicity of anti-cancer therapies. *J Bioenerg Biomembr* **39**: 13-21, 2007.
- Nomura AM and Kolonel LN: Prostate cancer: a current perspective. *Epidemiol Rev* **13**: 200-27, 1991.
- Nupponen N and Visakorpi T: Molecular biology of progression of prostate cancer. *Eur Urol* **35**: 351-4, 1999.
- Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P and Visakorpi T: Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* **153**: 141-8, 1998.
- Nupponen NN and Visakorpi T: Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microsc Res Tech* **51**: 456-63, 2000.
- Nusbaum C, Mikkelsen TS, Zody MC, Asakawa S, Taudien S, Garber M, Kodira CD, Schueler MG, Shimizu A, Whittaker CA, Chang JL, Cuomo CA, Dewar K, FitzGerald MG, Yang X, Allen NR, Anderson S, Asakawa T, Blechschmidt K, Bloom T, Borowsky ML, Butler J, Cook A, Corum B, DeArellano K, DeCaprio D, Dooley KT, Dorris L, 3rd, Engels R, Glockner G, Hafez N, Hagopian DS, Hall JL, Ishikawa SK, Jaffe DB, Kamat A, Kudoh J, Lehmann R, Lokitsang T, Macdonald P, Major JE, Matthews CD, Mauceli E, Menzel U, Mihalev AH, Minoshima S, Murayama Y, Naylor JW, Nicol R, Nguyen C, O'Leary SB, O'Neill K, Parker SC, Polley A, Raymond CK, Reichwald K, Rodriguez J, Sasaki T, Schilhabel M, Siddiqui R, Smith CL, Sneddon TP, Talamas JA, Tenzin P, Topham K, Venkataraman V, Wen G, Yamazaki S, Young SK, Zeng Q, Zimmer AR, Rosenthal A, Birren BW, Platzer M, Shimizu N and Lander ES: DNA sequence and analysis of human chromosome 8. *Nature* **439**: 331-5, 2006.
- Nwosu V, Carpten J, Trent JM and Sheridan R: Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Hum Mol Genet* **10**: 2313-8, 2001.
- Nyambo R, Cross N, Lippitt J, Holen I, Bryden G, Hamdy FC and Eaton CL: Human bone marrow stromal cells protect prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *J Bone Miner Res* **19**: 1712-21, 2004.

- Oba K, Matsuyama H, Yoshihiro S, Kishi F, Takahashi M, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiya K and Naito K: Two putative tumor suppressor genes on chromosome arm 8p may play different roles in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **124**: 20-6, 2001.
- Ogris E, Du X, Nelson KC, Mak EK, Yu XX, Lane WS and Pallas DC: A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **274**: 14382-91, 1999.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R and Dixit VM: An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**: 815-8, 1997.
- Pandur P, Maurus D and Kuhl M: Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays* **24**: 881-4, 2002.
- Paris PL, Andaya A, Fridlyand J, Jain AN, Weinberg V, Kowbel D, Brebner JH, Simko J, Watson JE, Volik S, Albertson DG, Pinkel D, Alers JC, van der Kwast TH, Vissers KJ, Schroder FH, Wildhagen MF, Febbo PG, Chinnaiyan AM, Pienta KJ, Carroll PR, Rubin MA, Collins C and van Dekken H: Whole genome scanning identifies genotypes associated with recurrence and metastasis in prostate tumors. *Hum Mol Genet* **13**: 1303-13, 2004.
- Parkin DM: Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* **2**: 533-43, 2001.
- Parkin DM, Laara E and Muir CS: Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* **41**: 184-97, 1988.
- Parkin DM, Pisani P and Ferlay J: Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* **80**: 827-41, 1999.
- Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, Scardino PT and Pearson JD: Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *Jama* **277**: 1445-51, 1997.
- Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI and Walsh PC: The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol* **150**: 110-4, 1993.
- Perner S, Schmidt FH, Hofer MD, Kuefer R and Rubin M: [TMPRSS2-ETS gene fusion in prostate cancer.]. *Urologe A* **46**: 754-760, 2007.
- Phillips JL, Hayward SW, Wang Y, Vasselli J, Pavlovich C, Padilla-Nash H, Pezullo JR, Ghadimi BM, Grossfeld GD, Rivera A, Linehan WM, Cunha GR and Ried T: The consequences of chromosomal aneuploidy on gene expression profiles in a cell line model for prostate carcinogenesis. *Cancer Res* **61**: 8143-9, 2001.
- Pienta KJ and Esper PS: Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med* **118**: 793-803, 1993.

- Platzer P, Upender MB, Wilson K, Willis J, Lutterbaugh J, Nosrati A, Willson JK, Mack D, Ried T and Markowitz S: Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. *Cancer Res* **62**: 1134-8, 2002.
- Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL and Brown PO: Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12963-8, 2002.
- Porkka KP, Tammela TL, Vessella RL and Visakorpi T: RAD21 and KIAA0196 at 8q24 are amplified and overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **39**: 1-10, 2004.
- Porkka KP and Visakorpi T: Molecular mechanisms of prostate cancer. *Eur Urol* **45**: 683-91, 2004.
- Pratap J, Lian JB, Javed A, Barnes GL, van Wijnen AJ, Stein JL and Stein GS: Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone. *Cancer Metastasis Rev* **25**: 589-600, 2006.
- Pritzker LB, Scatena M and Giachelli CM: The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell* **15**: 2834-41, 2004.
- Prowatke I, Devens F, Benner A, Grone EF, Mertens D, Grone HJ, Lichter P and Joos S: Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *Br J Cancer* **96**: 82-8, 2007.
- Quinn M and Babb P: Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* **90**: 162-73, 2002a.
- Quinn M and Babb P: Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: individual countries. *BJU Int* **90**: 174-84, 2002b.
- Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES and Golub TR: A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* **33**: 49-54, 2003.
- Ratcliffe MJ, Itoh K and Sokol SY: A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction. *J Biol Chem* **275**: 35680-3, 2000.
- Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A and Chinnaiyan AM: ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* **6**: 1-6, 2004.
- Sahadevan K, Darby S, Leung HY, Mathers ME, Robson CN and Gnanapragasam VJ: Selective over-expression of fibroblast growth factor receptors 1 and 4 in clinical prostate cancer. *J Pathol* **213**: 82-90, 2007.

- Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE and Crissman JD: The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* **150**: 379-85, 1993.
- Sanlioglu AD, Koksai IT, Ciftcioglu A, Baykara M, Luleci G and Sanlioglu S: Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues. *J Urol* **177**: 359-64, 2007.
- Santourlidis S, Florl A, Ackermann R, Wirtz HC and Schulz WA: High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate. *Prostate* **39**: 166-74, 1999.
- Santourlidis S, Warskulat U, Florl AR, Maas S, Pulte T, Fischer J, Muller W and Schulz WA: Hypermethylation of the tumor necrosis factor receptor superfamily 6 (APT1, Fas, CD95/Apo-1) gene promoter at rel/nuclear factor kappaB sites in prostatic carcinoma. *Mol Carcinog* **32**: 36-43, 2001.
- Sato K, Qian J, Slezak JM, Lieber MM, Bostwick DG, Bergstralh EJ and Jenkins RB: Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1574-80, 1999.
- Savinainen KJ, Linja MJ, Saramaki OR, Tammela TL, Chang GT, Brinkmann AO and Visakorpi T: Expression and copy number analysis of TRPS1, EIF3S3 and MYC genes in breast and prostate cancer. *Br J Cancer* **90**: 1041-6, 2004.
- Schalken JA, Bergh A, Bono A, Foster C, Gospodarowicz M, Isaacs WB, Rubin M, Schroder F, Tribukait B, Tsukamoto T and Wiklund P: Molecular prostate cancer pathology: current issues and achievements. *Scand J Urol Nephrol Suppl*: 82-93, 2005.
- Schmid H, Oberpenning F and Pummer K: Diagnosis and staging of prostatic carcinoma: what is really necessary? *Urol Int* **63**: 57-61, 1999.
- Schmidt U, Fuessel S, Haase M, Kraemer K, Meye A and Wirth MP: Quantification of C13orf19/P38IP mRNA expression by quantitative real-time PCR in patients with urological malignancies. *Cancer Lett* **225**: 253-60, 2005.
- Schonthal AH: Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett* **170**: 1-13, 2001.
- Schulz WA: Molecular Biology of Human Cancers. 2005.
- Schulz WA, Alexa A, Jung V, Hader C, Hoffmann MJ, Yamanaka M, Fritzsche S, Wlazlinski A, Muller M, Lengauer T, Engers R, Florl AR, Wullich B and Rahnenfuhrer J: Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol Cancer* **6**: 14, 2007.
- Schulz WA, Burchardt M and Cronauer MV: Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* **9**: 437-48, 2003.

- Schulz WA, Elo JP, Florl AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, Buchardt M, Seifert HH and Visakorpi T: Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **35**: 58-65, 2002.
- Schulz WA and Hatina J: Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med* **10**: 100-25, 2006.
- Sedger LM, Glaccum MB, Schuh JC, Kanaly ST, Williamson E, Kayagaki N, Yun T, Smolak P, Le T, Goodwin R and Gliniak B: Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol* **32**: 2246-54, 2002.
- Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R and Virshup DM: Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* **283**: 2089-91, 1999.
- Selley S, Donovan J, Faulkner A, Coast J and Gillatt D: Diagnosis, management and screening of early localised prostate cancer. *Health Technol Assess* **1**: i, 1-96, 1997.
- Severi G, Hayes VM, Padilla EJ, English DR, Southey MC, Sutherland RL, Hopper JL and Giles GG: The common variant rs1447295 on chromosome 8q24 and prostate cancer risk: results from an Australian population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**: 610-2, 2007.
- Shen MM and Abate-Shen C: Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev Dyn* **228**: 767-78, 2003.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P and Ashkenazi A: Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**: 818-21, 1997.
- Shetty S, Gladden JB, Henson ES, Hu X, Villanueva J, Haney N and Gibson SB: Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) up-regulates death receptor 5 (DR5) mediated by NFkappaB activation in epithelial derived cell lines. *Apoptosis* **7**: 413-20, 2002.
- Shivapurkar N, Toyooka S, Toyooka KO, Reddy J, Miyajima K, Suzuki M, Shigematsu H, Takahashi T, Parikh G, Pass HI, Chaudhary PM and Gazdar AF: Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. *Int J Cancer* **109**: 786-92, 2004.
- Simard J, Dumont M, Soucy P and Labrie F: Perspective: prostate cancer susceptibility genes. *Endocrinology* **143**: 2029-40, 2002.
- Singh AP, Bafna S, Chaudhary K, Venkatraman G, Smith L, Eudy JD, Johansson SL, Lin MF and Batra SK: Genome-wide expression profiling reveals transcriptomic variation and

perturbed gene networks in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Lett*, 2007.

- Singh AP, Bafna S, Chaudhary K, Venkatraman G, Smith L, Eudy JD, Johansson SL, Lin MF and Batra SK: Genome-wide expression profiling reveals transcriptomic variation and perturbed gene networks in androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Lett* **259**: 28-38, 2008.
- Singh D, Febbo PG, Ross K, Jackson DG, Manola J, Ladd C, Tamayo P, Renshaw AA, D'Amico AV, Richie JP, Lander ES, Loda M, Kantoff PW, Golub TR and Sellers WR: Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* **1**: 203-9, 2002.
- Sonnemann J, Gange J, Kumar KS, Muller C, Bader P and Beck JF: Histone deacetylase inhibitors interact synergistically with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce apoptosis in carcinoma cell lines. *Invest New Drugs* **23**: 99-109, 2005.
- Sontag E: Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal* **13**: 7-16, 2001.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P and Borresen-Dale AL: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10869-74, 2001.
- Stamey TA: Preoperative serum prostate-specific antigen (PSA) below 10 microg/l predicts neither the presence of prostate cancer nor the rate of postoperative PSA failure. *Clin Chem* **47**: 631-4, 2001.
- Steiner T, Junker K, Burkhardt F, Braunsdorf A, Janitzky V and Schubert J: Gain in chromosome 8q correlates with early progression in hormonal treated prostate cancer. *Eur Urol* **41**: 167-71, 2002.
- Stephan C, Cammann H, Meyer HA, Lein M and Jung K: PSA and new biomarkers within multivariate models to improve early detection of prostate cancer. *Cancer Lett* **249**: 18-29, 2007.
- Stingl J and Caldas C: Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* **7**: 791-9, 2007.
- Sun J, Liu W, Adams TS, Sun J, Li X, Turner AR, Chang B, Kim JW, Zheng SL, Isaacs WB and Xu J: DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *Prostate* **67**: 692-700, 2007.
- Sun PC, Uppaluri R, Schmidt AP, Pashia ME, Quant EC, Sunwoo JB, Gollin SM and Scholnick SB: Transcript map of the 8p23 putative tumor suppressor region. *Genomics* **75**: 17-25, 2001.

- Suzuki H, Emi M, Komiya A, Fujiwara Y, Yatani R, Nakamura Y and Shimazaki J: Localization of a tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. *Genes Chromosomes Cancer* **13**: 168-74, 1995.
- Suzuki M, Shigematsu H, Shivapurkar N, Reddy J, Miyajima K, Takahashi T, Gazdar AF and Frenkel EP: Methylation of apoptosis related genes in the pathogenesis and prognosis of prostate cancer. *Cancer Lett* **242**: 222-30, 2006.
- Takahashi S, Alcaraz A, Brown JA, Borell TJ, Herath JF, Bergstralh EJ, Lieber MM and Jenkins RB: Aneuploidies of chromosomes 8 and Y detected by fluorescence in situ hybridization are prognostic markers for pathological stage C (pT3N0M0) prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* **2**: 137-45, 1996.
- Thomas MA, Hodgson MC, Loermans SD, Hooper J, Endersby R and Bentel JM: Transcriptional regulation of the homeobox gene NKX3.1 by all-trans retinoic acid in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* **99**: 1409-19, 2006.
- Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ and Coltman CA, Jr.: Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $\leq$ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* **350**: 2239-46, 2004.
- Tolstykh T, Lee J, Vafai S and Stock JB: Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *Embo J* **19**: 5682-91, 2000.
- Tombal B, Weeraratna AT, Denmeade SR and Isaacs JT: Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin-dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells. *Prostate* **43**: 303-17, 2000.
- Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, Kalyana-Sundaram S, Wei JT, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB and Chinnaiyan AM: Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* **39**: 41-51, 2007.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA and Chinnaiyan AM: Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**: 644-8, 2005.
- Tomlins SA, Rubin MA and Chinnaiyan AM: Integrative biology of prostate cancer progression. *Annu Rev Pathol* **1**: 243-71, 2006.
- Topping N, Borre M, Sorensen KD, Andersen CL, Wiuf C and Orntoft TF: Genome-wide analysis of allelic imbalance in prostate cancer using the Affymetrix 50K SNP mapping array. *Br J Cancer* **96**: 499-506, 2007.

- Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C and Pandolfi PP: Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* **441**: 523-7, 2006.
- Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen KC, McLaughlin MM, Srinivasula SM, Livi GP, Marshall LA, Alnemri ES, Williams WV and Doyle ML: Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J Biol Chem* **275**: 23319-25, 2000.
- Tsafirir D, Bacolod M, Selvanayagam Z, Tsafirir I, Shia J, Zeng Z, Liu H, Krier C, Stengel RF, Barany F, Gerald WL, Paty PB, Domany E and Notterman DA: Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res* **66**: 2129-37, 2006.
- Tsuchiya N, Kondo Y, Takahashi A, Pawar H, Qian J, Sato K, Lieber MM and Jenkins RB: Mapping and gene expression profile of the minimally overrepresented 8q24 region in prostate cancer. *Am J Pathol* **160**: 1799-806, 2002.
- Valeri A, Azzouzi R, Drelon E, Delannoy A, Mangin P, Fournier G, Berthon P and Cussenot O: Early-onset hereditary prostate cancer is not associated with specific clinical and biological features. *Prostate* **45**: 66-71, 2000.
- van Dekken H, Alers JC, Damen IA, Vissers KJ, Krijtenburg PJ, Hoedemaeker RF, Wildhagen MF, Hop WC, van der Kwast TH, Tanke HJ and Schroder FH: Genetic evaluation of localized prostate cancer in a cohort of forty patients: gain of distal 8q discriminates between progressors and nonprogressors. *Lab Invest* **83**: 789-96, 2003.
- van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, Herman JG and Versteeg R: Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* **62**: 2157-61, 2002.
- Vanaja DK, Cheville JC, Iturria SJ and Young CY: Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression. *Cancer Res* **63**: 3877-82, 2003.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA and Chinnaiyan AM: The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**: 624-9, 2002.
- Varambally S, Yu J, Laxman B, Rhodes DR, Mehra R, Tomlins SA, Shah RB, Chandran U, Monzon FA, Becich MJ, Wei JT, Pienta KJ, Ghosh D, Rubin MA and Chinnaiyan AM: Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cancer Cell* **8**: 393-406, 2005.

- Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvanen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, Isola JJ and Kallioniemi OP: Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* **55**: 342-7, 1995.
- Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR and Linehan WM: Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res* **56**: 2411-6, 1996.
- Voeller HJ, Augustus M, Madike V, Bova GS, Carter KC and Gelmann EP: Coding region of NKX3.1, a prostate-specific homeobox gene on 8p21, is not mutated in human prostate cancers. *Cancer Res* **57**: 4455-9, 1997.
- Wajant H: TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitam Horm* **67**: 101-32, 2004.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC and Lynch DH: Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* **5**: 157-63, 1999.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF and Reed JC: Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**: 339-43, 1999.
- Wang L, McDonnell SK, Slusser JP, Hebring SJ, Cunningham JM, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ and Thibodeau SN: Two common chromosome 8q24 variants are associated with increased risk for prostate cancer. *Cancer Res* **67**: 2944-50, 2007.
- Wang Y, Engels IH, Knee DA, Nasoff M, Deveraux QL and Quon KC: Synthetic lethal targeting of MYC by activation of the DR5 death receptor pathway. *Cancer Cell* **5**: 501-12, 2004.
- Washburn JG, Wojno KJ, Dey J, Powell IJ and Macoska JA: 8pter-p23 deletion is associated with racial differences in prostate cancer outcome. *Clin Cancer Res* **6**: 4647-52, 2000.
- Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF, Jr. and Hampton GM: Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res* **61**: 5974-8, 2001.
- Wilson PJ, McGlinn E, Marsh A, Evans T, Arnold J, Wright K, Biden K, Young J, Wainwright B, Wicking C and Chenevix-Trench G: Sequence variants of DLC1 in colorectal and ovarian tumours. *Hum Mutat* **15**: 156-65, 2000.
- Wilson SS and Crawford ED: Screening for prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* **3**: 21-5, 2004.

- Wirth MP, Hakenberg OW and Frohner M: [Treatment of locally advanced prostate cancer]. *Urologe A* **44**: 1295-302, 2005.
- Wissmann C, Wild PJ, Kaiser S, Roepcke S, Stoehr R, Woenckhaus M, Kristiansen G, Hsieh JC, Hofstaedter F, Hartmann A, Knuechel R, Rosenthal A and Pilarsky C: WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* **201**: 204-12, 2003.
- Wolf M, Mousses S, Hautaniemi S, Karhu R, Huusko P, Allinen M, Elkahloun A, Monni O, Chen Y, Kallioniemi A and Kallioniemi OP: High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact of copy number on gene expression. *Neoplasia* **6**: 240-7, 2004.
- Wong CM, Yam JW, Ching YP, Yau TO, Leung TH, Jin DY and Ng IO: Rho GTPase-activating protein deleted in liver cancer suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **65**: 8861-8, 2005.
- Wu J, Tolstykh T, Lee J, Boyd K, Stock JB and Broach JR: Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits in vivo. *Embo J* **19**: 5672-81, 2000.
- Xu J, Zheng SL, Hawkins GA, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, Wiley KE, Chang B, Ewing CM, Bujnovszky P, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA and Isaacs WB: Linkage and association studies of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23. *Am J Hum Genet* **69**: 341-50, 2001.
- Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Chang B, Turner AR, Ewing CM, Wiley KE, Hawkins GA, Bleecker ER, Walsh PC, Meyers DA and Isaacs WB: Common sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet* **72**: 208-12, 2003.
- Xu J, Zheng SL, Komiya A, Mychaleckyj JC, Isaacs SD, Hu JJ, Sterling D, Lange EM, Hawkins GA, Turner A, Ewing CM, Faith DA, Johnson JR, Suzuki H, Bujnovszky P, Wiley KE, DeMarzo AM, Bova GS, Chang B, Hall MC, McCullough DL, Partin AW, Kassabian VS, Carpten JD, Bailey-Wilson JE, Trent JM, Ohar J, Bleecker ER, Walsh PC, Isaacs WB and Meyers DA: Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* **32**: 321-5, 2002.
- Yamada Y, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y, Suzuki H, Takagi A, Matsuzaki T, Sugimura Y, Yatani R and Shiraishi T: Aberrant methylation of the vascular endothelial growth factor receptor-1 gene in prostate cancer. *Cancer Sci* **94**: 536-9, 2003.
- Yamamoto H, Hinoi T, Michiue T, Fukui A, Usui H, Janssens V, Van Hoof C, Goris J, Asashima M and Kikuchi A: Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **276**: 26875-82, 2001.

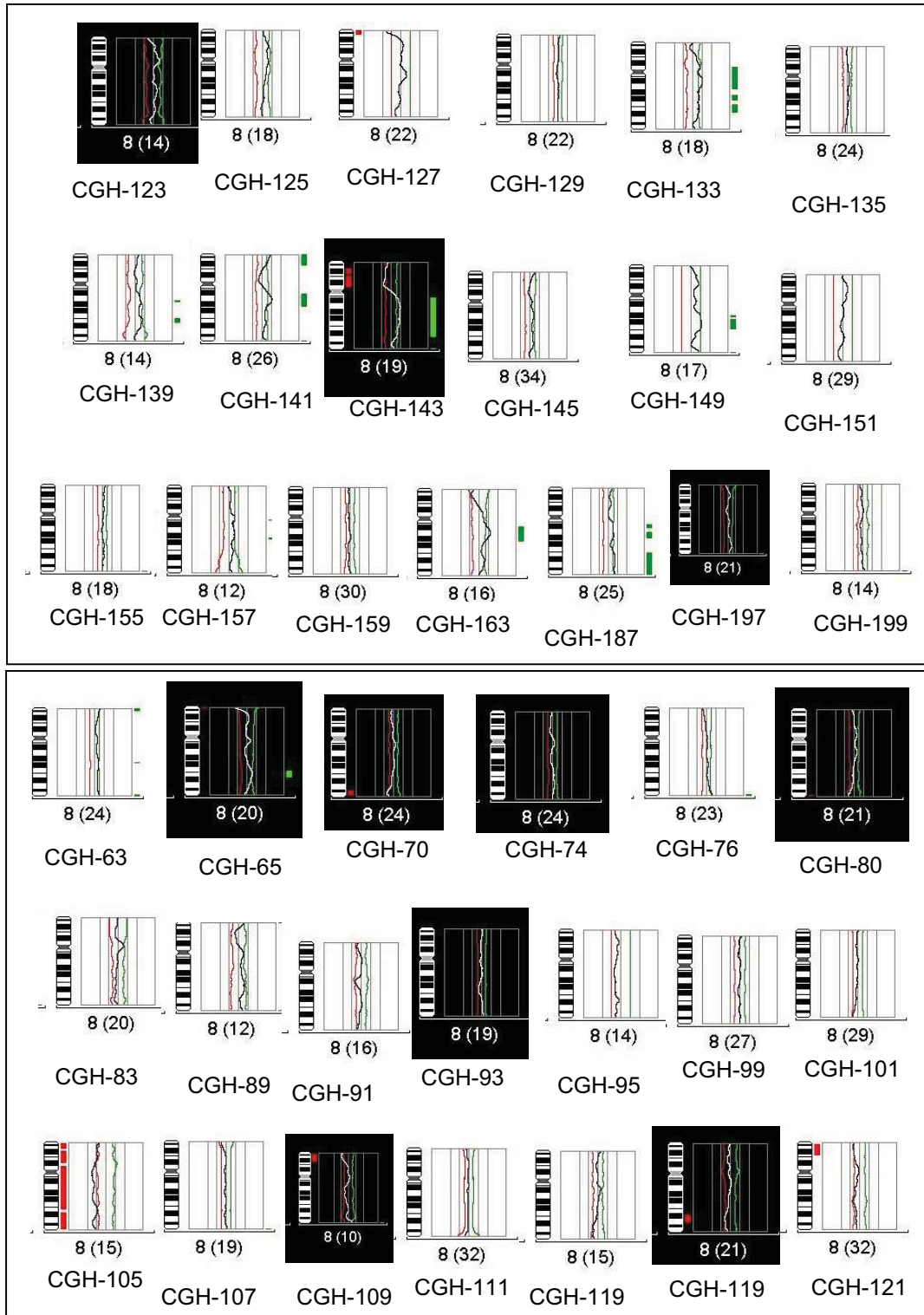
- Yu R, Mandlekar S, Ruben S, Ni J and Kong AN: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Res* **60**: 2384-9, 2000.
- Yu YP, Landsittel D, Jing L, Nelson J, Ren B, Liu L, McDonald C, Thomas R, Dhir R, Finkelstein S, Michalopoulos G, Becich M and Luo JH: Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol* **22**: 2790-9, 2004.
- Yuan BZ, Miller MJ, Keck CL, Zimonjic DB, Thorgeirsson SS and Popescu NC: Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res* **58**: 2196-9, 1998.
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M and Karin M: The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **91**: 243-52, 1997.
- Zhang L and Fang B: Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* **12**: 228-37, 2005.
- Zhao H, Kim Y, Wang P, Lapointe J, Tibshirani R, Pollack JR and Brooks JD: Genome-wide characterization of gene expression variations and DNA copy number changes in prostate cancer cell lines. *Prostate* **63**: 187-97, 2005.
- Zhou HJ, Yan J, Luo W, Ayala G, Lin SH, Erdem H, Ittmann M, Tsai SY and Tsai MJ: SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res* **65**: 7976-83, 2005.
- Zhou W, Goodman M, Lyles RH, Lim SD, Williams TY, Rusthoven KE, Mandel JS, Amin MB and Petros JA: Surgical margin and Gleason score as predictors of postoperative recurrence in prostate cancer with or without chromosome 8p allelic imbalance. *Prostate* **61**: 81-91, 2004.
- Zimonjic D, Brooks MW, Popescu N, Weinberg RA and Hahn WC: Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. *Cancer Res* **61**: 8838-44, 2001.
- Zitzelsberger H, Lehmann L, Werner M and Bauchinger M: Comparative genomic hybridisation for the analysis of chromosomal imbalances in solid tumours and haematological malignancies. *Histochem Cell Biol* **108**: 403-17, 1997.
- Zolnierowicz S: Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol* **60**: 1225-35, 2000.

7 A B K Ü R Z U N G E N

5-Aza-dC (AZA)	5-Aza-2'-Desoxycytidin
aCGH	Array basierte Coparative Genomic Hybridization
AI	Allelische Imbalance
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
Bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Ca	Karzinom
CD	cluster of differentiation
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CpG	Cytosin/Guanin-Dinukleotid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
FDR	False Discovery Rate
fwd	forward
g	Schleuderziffer bei der Zentrifugation
h	Stunde
kCGH	Konventionelle Coparative Genomic Hybridization
LINE	long interspersed nuclear element
LOH	Loss of Heterozygosity
Mb	Megabasen
min	Minute
PCa	Prostatakarzinom
PIN	Prostatische Intraepitheliale Neoplasie
PSA	Prostata Spezifisches Antigen
rev	reverse
RP	Radikale Prostatektomie
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamic-Acid
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TM	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
TSG	Tumorsuppressor-Gen
U	Unit

8 ERGÄNZENDE DATEN

8.1 CGH-Analyse



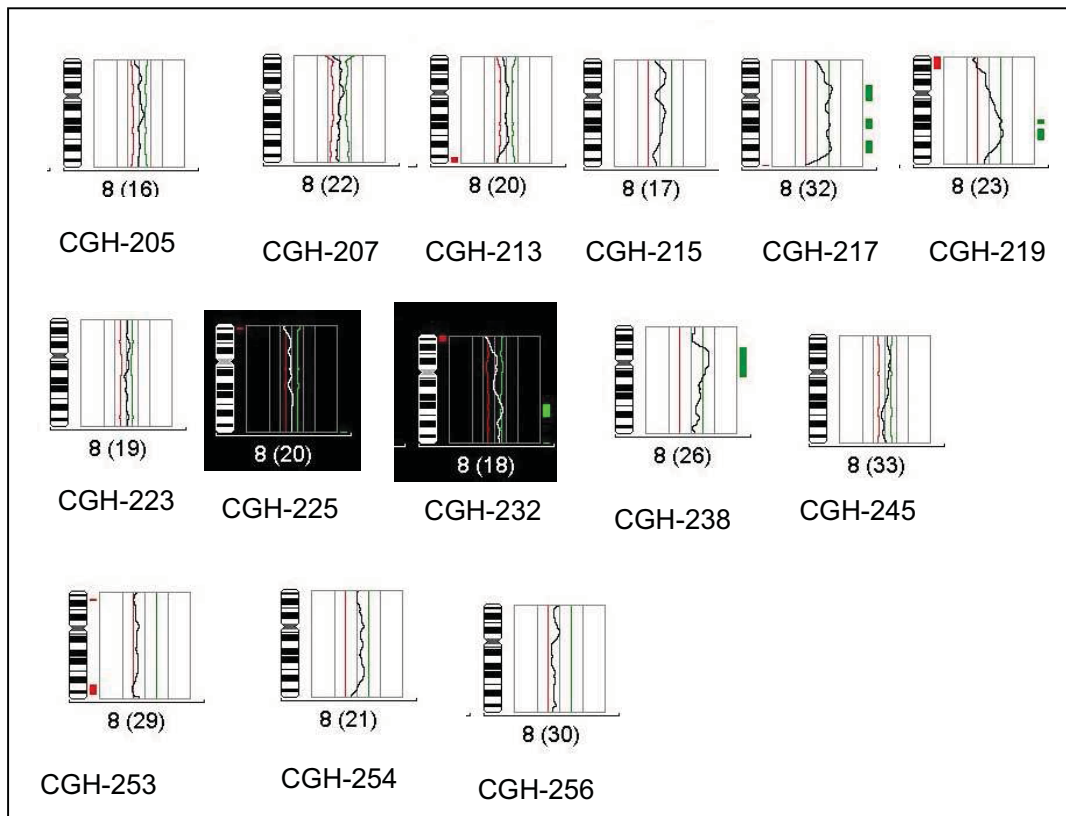


Abbildung 8.1-1 bis 8.1-3: Abgebildet ist jeweils ein schematisches Karyogramm von Chromosom 8. Rote und grüne Linien bilden die Grenzen (Cutoff) für signifikante Erniedrigung (rot) und Erhöhung (grün) der Kopienzahl. Die gewundene Linie dazwischen beschreibt das Dosisprofil der jeweiligen Probe. Bei Erreichen des Cutoff sind die betroffenen Chromosomenbereiche seitlich mit roten (entspricht Verlust) oder grünen (entspricht Zugewinn) Balken markiert. Die interne Tumorproben-Nummer stehen unter den jeweiligen Abbildungen mit dem Präfix „CGH“.

9 DANKSAGUNG

- Zuallererst gilt mein Dank meinen Eltern, Frau Gisela Hornstein und Herrn Dr. F. U. Hornstein für den warmen und liebevollen familiären Rückhalt, sowie Ihre Förderung und Unterstützung von Anbeginn bis zu diesem Ziel und darüber hinaus.
- Ich danke Herrn Prof. Dr. W. A. Schulz für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, das außerordentliche Engagement und die Herzlichkeit seiner Betreuung, sowie für die gewonnenen Einblicke in wissenschaftliches Arbeiten und molekularbiologische Forschung, die mich sehr geprägt haben.
- Herrn Prof. Dr. med. Harald Rieder danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft diese im Fachbereich Humangenetik zu vertreten. Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. Andreas Erhardt für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit.
- Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Michèle Hoffmann, die mich über den gesamten Zeitraum dieser Promotionsarbeit mit einem beispiellosen Engagement unterstützt hat, das auf gegenseitiger Wertschätzung beruht. Aus dieser Zusammenarbeit ist eine wunderbare Freundschaft erwachsen.
- Herrn Prof. Dr. R. Ackermann und nachfolgend Herrn Dr. V. Müller-Mattheis danke ich für die Möglichkeit zur Promotion im Forschungslabor der Urologischen Klinik, zur Teilnahme an nationalen Kongressen und für ihre stete Diskussionsbereitschaft.
- Herrn Prof. Dr. Jörg Rahnenführer und Herrn Adrian Alexa danke ich für die Korrespondenz und Unterstützung bei der Lösung und Berechnung statistischer Fragestellung und der Aufbereitung und Bereitstellung der Array-Daten.
- Herrn Prof. Bernd Wullich und Herrn Dr. Volker Jung danke ich für Durchführung und Bereitstellung der Daten aus der CGH-Analyse.
- Allen medizinischen Kolleginnen und Kollegen der Urologischen Klinik sei gedankt für ihre Mühe bei der Bereitstellung von Blut- und Gewebeproben. Herrn Dr. Mirco Müller danke ich für die Unterstützung der Arbeit von klinischer Seite sowie bei den statistischen Analysen.
- Meinen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe, Frau Dr. A. Linnemann-Florl, Frau A. Meyer, Herrn Dr. M.V. Cronauer, Herrn Dr. F. Windhofer und Herrn Dr. J. Hatina danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und kollegiale Zusammenarbeit. Frau C. Hader, Frau Dipl.-Biol. S. Fritzsche und Herrn Masanori Yamanaka zusätzlich für die Bereitstellung der von ihnen im Zusammenhang dieser Arbeit erhobenen Daten.
- Zu guter Letzt möchte ich besonders meiner Schwester Henriette Hornstein, sowie meinen engsten Freunden danken, die mir in den vergangenen Jahren die Treue gehalten haben. Hervorheben möchte ich meine langjährige Lebensgefährtin, Frau Dipl. Soz. Päd. Daniela Rönne, die mir zu jeder Zeit auf eine so liebevolle und herzliche Art mit Verständnis, Unterstützung und Loyalität zur Seite gestanden hat, wie es einen ganz besonderen Menschen auszeichnet.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

geboren am 01.04.1980 in Neuss Deutschland
ledig

Berufsausbildung

01.2008 Assistenzarzt Inneren Medizin, St. Franziskus Krankenhaus
Kliniken Maria Hilf, Mönchengladbach

2000-2007 Studium der Humanmedizin
an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf :

06.2007 Erlangung der Approbation als Arzt

04.2007 3. Staatsexamen, Note: 1,99

09.2005 2. Staatsexamen, Note: 1,66

02.2004 Beginn der experimentellen Doktorarbeit, Urologische
Klinik der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

08.2003 1. Staatsexamen, Note: 3,00

09.2002 Physikum, Note: 3,00

1999-2000 Wehrdienst Budel/Köln-Wahn

Schulbildung

1991-1999 Cecilien-Gymnasium Düsseldorf,
Abitur-Notendurchschnitt 1,30

1987-1991 Gebrüder-Grimm Grundschule Meerbusch

Düsseldorf, 18.04.2008

Max Hornstein

ABSTRACT / ZUSAMMENFASSUNG

Chromosom 8 ist während der Tumorgenese des Prostatakarzinoms überdurchschnittlich häufig von chromosomalen Aberrationen betroffen. Sequenzverluste des kurzen Arms 8p stehen besonders in frühen Entwicklungsstufen im Vordergrund. Daher vermutet man in diesem Genomabschnitt Gene, deren Funktionsverlust relevant für die Pathogenese des Prostatakarzinoms ist (Tumorsuppressor-Gene). Bis jetzt konnte aber noch keinem Gen auf Chromosom 8p eine entscheidende Bedeutung zugewiesen werden. Gründe hierfür sind offenbar die molekularbiologische Heterogenität dieser Erkrankung und methodische Verfahren, die dieser Heterogenität nicht gerecht werden. Besonders unklar ist, wie sich Kopienzahlverlusten durch chromosomale Aberrationen auf das Expressionsniveau betroffener Gene auswirken.

Daher wurde in dieser Arbeit zunächst eine LOH-Analyse mit sieben Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 8p an 51 M0 Prostatakarzinomen durchgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Korrelation des Auftretens allelischer Imbalancen in Form von LOH mit prognostisch ungünstigen Gleasonsummen, sowie mit einer Tendenz zur Entwicklung von Lymphknotenmetastasen. Im Anschluss wurde mittels quantitativer RT-PCR die Expression von ausgewählten Kandidatengenen auf Chromosom 8p an einer Gruppe von 45 M0 Karzinom- und 13 Normalgewebeprobe gemessen. Dabei lieferte die Analyse der klassischen Kandidatengene (DLC1, FGFR1, CSMD1, NKX3.1) überraschende Ergebnisse, denn DLC1 und NKX3.1 zeigten sich in Tumorgewebe überexprimiert, wobei die Hochregulation von NKX3.1 zusätzlich mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall korrelierte. Unter den anderen Genen, die zum Teil aufgrund einer differentiellen Expression in einer von uns durchgeführten Microarray-Studie ausgewählt wurden (MSR1, ANGPT2, PPP2CB, PPP3CC, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG), waren Proteinphosphatasen (PPP2CB, PPP3CC) und TRAIL-Decoy-Rezeptoren (DcR1, DcR2) in Tumorgeweben stark herunterreguliert. Bei allen vier Genen fand sich ein Zusammenhang des erniedrigten Expressionsniveaus mit dem Auftreten allelischer Imbalancen. Ferner liegen PPP3CC, DcR1 und DcR2 in einer kürzlich definierten engeren Konsensusregion auf 8p21.3, die sowohl im sporadischen, als auch hereditären Prostatakarzinom sehr häufig deletiert ist. Niedrige Expressionswerte von DcR1, PPP3CC und OPG korrelierten des Weiteren mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall. Der Frage, ob die Herunterregulation der beiden Decoyrezeptoren epigenetisch bedingt war, wurde mittels MS-PCR (DcR1, DcR2) und Bisulfitssequenzierung (DcR2) nachgegangen. Dabei zeigte sich eine verstärkte, aber meist unvollständige Methylierung der Promotorregionen. In den abschließenden funktionellen Analysen (MTT-, Apoptose-Assay) konnten entsprechend auch keine synergistischen Effekte zwischen TRAIL-Wirkung und Hemmern der epigenetischen Regulation (5-Aza-2'-Desoxycytidin, Suberoylanilid-Hydroxaminsäure) festgestellt werden.

Zusammenfassend bestätigen diese Daten die prognostische Relevanz von 8p-Verlusten im Prostatakarzinom. Der Zusammenhang mit Expressionsveränderungen in diesem Bereich gelegener Gene ist jedoch nicht immer eindeutig (NKX3.1, DLC1). Dies wirft zum einen die Frage nach methodisch bedingten Variablen, zum anderen nach Regulatoren der Transkriptionskontrolle abseits von Kopienzahlveränderungen auf. Trotz dieser Problematik lassen sich genetische Verluste der Region 8p21.3 als besonders relevant identifizieren, da sie drei Gene enthält (PPP3CC, DcR1, DcR2), deren Herunterregulation mit einer ungünstigen Prognose des Prostatakarzinoms einhergeht. In diesem Zusammenhang stellte sich die Funktion der beiden TRAIL-Decoy-Rezeptoren als komplex dar. Daher sollte auch die Anwendung von TRAIL als generell selektiv-antitumorös wirkendes Chemotherapeutikum kritisch bedacht werden.

Prof. Dr. rer. nat. W. A. Schulz