

Aus der Urologischen Klinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Albers

**Veränderungen in der Expression von Fibulinen und anderen Proteinen der  
extrazellulären Matrix im Prostatakarzinom**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

AGNES WLAZLINSKI

**2009**

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

gez.:

Referent: Prof. Dr. W. A. Schulz

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Engers

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

<b>1</b>	<b><i>EINLEITUNG</i></b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Das Prostatakarzinom</b> .....	<b>1</b>
1.2	<b>Genetische und epigenetische Mechanismen bei der Entwicklung des Prostatakarzinoms</b> <b>4</b>	
1.3	<b>Die extrazelluläre Matrix</b> .....	<b>8</b>
1.3.1	Basalmembran .....	9
1.3.2	Veränderungen der extrazellulären Matrixkomponenten im Prostatakarzinom .....	10
1.3.3	Elastische Fasern .....	11
1.4	<b>Die Proteinfamilie der Fibuline</b> .....	<b>12</b>
1.5	<b>Tenascin-C</b> .....	<b>15</b>
1.6	<b>Testican-1 und Egr-1</b> .....	<b>17</b>
1.7	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b><i>MATERIAL UND METHODEN</i></b> .....	<b>21</b>
2.1	<b>Verwendete Zelllinien</b> .....	<b>21</b>
2.1.1	Prostatakarzinom-Zelllinien .....	21
2.1.2	Harnblasenkarzinom-Zelllinien.....	21
2.2	<b>Gewebeproben</b> .....	<b>21</b>
2.3	<b>Chemikalien</b> .....	<b>23</b>
2.4	<b>Enzyme</b> .....	<b>24</b>
2.5	<b>Antikörper</b> .....	<b>24</b>
2.6	<b>Plasmide</b> .....	<b>24</b>
2.7	<b>E. coli-Stämme</b> .....	<b>24</b>
2.8	<b>Molekularbiologische Kits</b> .....	<b>25</b>
2.9	<b>Bakterienmedien, autoklaviert</b> .....	<b>25</b>
2.10	<b>Standardlösungen</b> .....	<b>25</b>
2.11	<b>Lösungen für Western-Blot-Analyse</b> .....	<b>26</b>
2.11.1	Lysis-Puffer .....	26
2.11.2	Trenngel und Sammelgel.....	26
2.11.3	Pufferlösungen .....	27
2.11.4	Antikörperlösungen .....	27
2.12	<b>Lösungen für Immuncytochemie</b> .....	<b>27</b>
2.13	<b>Spezielle Materialien und Geräte</b> .....	<b>28</b>
2.14	<b>Software</b> .....	<b>28</b>
2.14.1	Programme .....	28
2.14.2	Datenbanken.....	29

<b>2.15</b>	<b>Oligonukleotidprimer</b> .....	<b>29</b>
<b>2.16</b>	<b>Umgang mit Bakterienzellen</b> .....	<b>29</b>
2.16.1	Bakterienkulturen .....	29
2.16.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	29
<b>2.17</b>	<b>Klonierung</b> .....	<b>30</b>
2.17.1	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA .....	30
2.17.2	Klonierung von PCR-Produkten .....	30
2.17.3	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren .....	30
<b>2.18</b>	<b>RNA-Isolierung aus Zelllinien</b> .....	<b>31</b>
<b>2.19</b>	<b>Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren</b> .....	<b>31</b>
<b>2.20</b>	<b>RT-PCR</b> .....	<b>31</b>
2.20.1	Reverse Transkription.....	31
2.20.2	Qualitative PCR.....	32
2.20.2.1	ThermoCycler-PCR.....	32
2.20.3	Quantitative real-time PCR .....	33
2.20.3.1	TaqMan-PCR.....	33
2.20.3.2	Genkopienzahlbestimmung .....	35
<b>2.21</b>	<b>Western-Blot-Analyse</b> .....	<b>37</b>
2.21.1	Präparation von Proteinlysaten .....	37
2.21.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	37
2.21.3	Protein Blot.....	38
2.21.4	Immundetektion.....	38
<b>2.22</b>	<b>Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression in Geweben</b> .....	<b>39</b>
<b>2.23</b>	<b>Immuncytochemische Analyse von Proteinexpressionen</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Expressionsanalyse der Kandidatengene</b> .....	<b>40</b>
3.1.1	Die Fibulin-Gene <i>FBLN1C</i> , <i>FBLN1D</i> , <i>FBLN4</i> und <i>FBLN5</i> .....	40
3.1.2	Das Testican-1-Gen <i>SPOCK1</i> und Tenascin-C-Gen <i>TENC</i> .....	41
<b>3.2</b>	<b>Genkopienzahl von <i>FBLN1</i>, <i>SPOCK1</i> und <i>EGR1</i></b> .....	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>Korrelation mit klinischen Parametern</b> .....	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Expression und Regulation der Fibulin-Gene in Prostatakarzinom-Zelllinien</b> .....	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Untersuchung der DNA-Methylierung der <i>FBLN4</i>-Promotorregion</b> .....	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Einfluss eines Androgens auf die Expression der Fibulin-Gene</b> .....	<b>48</b>
<b>3.7</b>	<b>Westernblotanalyse der Fibulinexpression in Prostatakarzinom-Zelllinien</b> .....	<b>49</b>
<b>3.8</b>	<b>Verteilung von Fibulin-1 und Fibulin-5 im Prostatagewebe</b> .....	<b>50</b>
<b>3.9</b>	<b>Immuncytochemische Analyse</b> .....	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Grundsätzliche Überlegungen zum Kontext der Arbeit</b> .....	<b>55</b>

4.2	Verminderte Expression aller Fibulingene .....	55
4.3	Epigenetische Rolle bei der Expression der Fibulin-Gene .....	56
4.4	Expression von <i>SPOCK1</i> und <i>TENC</i> .....	57
4.5	Lokalisation von Fibulin-1 und Fibulin-5 im Prostatagewebe .....	59
4.6	Androgenwirkungen auf Expression der Fibulin-Gene .....	61
4.7	Expression von Fibulinproteinen und mögliche Prozessierung .....	61
4.8	Ursachen veränderter Expression .....	62
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>83</b>
7.1	Allgemeine Abkürzungen .....	83
7.2	Genbezeichnungen.....	84
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>85</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist in Deutschland mit geschätzten 58.500 Neuerkrankungen pro Jahr vor dem kolorektalen Karzinom und dem Bronchialkarzinom die häufigste Krebserkrankung beim Mann [Robert Koch Institut, Krebs in Deutschland, 6. Ausgabe 2008]. Für etwa 20% der bösartigen Tumorerkrankungen bei Männern ist das Prostatakarzinom verantwortlich [Rohde et al., 2007], jedoch treten nur 10% der Prostatakarzinome vor dem 60. Lebensjahr auf. Das Erkrankungsalter liegt im Mittel bei 70 Jahren.

Etwa 11.000 Männer versterben jährlich in Deutschland am Prostatakarzinom, wobei das mittlere Sterbealter bei 78 Jahren liegt. Seit den 1990er Jahren, nach Einführung des PSA-Screenings, ist die Sterblichkeit am Prostatakarzinom gering rückläufig, während die Inzidenz angestiegen ist [Stephenson, 2002].

Adenokarzinome stellen mit ca. 97% den größten Teil der malignen Tumore der Prostata. Ihre Entstehung aus entarteten Drüsenzellen ist primär androgenabhängig. Sie entwickeln sich meist aus den Drüsenepithelien der peripheren Zone (60-70%), seltener im Bereich der Transitional- (10-20%) und der zentralen Zone (5-10%) (Abbildung 1). Die dadurch bedingte späte Kompression der Urethra erklärt die geringe Symptomatik zu Beginn der Krankheit. Die benigne Prostatahyperplasie (BPH) entsteht in der Transitionalzone.

**Abbildung 1 Prostatazonen mit mikroskopischer Gewebedarstellung**

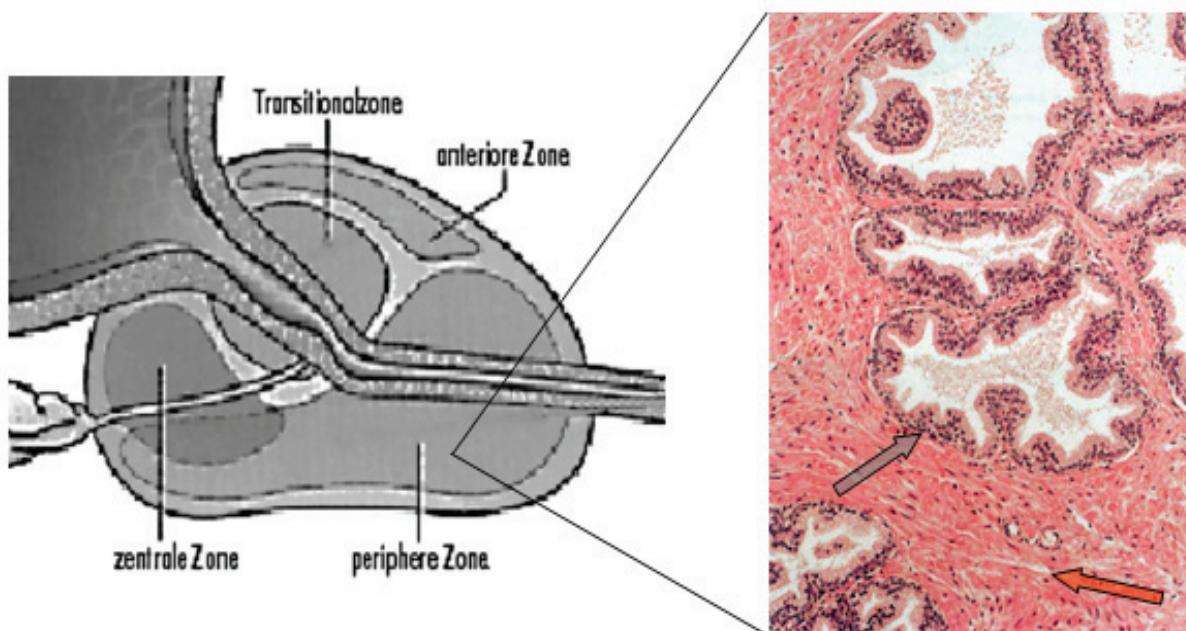


Abbildung 1: links: Zoneneinteilung der Prostata [McNeal, 1980]: [modifiziert aus J. Sökeland, Urologie für Pflegeberufe, 7. Auflage, Thieme 2000]. Transitionalzone: umgibt die proximale Urethra; periphere Zone: häufigster Ursprungsort der Prostatakarzinome; rechts: mikroskopische Darstellung des Prostatagewebes [modifiziert aus Welsch, Sobotta Histologie, 5. Auflage, Urban & Schwarzenberg 1997]. Grauer Pfeil: Ein- bis zwei-reihiges hochprismatisches Drüsenepithel, Entstehungsort des Prostatakarzinoms; roter Pfeil: Stroma mit glatten Muskelzellen, Kollagen- und elastischen Fasern.

Die prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN) ist die wichtigste Vorstufe des invasiven Prostatakarzinoms. Unter PIN werden dysplastische Veränderungen des sekretorischen Epithels in vorbestehenden Drüsen und Gangstrukturen der Prostata verstanden. Derzeit wird zwischen low-grade PIN und high-grade PIN (HGPIN) unterschieden [Bostwick 1992]. Klinisch von Bedeutung ist die high grade PIN-Läsion, die eine häufige Assoziation mit einem Prostatakarzinom aufweist [Sakr und Partin, 2001].

Einige Prostatakarzinome sind multifokal, können verschiedene Differenzierungsgrade aufweisen und zeigen somit eine ausgeprägte Heterogenität. So können in einer Prostata verschiedene Herde mit Karzinom und PIN vorliegen, die in dem Grad der zellulären Dysplasie, der Gewebedesorganisation sowie den genetischen Veränderungen variieren.

Die Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation der „Union internationale contre le cancer“ (UICC). Dabei beschreibt T (Tumor) die Ausdehnung des Primärtumors, N (Nodus) das Fehlen bzw. das Vorhandensein regionärer Lymphknotenmetastasen und M (Metastase) das mögliche Auftreten von Fernmetastasen. Aktuell wird nach der TNM-Klassifikation 2002 kategorisiert (Tabelle 1). Da die in dieser Arbeit untersuchten Proben im Zeitraum vor 2002 aserviert wurden, sind sie nach der damals gültigen, leicht abweichenden Klassifikation von 1997 eingeteilt worden.

**Tabelle 1 TNM-Klassifikation der UICC (6. Aufl.) 2002**

<b>TNM 2002</b>	
<b>Primärtumor</b>	
TX	Keine Beurteilung möglich
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor
T1a	Zufälliger histologischer Tumornachweis in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Zufälliger histologischer Tumornachweis in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Biopsie diagnostiziert
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappen oder weniger
T2b	Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappen
T2c	Tumor infiltriert in beide Lappen
T3	Überschreitung der Organkapsel durch den Tumor
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung
T3b	Samenblaseninfiltration
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen
<b>Regionäre Lymphknoten</b>	
NX	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionalen Lymphknoten befallen
N1	Regionaler Lymphknotenbefall
<b>Fernmetastasen</b>	
Mx	Nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden



Im Stadium T1 handelt es sich um histologisch zufällig entdeckte Prostatakarzinome. Im T2-Stadium ist der Tumor auf die Prostata begrenzt, im Stadium T3 erfolgt der Durchbruch durch die Prostatakapsel und die Infiltration des umliegenden Gewebes. Im T4-Stadium liegt eine Tumordinfiltration in benachbarte Organe vor, beispielsweise in den Harnblasenhals, die Beckenwand oder das Rektum. Das tumorspezifische Überleben bei nicht palpablen T1-Tumoren wird mit 17 Jahren und für Stadium T2 mit 11,7 Jahren angegeben [Horan und McGehee, 2000].

Für die Tumordifferenzierung (Grading) gibt es beim Prostatakarzinom mehrere Einteilungssysteme. Nach WHO erfolgt die Aufteilung in Grad 1, 2 und 3 (hoch-, mäßig-, geringgradig differenziertes Adenokarzinom).

Die international verbreitete Einteilung nach Gleason beruht auf der Bewertung des strukturellen Wachstumsmusters des Tumors unter Berücksichtigung der unterschiedlich differenzierten Drüsenstruktur. Das Muster wird mit Punkten von 1 (sehr gut differenziert) bis 5 (sehr niedrig differenziert) bewertet. Da sich in einem Tumor meist mehrere Wachstumsmuster nebeneinander nachweisen lassen, werden diejenigen bewertet, die den häufigsten und zweithäufigsten Anteil des Karzinoms ausmachen und ihre Punktzahlen addiert. Daraus ergeben sich Bewertungsziffern von 2 (1+1) bis 10 (5+5), der so genannte Gleason-Score (2-4, gut differenziert; 5-7 mäßig differenziert; 8-10 undifferenziert). Heute werden Karzinome mit Gleason-Score 8-10 als Hochrisikotumore angesehen, solche mit  $\leq 6$  als Niedrigisikofälle, soweit keine anderen Indizien für eine aggressive Tumorform vorliegen [Thompson et al., 2007].

Die Ursache des Prostatakarzinoms ist nur teilweise geklärt. Zu den gesicherten Risikofaktoren zählen steigendes Lebensalter, familiäre Vorbelastung mit bis zu vierfachem Risiko, wenn ein Verwandter ersten Grades am Prostatakarzinom erkrankt [Schulz und Hatina, 2006], sowie ethnische Herkunft. Dabei ist eine besonders niedrige Prostatakarzinom-Inzidenz bei Asiaten und die höchste bei Nordamerikanern afrikanischer Abstammung zu beobachten. Bei immigrierten Japanern in die USA konnte jedoch ein Anstieg des Prostatakarzinom-Risikos innerhalb einer Generation nachgewiesen werden [Shimizu et al., 1991]. Die Gründe für die ethnischen Unterschiede sind wahrscheinlich auf Umweltfaktoren (Ernährung, Exposition karzinogener Substanzen), sowie genetische Faktoren zurückzuführen. Hierbei könnten genetische Polymorphismen metabolischer Enzyme, beispielsweise Glutathion-S-Transferasen, eine wichtige Rolle spielen (vgl. 1.2).

Die Früherkennung des Prostatakarzinoms im asymptomatischen Stadium ist von entscheidender medizinischer Bedeutung, da die überwiegend in der peripheren Zone der Prostata entstehenden Karzinome zunächst meist symptomlos wachsen. Bei fortgeschrittenen Tumoren kann es häufig zu einer schleichenden Entwicklung einer Obstruktion der Harnwege oder zum Organ überschreitenden Wachstum kommen, mit Symptomen wie Harndrang, Dysurie und Hämaturie. Bei Vorliegen von Skelettmetastasen können Rückenschmerzen und Ischialgie hinzukommen.

Zur Früherkennung des Prostatakarzinoms werden das Prostata-spezifische Antigen (PSA) und die digitale rektale Untersuchung (DRU) eingesetzt. PSA ist der wichtigste Tumormarker aus der Kallikrein-Familie und ist nicht tumor-, aber organspezifisch. Erhöhte PSA-Werte können auch bei BPH zu finden sein und die Werte tendieren generell zu einer Erhöhung im Laufe des Alters. Umgekehrt können auch erniedrigte PSA-Werte von Prostatakarzinomen stammen, die nur sehr wenig PSA sezernieren und nicht detektiert werden. Daraus ergibt sich ein enormer PSA-Graubereich. Zur besseren Unterscheidung zwischen Prostatakarzinom und BPH ist der PSA-Quotient (F/T-PSA) hilfreich. Der PSA-Quotient berechnet sich aus dem freien, nicht gebundenen PSA (F-PSA) und totalem PSA (T-PSA). F-PSA bildet den kleineren Teil

des PSA im Serum (10-30% des T-PSA), die größere Fraktion des PSA liegt proteingebunden vor (70-90%). Die Bestimmung des PSA-Quotienten ist dann sinnvoll, wenn das T-PSA grenzwertig ist. Je nach Alter und Methode liegt die untere Grenze dieses Graubereiches zwischen 2-4 ng/l, die obere zwischen 10-20 ng/l. Beim PSA-Quotienten von  $<0,15$  ist eine Malignität wahrscheinlich [Thomas, 2007].

Bei suspektem Tastbefund und PSA über 4 ng/ml wird zur definitiven Diagnosestellung eine Prostatabiopsie mittels transrektalen Ultraschall (TRUS) empfohlen. Die positive Biopsierate bei Patienten mit erhöhtem PSA-Wert und/oder suspekter DRU liegt derzeit bei nur 20-25% [Frauscher et al., 2003].

Um eine genauere frühzeitige Diagnose des Prostatakarzinoms zu stellen, werden dringend neue und klinisch relevante Biomarker benötigt, die für die Ergänzung des PSA-Werts hilfreich sein können. Bisher wurden zahlreiche vielversprechende Prostatakarzinom-Biomarker wie *PCA3* (prostate cancer gene 3) und *TMPRSS2:ERG*-Fusion (vgl. 1.2) identifiziert. *PCA3* ist hochspezifisch für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms und steht für die molekulare Urindiagnostik zur Verfügung. Sein Nachweis kann zusätzlich zum PSA über die Entscheidung zu einer Rebiopsie hilfreich sein [Schalken, 2006].

Über die therapeutischen Maßnahmen entscheiden das Tumorstadium, der Differenzierungsgrad, der Allgemeinzustand sowie das Alter des Patienten. Beim klinisch lokal begrenzten Prostatakarzinom erfolgt zur kurativen Therapie eine radikale Prostatektomie oder Bestrahlung. Ein PSA-Anstieg nach radikaler Prostatektomie ist der früheste Hinweis auf ein Tumorrezidiv oder eine Metastasierung und tritt in 15-30% der Fälle beim klinisch lokalisierten Prostatakarzinom auf [Pound et al., 1999].

Das „watchful waiting“ ist die langfristige Beobachtung von Patienten, die wegen ihres Alters und/oder ihrer Komorbidität von einer primären kurativen Behandlung keinen Nutzen erwarten können. Kommt es später zu den Symptomen einer Progression, können sie palliativ bestrahlt oder durch Androgenentzug behandelt werden.

Beim disseminierten fortgeschrittenen Prostatakarzinom wird die Hormonabhängigkeit der Karzinomzellen durch Hormonentzug, beispielsweise nach Orchiektomie oder durch medikamentöse Applikation synthetischer Antiandrogene, therapeutisch genutzt. Bei einer solchen Therapie wird die androgene Signalkette unterbrochen, was zur Induktion der Apoptose hormonabhängiger Zellen führt [Tang und Porter, 1997]. Leider werden die Karzinome während des Androgenentzugs regelmäßig hormonrefraktär und werden in der Folge progressiv. Dabei scheint der Androgenrezeptor in den meisten Fällen eine Schlüsselrolle zu spielen (vgl. 1.2).

## **1.2 Genetische und epigenetische Mechanismen bei der Entwicklung des Prostatakarzinoms**

Die molekularen Mechanismen in der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms bleiben aufgrund der ausgeprägten Heterogenität des Tumors noch unzureichend verstanden. So können genetische Veränderungen in der Genexpression durch Veränderungen in der DNA-Sequenz verursacht werden, z.B. durch aktivierende Punktmutationen, Deletionen und Amplifikationen. Auch das Auftreten von Polymorphismen oder Veränderungen in der Kopienzahl (Zugewinne/Verluste) von ganzen Chromosomen oder chromosomalen Regionen wurden bei Patienten mit Prostatakarzinom nachgewiesen. Zahlreiche Studien untersuchten im Prostatakarzinom verschiedene Chromosomenregionen sowohl auf erhöhte Kopienzahl von Onkogenen, als auch auf Deletionen und Genverluste von Tumorsuppressor-Genen (TSG). Genetische Veränderungen klassischer Onkogene

oder TSG sind beim Prostatakarzinom jedoch eher selten und werden vor allem bei fortgeschrittenen Tumoren beobachtet (s.u.). Demnach scheint die Akkumulation genetischer Alterationen und weniger die einzelne Veränderung selbst die Tumorprogression zu bestimmen. Diese Akkumulation könnte durch die Entwicklung einer chromosomalen Instabilität, infolge von Telomeren-Dysfunktion oder Centromerendefekten begünstigt werden [Pihan et al., 2003; Meeker, 2006].

Wie auch bei anderen Tumoren weist das Prostatakarzinom neben sporadischen, ebenfalls hereditäre Formen auf. Im Gegensatz zur sporadischen Form ist eine hereditäre Prädisposition für das Prostatakarzinom selten und beinhaltet <5% der Fälle [Carter et al., 1992]. Jedoch wurden nur mit geringem Erfolg Hochrisiko-Gene im Prostatakarzinom identifiziert (ähnlich den BRCA1 oder BRCA2 Genen bei der Tumorgenese des Mamma- oder Ovarialkarzinoms), obwohl verschiedene chromosomale Verdachtsregionen lokalisiert worden sind. Zu den Kandidatengenen für das hereditäre Prostatakarzinom gehören *RNASEL*, *ELAC2* in der HPC2-Region auf Chromosom 17p11 [Tavtigian et al., 2001] und *MSR1* auf Chromosom 8p22 [Xu et al., 2002], bei denen Keimbahnmutationen und verschiedene Polymorphismen mit einer familiären Häufung von Prostatakarzinom zusammenhängen können. Das bestuntersuchte Kandidatengen *RNASEL* befindet sich in der HPC1 (hereditary prostate cancer 1) -Region auf Chromosom 1q24-25 [Smith et al., 1996]. *RNASEL* kodiert für eine Ribonuklease, die virale und zelluläre DNA degradiert, Apoptose induziert und somit eine Rolle in der Antwort auf virale Infektionen und der Einleitung von Entzündungsreaktionen spielt. Es sind Mutationen und Polymorphismen des Gens bekannt, die das Gen inaktivieren und zur Progression des Prostatakarzinoms beitragen [Chen et al., 2003; Carpten et al., 2002; Li und Tai, 2006].

Die sporadischen Formen des Prostatakarzinoms werden auf somatische Mutationen zurückgeführt, bei denen Deletionen von TSG wie *p53* und *PTEN* eine wichtige Rolle in der Progression spielen. *p53* auf dem Chromosom 17p13.1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher nach Aktivierung durch Zellschädigung Apoptose, DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle reguliert. Wie auch in vielen Tumorarten liegt *p53* beim Prostatakarzinom mutiert vor, wobei häufig Deletionen von *p53* zur Tumorprogression führen und mit schlechter Prognose assoziiert sind [Brooks et al., 1996]. Deletionen von *PTEN* auf Chromosom 10q23.3 treten häufig in metastasierten PCA auf und bieten einen guten Marker für die Progression des Tumors [Schmitz et al., 2007].

Besonders in frühen Entwicklungsstufen des Prostatakarzinoms treten Sequenzverluste häufig auf Chromosom 8p12-21 und 8p23 auf. Veränderungen in diesen Bereichen stehen mit einem aggressiveren Tumorverhalten in Zusammenhang [Schulz und Hatina, 2006]. Das aussichtsreichste Kandidatengen *NKX3.1* liegt auf 8p21. Es kodiert einen prostataspezifischen Transkriptionsfaktor und wird durch Androgene induziert, wodurch das Wachstum sowie die Differenzierung von Epithelzellen und die Produktion sekretorischer Proteine in der Prostata unterstützt wird [Schulz und Hatina, 2006]. Expressionsverluste von *NKX3.1* werden mit hormonrefraktären und metastasierten Prostatakarzinom in Zusammenhang gesehen [Bowen et al., 2000]. Neben Chromosom 8p sind weitere Chromosomen häufig von Deletionen im Prostatakarzinom betroffen, so auch Chromosom 2q, 5q, 6q, 7q, 9p, 10q, 12p, 13q, 16q und 18q [Dong, 2001].

Die chromosomalen Veränderungen umfassen neben Verlusten auch Zugewinne insbesondere auf Chromosom 8q, die im Prostatakarzinom mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden [Ribeiro et al., 2007]. Ein Kandidatengen auf Chromosom 8q24 ist das Onkogen *c-MYC*. Eine funktionell bedeutsame Amplifikation

von *c-MYC* weisen bis zu 20% der rezidivierenden und metastasierenden Prostatakarzinome auf [Perner, Mertz et al., 2007].

Einige Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen metabolischer Enzyme und dem Auftreten oder dem Verlauf des Prostatakarzinoms. Wichtige Vertreter sind Glutathion-S-Transferasen, die als Phase II Entgiftungsenzyme Zellen vor DNA-Schäden, die durch oxidative und elektrophile Substanzen verursacht werden, schützen [Hayes et al., 2005]. Am umfangreichsten wurden Polymorphismen für die Gene *GSTM1*, *GSTT1* und *GSTP1* im Prostatakarzinom untersucht. Nach aktuellen Untersuchungen wird den *GSTM1*-Polymorphismen die größte Bedeutung bei der Erhöhung des Prostatakarzinom-Risikos zugeschrieben [Mo et al., 2009].

Vor kurzem gelang die Entdeckung rekurrenter Genfusionen beim Prostatakarzinom, die bei der Entstehung von Tumoren eine große Rolle spielen. Genfusionen entstehen durch chromosomale Rearrangements wie Translokationen, Deletionen oder Inversionen. Bisher wurden Genfusionen häufig bei hämatologischen und mesenchymalen malignen Krankheiten beobachtet. Ihr Auftreten bei epitheliale Krebs war bis vor kurzem noch überwiegend unbekannt. Das hat sich seit dem Jahr 2005 geändert, indem die Identifizierung rekurrenter genomischer Rearrangements beim Prostatakarzinom gelungen ist. Diese Umlagerungen führen zur Fusion des 5'-nichttranslatierten Endes von prostataspezifischem *TMPRSS2* mit einem Gen aus der *ETS*-Familie [Tomlins et al., 2005]. Dabei kodiert das *TMPRSS2*-Gen für eine Serin-Protease und wird durch den Einfluss von Androgenen stark exprimiert.

Das *ERG*-Gen stellt den häufigsten Fusionspartner aus der *ETS*-Familie für *TMPRSS2* dar. Die *ETS*-Gene kodieren für onkogen wirkende Transkriptionsfaktoren, die durch die Fusion überexprimiert werden. Neben *ERG* wurden auch *ETV1* oder *ETV4* aus dieser Familie als Fusionspartner für *TMPRSS2* identifiziert [Perner, Schmidt et al., 2007]. Bezüglich der hohen Prävalenz von Prostatakarzinom ist die *TMPRSS2:ERG*-Genfusion eine der häufigsten somatischen, genetischen Veränderungen im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen. Als häufigster Mechanismus für die Fusion zwischen *TMPRSS2* und *ERG* -beide auf dem langen Arm von Chromosom 21 (21q22.2-3)- wurde eine Deletion des kurzen Abschnitts zwischen den beiden Genen beobachtet [Perner et al., 2006; Hermans et al., 2006]. In etwa 20% der HGPIN und in fast 50% der klinisch organbegrenzten Prostatakarzinome gelang der Nachweis dieser Fusion [Perner, Mosquera et al., 2007; Tomlins et al., 2005]. Ferner wurde die *TMPRSS2:ERG*-Fusion in allen Tumoren der Patienten beschrieben, die an einem metastasierten und androgen-unabhängigen Prostatakarzinom verstorben sind [Mehra et al., 2008]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die vorhandene Genfusion mit einem letalen, klinischen Verlauf assoziiert ist [Demichelis et al., 2007]. Immer mehr Indizien sprechen dafür, dass durch Genfusionen ein charakteristischer klinischer Verlauf definiert wird. Ihr Nachweis könnte somit als diagnostischer Test und Biomarker mit prognostischer Relevanz eingesetzt werden.

Regenerations- und Differenzierungsprozesse des normalen Drüsengewebes der Prostata werden durch Androgene über den Androgenrezeptor (AR) stimuliert. Der AR bindet als induzierbarer Transkriptionsfaktor im Zellkern an regulatorische DNA-Sequenzen bestimmter Gene und reguliert deren Transkription. Durch seine zentrale Stellung bei der Progression des Prostatakarzinoms ist das androgenunabhängige Wachstum des Prostatakarzinoms mit genetischen Veränderungen im AR assoziiert [Feldman und Feldman, 2001]. Dabei ist die Regulation der Expression des AR-Proteins von entscheidender Bedeutung. Entsprechend wurde in ca. 20% bis 30% der fortgeschrittenen Prostatakarzinome eine Amplifikation des Androgenrezeptor-Gens



(AR) auf Xq12 beschrieben [Koivisto, et al., 1997]. Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass in ca. 20% der hormonrefraktären Tumoren eine Herunterregulierung des AR-Proteins gefunden wurde. Neben dem Verlust des AR kann hier eine Methylierung des AR-Promotors zu einer Inhibition der AR-Expression führen [Sasaki et al., 2002; Nakayama et al., 2000].

Für die verstärkte AR-Aktivität in der Mehrzahl der progredienten Prostatakarzinome und die Entstehung eines androgen-unabhängigen Wachstums wird auch die gesteigerte Expression zahlreicher Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) als wichtiger Faktor diskutiert. Dies stützt sich auf die zentrale Beobachtung, dass IL-6 zu einer verstärkten Expression des AR sowie einer Steigerung der AR-Aktivität in Abwesenheit von Androgenen führen kann [Lin et al., 2001].

Neben genetischen Veränderungen tragen auch epigenetische Aberrationen zur Pathogenese vieler Tumorarten, so auch beim Prostatakarzinom bei. Diese betreffen Modifikationen der Genexpression, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz zurückzuführen sind. Die am besten untersuchten epigenetischen Mechanismen sind die Hypermethylierung der DNA im Promotorbereich, die genomweite Hypomethylierung, Veränderungen in der Chromatinstruktur durch Histon-Modifikationen, der Histon austausch sowie bestimmte Netzwerke transkriptionaler Aktivatoren [Kiefer, 2007].

Die Hypermethylierung von Cytosin-Guanin-Dinukleotidregionen (sog. CpG-Inseln) innerhalb der Promotorregion findet häufig schon in frühen Stadien der Tumorentstehung statt und führt zur Geninaktivierung. Dadurch gewinnen Tumorzellen einen Vorteil und können sich ungehindert durch Ausschaltung möglicher TSG und weiterer genomprotektiver Gene ausbreiten [Jones und Laird, 1999].

Die Hypermethylierung von CpG-Inseln im Prostatakarzinom ist ein häufiges Ereignis und betrifft bisher über 30 identifizierte Gene [Li et al., 2005]. Zu den bekanntesten Genen gehört *GSTP1* aus der bereits weiter oben beschriebenen GST-Familie, das neben Genen wie *APC* und *COX2* eine Hypermethylierung in bis zu 70-95% im Prostatakarzinom aufweist [Schulz und Hatina, 2006]. Anhand des Methylierungsstatus von *GSTP1* besteht die Möglichkeit, zwischen Prostatakarzinom-Gewebe und BPH zu unterscheiden [Bastian et al., 2004]. Zudem gelang in Vorläuferstadien des Prostatakarzinoms wie der proliferativen, inflammatorischen Atrophie (PIA) oder HGPIN ein Nachweis der *GSTP1*-Hypermethylierung [Nakayama et al., 2003]. Daher könnte der *GSTP1*-Methylierungsstatus als ein sinnvoller diagnostischer Marker für das Prostatakarzinom betrachtet werden. Die PIA beschreibt eine entzündliche-regenerative Läsion in der Prostata, die auf direktem oder indirektem Wege, über die HGPIN, zu einem Karzinom fortschreiten kann [De Marzo et al., 1999]. Eine Theorie über die Entstehung von Prostatakarzinom schreibt der Prostataentzündung und so auch der Entstehung der PIA verursacht durch Erreger (Bakterien, Viren), Karzinogene in der Nahrung, Urinreflux und hormonelles Ungleichgewicht eine besonders wichtige Rolle zu [De Marzo et al., 2007].

Die DNA-Hypomethylierung ist in einem kleineren Anteil von Prostatakarzinom zu finden als die Hypermethylierung, dafür aber überwiegend mit der Tumorprogression assoziiert. Die globale Hypomethylierung nimmt mit fortschreitender Progression zu und wird häufig in repetitiven Sequenzen wie LINE-1-Retrotransposons, beobachtet [Flori et al., 2004; Yegnasubramanian et al., 2008], die nahezu 18% des Genoms ausmachen [Schulz et al., 2007]. Durch Hypomethylierung von LINE-1 entstehen möglicherweise fehlerhafte Rekombinationen, so dass eine genomische Instabilität begünstigt werden könnte [Flori et al., 1999; Schulz et al., 2002]. In einer Mikroarray-Studie wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen LINE-1-Hypomethylierung und

Veränderungen auf Chromosom 8 zu finden, da beide mit einer schlechten Prognose und Tumorprogression einhergehen. Dabei fiel auf, dass sich wahrscheinlich beide Prozesse nicht beeinflussen, jedoch sich während der Tumorprogression annähern. Dabei scheinen auch Veränderungen in der Expression von Proteinen des Zytoskeletts und der Extrazellulären Matrix (ECM) mit der gemeinsamen LINE-1-Hypomethylierung und Veränderungen auf Chromosom 8 zu korrelieren [Schulz et al., 2007].

Es gibt bereits andere Beispiele für einen Zusammenhang von DNA-Hypomethylierung mit einer veränderten Expression von Enzymen der ECM. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Heparanase, die generell Heparansulfat und Heparansulfat-Proteoglykane -zwei wesentliche Bestandteile der ECM- spaltet und sich somit neben anderen Enzymen, wie den Matrixmetalloproteinasen (vgl. 1.3) aktiv am Abbau der ECM beteiligt. Diese Degradation stellt bei der Tumordinvasion und Metastasierung einen essentiellen Schritt dar. In diesem Zusammenhang wurde im Prostatakarzinom eine erhöhte Heparanaseexpression berichtet, die mit Aktivierung des Heparanase-Gens (*HPSE*) durch Promotor-Hypomethylierung und zusätzlich durch eine Hochregulation des Transkriptionsfaktors Egr-1 korrelierte [Ogishima et al., 2005] (vgl. 1.6).

### 1.3 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) bildet ein Netzwerk aus Proteinen und Proteoglykanen, in dem die Zellen eines Gewebes eingebettet sind. Sie ist nicht statisch, sondern stellt ein permanent neu produziertes und ständig umgebautes Netzwerk dar. Sie dient in erster Linie der mechanischen Stabilität von Geweben, unterstützt die strukturelle und funktionelle Organisation von Zellen und dient als Substrat für spezifische Zelladhäsion und -migration [Adams und Watt, 1993]. Die Aktivierung von intrazellulären Transduktionswegen durch die Adhäsion von Zellen an andere Zellen oder an extrazelluläre Matrixmoleküle ist bedeutsam für die Gewebedifferenzierung. Das Zusammenspiel zwischen den Proteinen, die Bindung an deren Matrixrezeptoren, unter denen die Integrine eine wichtige Gruppe bilden, kann zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege sowie zur Umformung des Zytoskeletts führen [Bosman und Stamenkovic, 2003]. Die ECM-Proteine beteiligen sich somit an der Adhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung und am Überleben von Zellen [Singer und Clark, 1999]. Zu den bedeutendsten Proteinen, die diese Vorgänge unterstützen, gehören Fibronectin [Duband et al., 1990], Laminin [Davis et al., 1989], Thrombospondin-1 [Tarabozetti et al., 1987] und Kollagen Typ IV [Olivero und Furcht, 1993].

Die Proteine der ECM werden von den Zellen des jeweiligen Gewebes produziert und in den Zellzwischenraum sezerniert. Dabei ist die molekulare Zusammensetzung der ECM so vielfältig wie deren unterschiedliche Funktionen. Die ECM setzt sich aus den Faserproteinen Kollagen und Elastin, welches entscheidend zur Elastizität von Geweben beiträgt (vgl. 1.3.3), multifunktionellen Glykoproteinen wie Laminin und Fibronectin sowie Proteoglykanen zusammen. Zum Netzwerk der ECM gehören außerdem viele faser-assoziierte Glykoproteine wie die Familie der Fibuline (vgl. 1.4) und Tenascine (vgl. 1.5).

Integrine bilden eine Familie heterodimerer transmembraner Proteine (zusammengesetzt aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten), die Interaktionen zwischen Zellen und der ECM vermitteln [Hynes, 1992]. Als Beispiel für zwei bedeutende Integrine dient  $\alpha 7 \beta 1$ -Integrin und  $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin, die für die Entwicklung gesunder Blutgefäße essentiell sind [Flintoff-Dye et al., 2005; Grazioli et al., 2006].

Proteoglykane wie Aggrecan, Perlecan, Versican sowie Syndekan, -einschließlich Hyaluronsäure- sind maßgeblich an der Regulation der Zellmigration und Adhäsion

sowie Proliferation und Differenzierung beteiligt [Kresse und Schönherr, 2001; Turley et al., 2002]. Sie sind zusammengesetzt aus einem Kernprotein, an das ein oder mehrere Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure kovalent gebunden sind. Anhand der Disaccharid-Einheiten, die Glykosaminoglykan-Ketten bilden, unterscheidet man zwischen Heparin- und Heparansulfat-, Chondroitinsulfat-, Dermatansulfat-, sowie Keratansulfat-Protoglykanen.

Aggrecan ist ein wesentlicher Bestandteil des Knorpels und wird von Chondrozyten exprimiert [Mundlos et al., 1991]. Versikan steht -ebenso wie Perlecan- mit der Entstehung von artherosklerotischen Prozessen der Blutgefäße in Verbindung [Evanko et al., 1998; Tran et al., 2007]. Versikan wird in glatten Muskelzellen exprimiert, wobei in atherosklerotischen und restenotischen Läsionen der Blutgefäße seine Produktion deutlich erhöht ist [Evanko et al., 1998; Wight et al., 1997]. Zudem bildet es ein Netzwerk aus Hyaluronsäure sowie Mitgliedern aus der Fibulin-Familie und spielt hierbei eine wichtige Rolle bei der Funktion glatter Muskelzellen während einer Gefäßwandverletzung [Ström et al., 2006] (vgl. 1.4).

Der Abbau der ECM ist einer der ersten Schritte in der Tumordinvasion und der Metastasierung. Die Matrixmetalloproteinasen (MMP) gehören zur Familie Zink-abhängiger Enzyme, die ECM-Komponenten unter normalen und pathologischen Bedingungen spalten [Seiki, 1999]. Besonders der Abbau von Basalmembran-Komponenten wie Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin durch Matrixmetalloproteinasen, unter denen MMP-2 einen wichtigen Vertreter darstellt, ist für Tumorzellwachstum, -Invasion, -Metastasierung und -Angiogenese ein kritischer Schritt [Bernhard et al., 1994; Stetler-Stevenson et al., 1993; Werb, 1997]. Die Matrixmetalloproteinasen werden als inaktive Vorstufen (Pro-MMP) in den Stromazellen, Endothelzellen, sowie Tumorzellen gebildet und beispielsweise durch MT-(membrane-type) MMP zu aktiven Proteinasen aktiviert.

MT1-MMP wird an der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert und wurde zuerst als Aktivator von Pro-MMP-2 identifiziert [Sato et al., 1994]. Jedoch beteiligt es sich auch als multifunktionelles Enzym direkt am Abbau von ECM-Proteinen, einschließlich Testican-1 (vgl. 1.6), Syndekan-1, Kollagenen und Laminin-5 (vgl. 1.3.2) [Sato et al., 2005; Ohuchi et al., 1997; Kudo et al., 2007; Udayakumar et al., 2003]. MT1-MMP ist ein essentieller Regulator für Tumordinvasion und Metastasierung sowie Tumorzellproliferation innerhalb einer drei-dimensionalen ECM [Hotary et al., 2003].

Die Funktion der Matrixmetalloproteinasen ist ferner von der Konzentration ihrer Inhibitoren, den Mitgliedern der Familie TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase), abhängig. Es wurde angenommen, dass bei hohen TIMP-2-Konzentrationen die Aktivierung von MMP-2 blockiert wird, jedoch bei niedrigeren TIMP-2-Konzentrationen TIMP-2 als Cofaktor für MT1-MMP-vermittelte Aktivierung von Pro-MMP-2 zu MMP-2 dient. Bei TIMP-2-Mangel wurde keine Pro-MMP-2-Aktivierung festgestellt, dafür konnte eine effektive Spaltung von MT1-MMP-Substraten, wie Testican-1 und Syndekan-1 beobachtet werden [Kudo et al., 2007].

### **1.3.1 Basalmembran**

Eine spezialisierte Form der ECM ist die Basalmembran. Die Basalmembran grenzt als dünne Schicht (20-300 nm) Epithel- und Endothelzellen vom benachbarten Bindegewebe ab, umgibt glatte und quergestreifte Muskelzellen, Schwannzellen des peripheren Nervensystems sowie Fettzellen. Die Basalmembran ist aus der Lamina basalis (Basallamina) und Lamina fibroreticularis aufgebaut.

Für Zellen und Gewebe stellt die Basalmembran ein Gerüst dar und spielt in der Morphogenese von Geweben eine wichtige Rolle, indem sie zur Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen entscheidend beiträgt. Die meisten Basalmembran-Proteine haben eine Größe von 100-500 kDa mit komplexer, modularer Struktur und sind oft glykosyliert. Sie werden von Endothel-, Epithel- und Mesenchymzellen produziert und sezerniert. Erst im extrazellulären Raum bildet sich die Basalmembran durch Verknüpfung der Komponenten zu Netzwerken aus [Aumailley und Gayraud, 1998]. Ihre Hauptbestandteile sind das Kollagengerüst (Kollagen Typ IV) und die darin eingelagerten Glykoproteine wie Laminin, Nidogen, Tenascin und Proteoglykane wie Perlekan. Diese kommunizieren untereinander und binden an Oberflächenrezeptoren wie Integrine und Syndekane [Miner und Yurchenco, 2004].

Laminine bilden eine Familie großer heterotrimerer Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette zusammengesetzt sind. Bisher sind fünf  $\alpha$ -, drei  $\beta$ - und drei  $\gamma$ -Untereinheiten bekannt, deren unterschiedliche Kombinationen 16 Isoformen ausbilden [Marinkovich, 2007]. Zusammen mit Kollagen Typ IV polymerisieren Laminine zu großen Netzwerken, die durch Wechselwirkungen mit Fibulin, Nidogen und Perlekan miteinander verbunden und stabilisiert werden [Talts et al., 1999]. Über Integrinrezeptoren regulieren Laminine Interaktionen zwischen Epithelzellen und Stroma in Prozessen der Embryogenese, Differenzierung, Tumordinvasion und Metastasierung [Amälinei, 2006]. Ein bedeutendes Mitglied der Familie ist Laminin-332 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ; früher bekannt als Laminin-5), welches die Gewebeentwicklung, Wundheilung und Tumorgenese [Ryan et al., 1996], auch im Prostatakarzinom, reguliert (vgl. 1.3.2).

### **1.3.2 Veränderungen der extrazellulären Matrixkomponenten im Prostatakarzinom**

Die Interaktion zwischen Prostataepithel und Stroma sowie die ECM spielt eine bedeutende Rolle für die Entwicklung von Präneoplasien bis zum manifesten Adenokarzinom. Die PIN wird generell als die wichtigste Vorstufe des invasiven Prostatakarzinoms angesehen [McNeal und Bostwick, 1986]. Ein wesentliches Merkmal der PIN sind Kernatypien der luminalen Zellen.

Während der Tumorphase begünstigt der Verlust oder die Fragmentierung bedeutender Basalmembran-Komponenten das Eindringen von invasiven Tumorzellen durch die Basalmembran in das Stroma. Neben einer veränderten Expression verschiedener Zelladhäsionsproteine ist für die Invasion auch mit einer erhöhten Produktion proteolytischer Enzyme wie Hepsin und Matrixmetalloproteinasen relevant. Ein wichtiges Zelladhäsionsprotein und ein wesentlicher Bestandteil der Basalmembran ist Laminin-332 (vgl. 1.3.1). Es wird in vielen Tumorarten wie dem Kolonkarzinom überexprimiert [Marinkovich, 2007]. Dagegen verschwindet im Prostatakarzinom dieses Glykoprotein aus der Basalmembran [Hao et al., 2001; Davis et al., 2001; Brar et al., 2003].



## Abbildung 2 Progression der normalen Prostata-drüse bis zum Karzinom

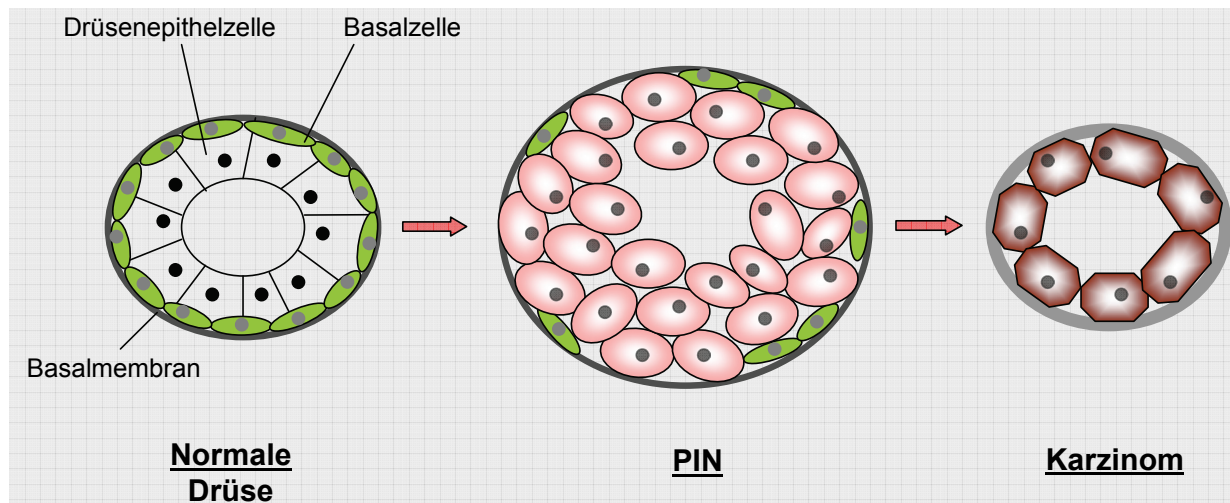


Abbildung 2: vereinfachte schematische Darstellung der Tumorprogression [modifiziert aus Nagle et al., 1994].

Im Prostatakarzinom steht auch der Verlust weiterer Basalmembran-Komponenten wie  $\beta 4$ -Integrin und Kollagen Typ VII mit der Tumorprogression im Zusammenhang [Nagle et al., 1995]. Einen Grund für den Verlust könnte die erhöhte Expression proteolytischer Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen oder Hepsin darstellen, die mit einer gesteigerten Migration von Karzinomzellen assoziiert sind. Zu den wichtigsten Matrixmetalloproteinasen zählen MMP-2 und MT1-MMP, die Laminin-332 im Bereich der  $\gamma 2$ -Kette spalten [Giannelli et al., 1997; Udayakumar et al., 2003]. Hepsin, eine Zelloberflächenprotease, wird in über 90% der Prostatakarzinome überexprimiert [Landers et al., 2005; Stephan et al., 2004]. Viele Studien vermuteten eine wichtige Rolle dieses Enzyms bei der Progression und Metastasierung des Prostatakarzinoms, jedoch waren die zugrunde liegenden Mechanismen lange unklar [Klezovitch et al., 2004]. Erst Tripathi et al. gelang der Nachweis, dass Hepsin ebenfalls zur Spaltung von Laminin-332 führt und damit einen möglichen Mechanismus für das Fortschreiten der Erkrankung darstellt [Tripathi et al., 2008].

### 1.3.3 Elastische Fasern

Die elastischen Fasern bilden wichtige Bestandteile der ECM und sind für die strukturelle Entwicklung und Funktion vieler Organe wie der Haut, Lunge und Arterien von besonderer Bedeutung [Rosenbloom et al., 1993]. Der Verlust der Elastizität führt zu faltiger Haut, Emphysembildung und Arteriosklerose [Pasquali-Ronchetti und Baccarani-Contri, 1997; Bailey, 2001].

Die elastischen Fasern bestehen aus einem amorphen Elastinkern, der von einer peripheren Hülle aus Mikrofibrillen umgeben ist. Zur Bildung reifer, funktionsfähiger elastischer Fasern benötigen die Elastinvorläufer, die Tropoelastinmoleküle, für ihre Quervernetzung Enzyme der Familie LOX. Bisher wurden fünf Mitglieder der LOX (lysyl oxidase)-Familie beschrieben: LOX, LOXL1 (lysyl oxidase-like 1), 2, 3 und 4 [Molnar et al., 2003]. Weitere Proteine, die für die Bildung elastischer Fasern benötigt werden, gehören zur Familie der Fibuline wie Fibulin-4 und Fibulin-5 (vgl. 1.4). Es häufen sich Hinweise darauf, dass Fibulin-5 den Zusammenbau und die Reifung der elastischen Fasern stark induziert, indem es an LOXL-1, -2 und -4 bindet und dadurch eine

Verknüpfung des Tropoelastins mit den Mikrofibrillen ermöglicht [Hirai et al., 2007]. Die Mikrofibrillen bestehen aus Fibrillin-1, -2 und -3 und dienen als Gerüst für die elastischen Fasern. Die Fibrilline enthalten viele hintereinander angeordnete Domänen mit häufig vertretenen epidermalen wachstumsfaktor-ähnlichen Domänen (EGF), die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden und Bindungsstellen für Kalzium enthalten [Lee et al., 2004].

Tropoelastin ist ein wichtiger Ligand der meisten Fibuline, wobei die Bindung mit Fibulin-4 und Fibulin-5 für die Elastizität eine wichtige Rolle spielt. Beide Fibuline binden ebenfalls an Fibrillin-1 und sind für die Bildung elastischer Fasern durch die Verknüpfung von Tropoelastin an Mikrofibrillen essentiell [Freeman et al., 2005]. Es sind Mutationen der Fibulin (*FBLN*)-Gene bekannt, die mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert sind (vgl. 1.4).

Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass ein Fehlen von Fibulin-4 oder Fibulin-5 zum Mangel und Zerstörung der elastischen Fasern führte. Dabei verstarben Mäuse mit Fibulin-4-Mangel innerhalb kürzester Zeit nach der Geburt, Mäuse mit Fibulin-5-Mangel hingegen erreichten das Erwachsenenalter [Nakamura et al., 2002; Yanagisawa et al., 2002; McLaughlin et al., 2006].

#### 1.4 Die Proteinfamilie der Fibuline

Die Fibuline gehören zur Familie der ECM-Proteine, die mit Basalmembranen und elastischen Fasern verknüpft sind. Sie stehen in Verbindung mit der Modulation von Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen sowie der Organisation und Stabilisierung der ECM während der Organ- und Gefäßbildung [Timpl et al., 2003; Argraves et al., 2003].

Zu Beginn der Dissertationsarbeit waren sechs Mitglieder der Fibulinfamilie bekannt, mittlerweile wurde ein siebtes Mitglied entdeckt [de Vega et al., 2007]. Die Fibuline gehören zur Familie der Glykoproteine und bestehen unter anderem aus mehreren EGF-ähnlichen Domänen (EGF-like module), die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden und einem einzelnen C-terminalen fibulin-typischen Modul (Fibulin-type module) (Abbildung 3) [Timpl et al., 2003]. EGF-Domänen sind unter den Proteinen weit verbreitet und sorgen für Stabilität.

Die verschiedenen Fibuline werden durch *FBLN*-Gene kodiert, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (Tabelle 2). Zudem existieren vier unterschiedliche Spleißformen von *FBLN1*-mRNA und entsprechend vier verschiedene Fibulin-1-Proteinvarianten. Fibulin-1C und Fibulin-1D sind die bedeutendsten Proteinvarianten und unterscheiden sich in der Länge der C-terminalen Domäne voneinander (Abbildung 3). In dieser Arbeit werden Fibulin-1C, -1D, Fibulin-4 und Fibulin-5 im Vordergrund stehen. Als sezernierte Glykoproteine gehen die Fibuline Verbindungen mit verschiedenen Basalmembran-Proteinen ein (Tabelle 3).

Fibulin-1 ist ein wesentlicher Bestandteil der Haut, Lunge und des kardiovaskulären Gewebes und spielt unter anderem eine Rolle bei der Bildung funktionsfähiger, endothelzellauskleidender Kapillarwände und intakter Blutgefäße [Kostka et al., 2001]. Passend dazu wurden hohe Konzentrationen von Fibulin-1 im Blut gefunden [Argraves et al., 1990]. Zudem begünstigt es durch Fibrinogenbindung die Adhäsion von Blutplättchen an Fibrinogen sowie die Bildung von Thromben [Godyna et al., 1996; Tran et al., 1995].

**Abbildung 3 Modulare Struktur der Fibulin-Familie**

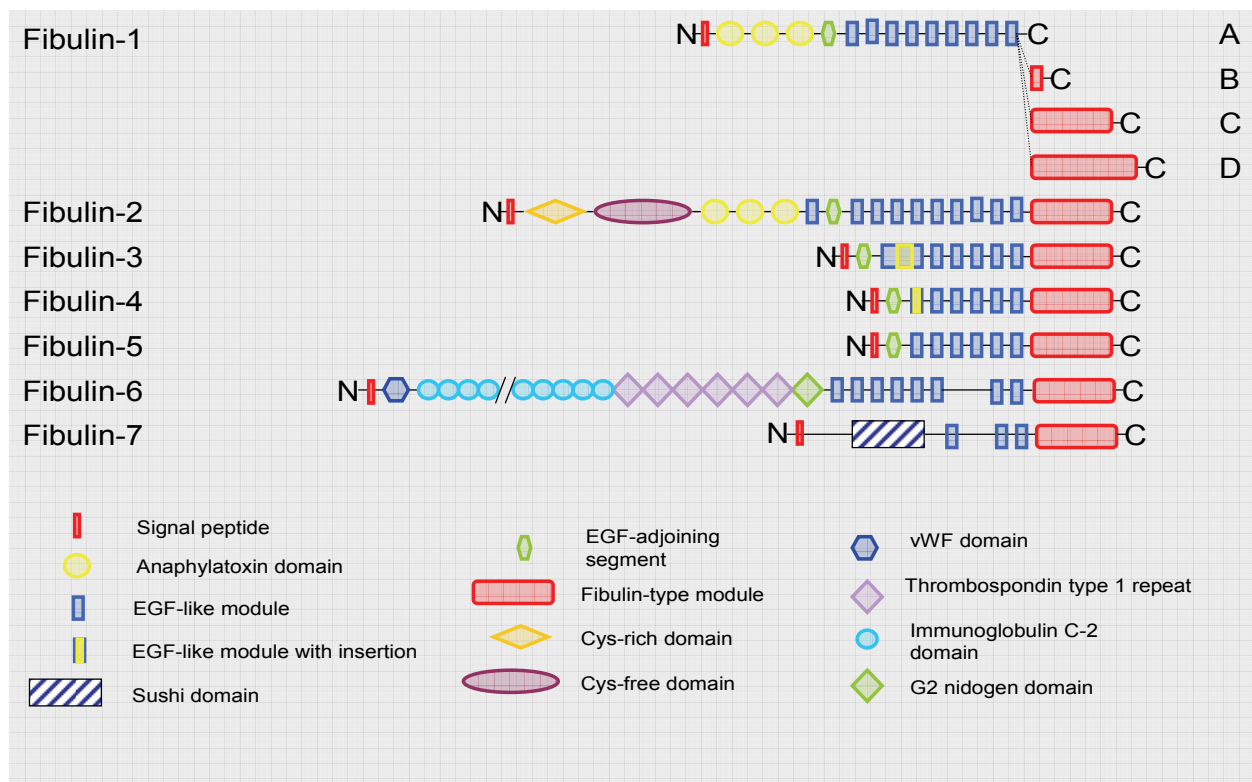


Abbildung 3: Die Fibulin-Familie umfasst sieben Mitglieder, die verschiedene modulare Strukturen aufweisen [modifiziert aus Argraves et al., 2003; de Vega et al., 2009]. Fibulin-1 zeigt vier Spleißvarianten: Fibulin-1A bis -1D [Argraves et al., 2003].

**Tabelle 2 Übersicht über die Fibuline und die chromosomale Lokalisation ihrer Gene**

Name	Synonyma	Genname	Chromosomale Lokalisation	Referenzen
Fibulin-1	BM 90	<i>FBLN1</i>	22q13.31	Argraves et al., 1989
Fibulin-2	-	<i>FBLN2</i>	3q24-p25	Pan et al., 1993
Fibulin-3	S1-5, EFEMP1	<i>FBNL</i>	2p16	Lecka-Czernik et al., 1995
Fibulin-4	EFEMP2	<i>EFEMP2</i> , <i>FBLN4</i>	11q13	Giltay et al., 1999
Fibulin-5	DANCE, EVEC	<i>FBLN5</i>	14q32.1	Nakamura et al., 1999; Kowal et al., 1999
Fibulin-6	Hemicentin-1	<i>FBLN6</i>	1q25.3	Vogel und Hedgecock, 2001
Fibulin-7	TM14	<i>TM14</i>	noch unbekannt	de Vega et al., 2007

Tabelle 2: [modifiziert aus Argraves et al., 2003].

**Tabelle 3 Übersicht über die wichtigsten Bindungspartner der Fibuline**

Protein	Gewicht	Bindungspartner	Referenzen
Fibulin-1	100 kDa	Fibronectin Aggrecan Versican Nidogen Fibrinogen Laminin Tropoelastin Fibulin-7	Balbona et al., 1992 Aspberg et al., 1999 Aspberg et al., 1999 Sasaki, Kostka et al., 1995 Tran et al., 1995 Talts et al., 1999 Kobayashi et al., 2007 de Vega et al., 2007
Fibulin-2	195 kDa	Fibronectin $\alpha_{11}\beta_3$ & $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Aggrecan Versican Nidogen Laminin Tropoelastin Fibrillin	Sasaki et al., 1996 Pfaff et al., 1995 Olin et al., 2001 Olin et al., 2001 Sasaki, Göhring et al., 1995 Talts et al., 1999 Kobayashi et al., 2007 Reinhardt et al., 1996
Fibulin-3	50-60 kDa*	Tropoelastin	Kobayashi et al., 2007
Fibulin-4	50-60 kDa*	Tropoelastin	Kobayashi et al., 2007
Fibulin-5	55 kDa	Tropoelastin $\alpha_5\beta_1$ & $\alpha_4\beta_1$ -Integrin	Kobayashi et al., 2007 Lomas et al., 2007
Fibulin-6	50-60 kDa*	nicht beschrieben	-
Fibulin-7	48 kDa	Fibronectin	de Vega et al., 2007

Tabelle 3: [modifiziert aus de Vega et al., 2009] \* keine genaue Angabe bekannt [de Vega et al., 2009]

Fibulin-2 bildet ein Netzwerk aus Versikan und Hyaluronsäure (vgl. 1.3) und spielt eine Rolle bei arteriosklerotischen Prozessen der Blutgefäße. Auch gibt es Hinweise, dass Fibulin-2 als Antwort auf eine Gefäßschädigung in vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert wird und sich an der Migration glatter Muskelzellen während Reparaturprozessen der Gefäßwand beteiligt [Ström et al., 2006; Hultgårdh-Nilsson und Durbeej, 2007].

Fibulin-5 spielt ebenfalls in der Struktur und Funktion der Gefäße eine bedeutende Rolle. Es interagiert mit glatten Muskelzellen der Gefäße über Integrinrezeptoren  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_1$  und kann die Adhäsion und Ausbreitung der Zellen inhibieren [Lomas et al., 2007]. Zudem wird Fibulin-5 allgemein als Inhibitor der Tumorangio-genese betrachtet [Albig und Schiemann, 2004].

Außerdem spielt Fibulin-5 neben Fibulin-4 bei der Entstehung funktionsfähiger elastischer Fasern eine wichtige Rolle (vgl. 1.3.3). Entsprechend wurden Zusammenhänge zwischen genetischen Erkrankungen wie Cutis Laxa und Mutationen in den Genen *FBLN5* und *FBLN4* beobachtet [Loeys et al., 2002; Huchtagowder et al., 2006]. Cutis Laxa ist mit einer generalisierten Störung des elastischen Gewebes assoziiert, die zur Bildung einer erschlafften Haut, pulmonalen Emphysemen, Hernien und Aortenaneurysmen führt. Zusätzlich begünstigen

Mutationen von *FBLN5* die Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration, die sehr häufig zur Erblindung führt [Stone et al., 2004].

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Fibulin-1 und -4 an Immun- bzw. Autoimmunprozessen, die sich als Antigene auswirken [Pupa et al., 2004; Xiang et al., 2006].

Fibuline stehen ebenfalls mit der Tumorentstehung in Verbindung, in denen sowohl ein tumorsuppressiver als auch ein onkogener Einfluss der Fibuline beschrieben wurde [Gallagher et al., 2005]. In einigen Studien wurde durch immunhistochemische Analysen eine verstärkte Expression von Fibulin-1 in Mamma- und Ovarialkarzinom berichtet, die mit einer Östrogeninduktion von Fibulin-1C assoziiert war [Greene et al., 2003; Clinton et al., 1996]. Zudem wurde beobachtet, dass im Ovarialkarzinom das Verhältnis der mRNA-Expression von Fibulin-1C zu Fibulin-1D zugunsten von Fibulin-1C erhöht war [Moll et al., 2002]. Im Kolonkarzinom jedoch wurde eine Herunterregulation von Fibulin-1 nachgewiesen [Wen et al., 2006]. Die Fibulin-1 Varianten könnten somit als Modulatoren in der Tumorentstehung funktionieren.

Für Fibulin-5 konnte in verschiedenen Karzinomen wie Mamma-, Nieren-, Ovarial- und Kolonkarzinom eine verminderte Expression gezeigt werden und gilt daher allgemein als ein potentieller Tumorsuppressor [Schiemann et al., 2002]. Im Gegensatz dazu fand sich eine Überexpression von Fibulin-4 im Kolonkarzinom, so dass ein onkogener Einfluss durch dieses Protein vermutet wird [Gallagher et al., 2001].

Eine verminderte Expression von Fibulin-2 konnte mit der Progression des Mammakarzinoms in Zusammenhang gebracht werden [Yi et al., 2007].

Im Gegensatz zu den Fibulinen 1, 2, 4 und 5 ist bei Fibulin-3 bisher nur wenig über die Beteiligung an der Tumorentstehung und Progression bekannt [Argraves et al., 2003; Gallagher et al., 2005]. Albig et al. beschrieben Fibulin-3 als einen potentiellen Antagonisten der Angiogenese [Albig et al., 2006].

Die Funktion und Verteilung von Fibulin-6 sind noch weitgehend unbekannt [Schultz et al., 2003] und es wurden auch bisher keine Interaktionspartner für Fibulin-6 beschrieben. Bei der Entstehung von hereditären Erkrankungen wie der Makuladegeneration wurde eine Mutation im *FBLN6*-Gen gefunden [Schultz et al., 2003]. Bei Fibulin-7 wurden bisher keine Erkrankungen beschrieben.

## 1.5 Tenascin-C

Die Tenascine gehören zur Familie der Glykoproteine, die aus vier Mitgliedern bestehen: Tenascin-C, Tenascin-X, Tenascin-R und Tenascin-W [Tucker et al., 2006]. Tenascin-C ist das am besten beschriebene Mitglied dieser Familie und wird in dieser Arbeit im Vordergrund stehen.

Während der Embryonalentwicklung wird es in der Nähe von migrierenden Zellen in verschiedenen Gewebearten, einschließlich Knochen, Gelenken und Sehnen exprimiert [Mackie et al., 1987; Chiquet und Fambrough, 1984]. Im adulten Gewebe ist die Expression von Tenascin-C eingeschränkt, zeigt jedoch einen deutlichen Expressionsanstieg im Stroma vieler Tumorarten sowie während Reparatur-Regenerations- sowie Entzündungsprozessen [Chiquet-Ehrismann, 2004; Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003; Jones und Jones, 2000].

Die typische Struktur von Tenascin-C besteht aus einer amino-terminalen Oligomerisierungsdomäne (N-terminal oligomerisation), vielen EGF-ähnlichen Domänen (EGF-like domain), Fibronektin-Typ-III-Wiederholungen (fibronectin type III repeats) und einer fibrinogen-ähnlichen Domäne am C-terminalen Ende (fibrinogen-like domain) (Abbildung 4).



Zahlreiche Studien lassen vermuten, dass Tenascin-C mit der Entstehung verschiedener Tumorarten im Zusammenhang steht. Dabei wurden hohe Konzentrationen von Tenascin-C in oder rund um proliferierende Tumorzellen gefunden [Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003]. In einigen Tumorarten wie den Gliomen wurde eine hohe Expression von Tenascin-C gefunden, die auch mit der Tumorprogression korrelierte [Orend und Chiquet-Ehrismann, 2006]. Außerdem wurde Tenascin-C als prognostischer Marker für einige Tumore wie Mammakarzinome, Gliome und Lungenkarzinome beschrieben [Minn et al., 2005; Orend und Chiquet-Ehrismann, 2006].

Im Tumorgewebe soll Tenascin-C mit der Stimulation von Tumorzellproliferation und -invasion, sowie der Angiogenese und Supprimierung des Immunsystems assoziiert sein [Orend und Chiquet-Ehrismann, 2006; Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003; Jones und Jones, 2000].

Es wurde mehrfach berichtet, dass die Expression von Tenascin-C durch verschiedene Faktoren wie Zytokine reguliert wird. Ein wichtiges Beispiel für Zytokine ist TGF $\beta$  (transforming growth factor beta), das sich regulatorisch an der Differenzierung und Proliferation von Zellen sowie der Angiogenese und Wundheilung beteiligt [Massagué, 1998; Piek et al., 1999]. TGF $\beta$ 1 ist ein wichtiges Mitglied der TGF $\beta$ -Familie und spielt u.a. eine Rolle bei der Expression von Tenascin-C während der Herzentwicklung [Akhurst et al., 1990] und bei Gelenkentzündungen [Yoshida et al., 1999]. Ebenfalls wurden in einigen Tumorarten wie Mammakarzinom und Ovarialkarzinom erhöhte Expressionen von Tenascin-C gefunden, die auch mit der TGF $\beta$ 1-Expression korrelieren [Walker et al., 1994; Wilson et al., 1999].

#### Abbildung 4 Modulare Struktur von Tenascin-C

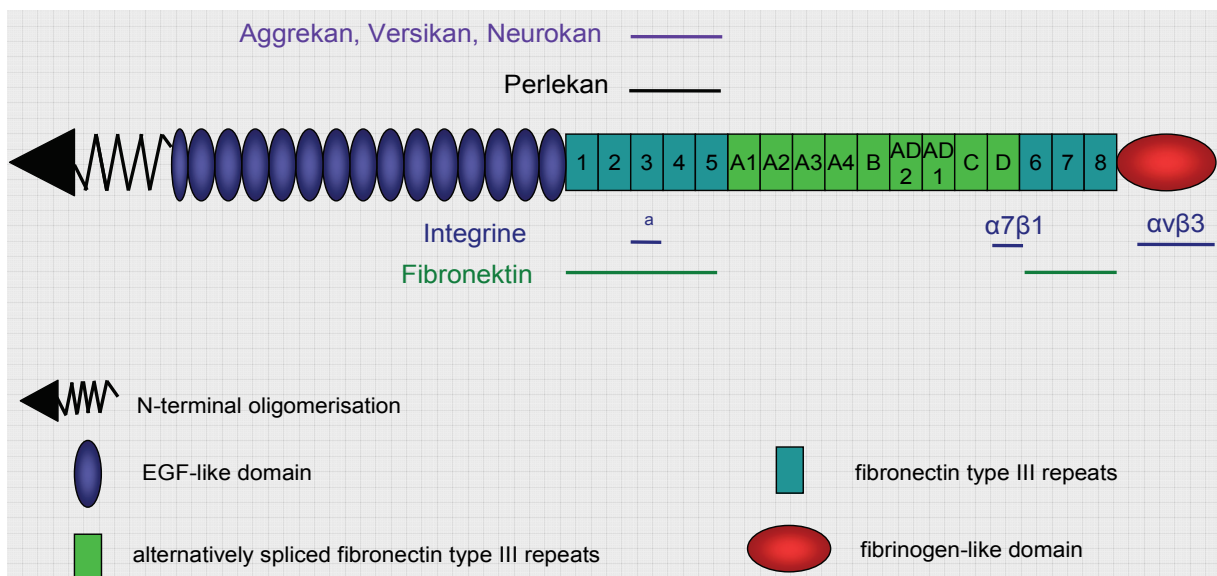


Abbildung 4: Struktur und Bindungspartner von Tenascin-C [modifiziert aus Orend, 2005]. Tenascin-C besteht aus verschiedenen Domänen (siehe Text), einschließlich einigen Spleißformen von fibronectin type III repeats (alternatively spliced fibronectin type III repeats). Bindungsstellen für verschiedene Proteoglykane wie Aggrekan, Versikan, Neurokan und Perlekan sowie Fibronektin und verschiedene Integrine sind durch waagerechte Linien farblich markiert. Integrine<sup>a</sup>: Bindungsstelle für  $\alpha$ V $\beta$ 3,  $\alpha$ V $\beta$ 6,  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 9 $\beta$ 1.

Während der malignen Transformation interagiert Tenascin-C mit verschiedenen ECM-Proteinen, einschließlich Perlekan und Fibronektin sowie einigen Zelloberflächenrezeptoren, wie den Integrinen und Syndekan [Chiquet-Ehrismann

und Chiquet, 2003] (Abbildung 4). Hierbei gibt es Hinweise, dass Tenascin-C durch Hemmung der Bindung von Syndekan-4 an Fibronektin das Wachstum von Tumorzellen stimuliert [Huang et al., 2001; Midwood et al., 2004]. Tenascin-C kann somit die Zellmotilität steigern und die Migration von Gliomzellen über Integrinrezeptoren stimulieren [Sriramarao et al., 1993]. Ebenso wurde berichtet, dass Tenascin-C die Migration und Invasion von Kolonkarzinomzellen induziert [De Wever et al., 2004].

## 1.6 Testican-1 und Egr-1

Testican wurde ursprünglich als proteolytisches Fragment aus humaner Samenflüssigkeit isoliert [Bonnet et al., 1992]. Es wird auch als SPOCK (SPARC/Osteonectin, CWCV and Kazal-like domains proteoglycan) bezeichnet, was sich auf den modularen Aufbau bezieht [Charbonnier et al., 1997]. Testican enthält homologe Domänen zu dem Protein BM-40 (auch bezeichnet als Osteonectin oder SPARC), welches mit Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung assoziiert ist [Ledda et al., 1997; Motamed und Sage, 1997; Rosenblatt et al., 1997; Sage, 1997].

Alle drei Testicane weisen am N-terminalen Ende eine Signalsequenz auf, die aufgrund hydrophober Aminosäurereste eine extrazelluläre Lokalisation ermöglicht (Abbildung 5). Es folgen jeweils eine homologe einzigartige- („unique“) Domäne, Follistatin-ähnliche Domäne (FS) und extrazelluläre kalziumbindende (EC) Domäne. Innerhalb der FS-Domäne befindet sich ein „Kazal-like“ Modul, der sich bei Serinproteaseinhibitoren findet. Innerhalb der EC-Domäne sind zwei EF-Hand-Motive zu finden, welche  $Ca^{2+}$ -Ionen binden [Hohenester et al., 1996]. Am C-terminalen Ende enthalten die Testicane eine Thyroglobulin Typ-1 (Tg1) Domäne und eine neue Sequenz (Domäne V), die zwei Bindungsstellen für Heparansulfat und Chondroitinsulfat enthält. In dieser Arbeit wird Testican-1 im Vordergrund stehen.

Als Proteoglykan weist Testican-1 keine typische Lokalisation in der ECM auf. Vielmehr wurde es in extrazellulären Flüssigkeiten wie Samenflüssigkeit, Blutplasma und zerebrospinalen Flüssigkeit entdeckt [BaSalamah et al., 2001; Stark et al., 2001]. Umso überraschender war die Auffindung von Testican-1 intrazellulär in Neuronen [Bonnet et al., 1996; Charbonnier et al., 2000]. Als Mechanismus für diese Lokalisation wurden ein Fehlen der Signalsequenz oder ein mangelnder Transport von Testican durch die Signalsequenz aus diesen Zellen vermutet [Edgell et al., 2004]. Bisher wurde die Funktion von Testican-1 *in vitro* und in Zellkulturen untersucht, *in vivo* bleibt diese noch unsicher. Als extrazelluläres Proteoglykan wird Testican-1 am stärksten im Gehirn, speziell im Thalamus exprimiert, wo es sich vermutlich an dessen Entwicklung und Funktion regulatorisch beteiligt [Edgell et al., 2004]. Ferner inhibiert Testican-1 die Anheftung neuronaler Zellen und hemmt somit deren Ausbreitung [Marr und Edgell, 2003].

Abbildung 5 Modulare Struktur der Testicane

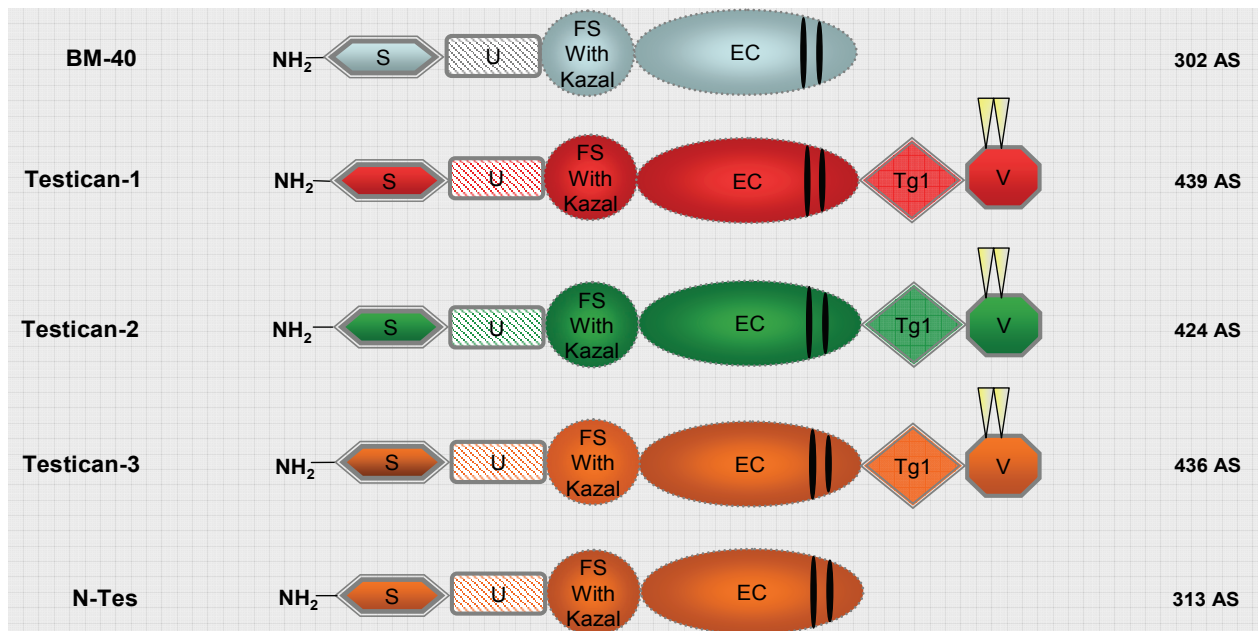


Abbildung 5: Für Testicane charakteristische Darstellung, die von BM-40 abgeleitet werden [modifiziert aus Nakada et al., 2001]. N-Tes: Spleißform von Testican-3. Signalpeptid (S), unique N-terminale Domäne (U), follistatin-like (FS) Domäne mit Kazal, extrazelluläre calcium-bindende (EC) Domäne mit zwei EF-hand (schwarze Balken), Thyroglobulin-Typ-1 Domäne (Tg1), Domäne V (V) mit zwei Glykosaminoglycan-Bindungsstellen. Die unterschiedliche Farbauswahl soll auf die Unterschiede aller Mitglieder in der Aminosäuren (AS)-Sequenz der einzelnen Domänen verdeutlichen (vgl. Text).

Eine wesentliche Funktion von Testican-1 sowie Testican-3 und N-Tes, einer Spleißform von Testican-3, ist die Hemmung der Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen. N-Tes und Testican-3 binden mit der unique-Domäne an die Proteaseaktivität im Zentrum von MT1-MMP und MT3-MMP, inhibieren die Spaltung von Pro-MMP2 zu MMP-2 in Gliomazellen und supprimieren somit zellinvasives Wachstum [Nakada et al., 2001]. Dazu passt, dass eine reduzierte Expression von Testican in der metastasierten Form einer humanen Ösophaguskarzinom-Zelllinie im Vergleich zur nicht metastasierenden Ausgangslinie gefunden wurde [Kawamata et al., 2003]. Die unique-Domäne von N-Tes und Testican-3 ist zu 62% homolog mit der entsprechenden Domäne von Testican-1, so dass für Testican-1 ebenfalls eine Inhibierung von MT1-MMP oder MT3-MMP beobachtet wurde [Nakada et al., 2001]. Testican-2 zeigt nur zu 54% eine Übereinstimmung in der unique-Domäne von N-Tes und Testican-3, zudem hebt es die Inhibierung wieder auf [Nakada et al., 2003].

Außerdem bildet Testican-1 auch ein Substrat für MT1-MMP (vgl. 1.3). Für Testican-1 ist ebenfalls eine inhibitorische Funktion auf das lysosomale Enzym Cathepsin L beschrieben. Die inhibitorischen Eigenschaften übt die Tg-1-Domäne von Testican-1 aus (Abbildung 5). Bei hohen Konzentrationen an Testican-1 und Cathepsin L kommt es zu einer proteolytischen Spaltung von Testican-1 nahe dem für die Inhibierung verantwortlichen aktiven Zentrum [Bocock et al., 2003]. Cathepsin L ist eine ubiquitär exprimierte Protease, die bei vielen Tumorarten im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert wird [Jean et al., 2006; Dohchin et al., 2000].



Das Gen für Testican-1 (*SPOCK1*) liegt auf Chromosom 5q31 in der Nähe des *EGR1*-Gens. Egr-1 (early growth response 1) ist ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor und wird ubiquitär in humanen Geweben exprimiert. Nach Stimulation mit unterschiedlichsten Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Neurotransmittern kommt es zu einem raschen Anstieg der Egr-1-Expression [Thiel und Cibelli, 2002]. Egr-1 bindet an CG-reiche Promotorsequenzen und reguliert die Transkription zahlreicher Gene. Eine erhöhte Expression von Egr-1 hemmt die Zellproliferation und das Tumorstadium [Liu et al., 1999]. Dazu passt, dass eine verminderte Expression von Egr-1 z.B. im Mammakarzinom beobachtet wurde [Huang et al., 1997]. Einer der Mechanismen, die eine tumorsuppressive Wirkung vermuten lässt, ist eine direkte Stimulation der Expression von TGF $\beta$ 1 und von p53 [Liu et al., 1996; Nair et al., 1997]. TGF $\beta$ 1 spielt in vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen eine wesentliche Rolle, wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Motilität und Apoptose. Die am häufigsten beobachtete Reaktion auf eine TGF $\beta$ 1-Stimulation ist eine Wachstumsinhibition. Im Gegensatz zur tumorsuppressiven Wirkung wurde im Prostatakarzinom über eine onkogene Rolle von Egr-1 berichtet. Dort zeigt Egr-1 eine starke Expression und fördert das Zellwachstum im Prostatakarzinom im Vergleich zu normalem Gewebe [Thigpen et al., 1996]. Die Wirkung von Egr-1 hängt wahrscheinlich vom Status von p53 und von TGF $\beta$  ab, die sich beide im Verlauf der Tumorprogression verändern [Le et al., 2005; Massagué, 2008].

## 1.7 Ziel der Arbeit

Veränderungen in der Struktur und Zusammensetzung der ECM spielen bei der Entstehung und Progression verschiedener Karzinome, auch im Prostatakarzinom (vgl. 1.3.2), eine entscheidende Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung verschiedener Gene im Prostatakarzinom gelegt, die für Proteine der ECM kodieren: die Fibuline (Fibulin-1C, -1D, -4 und -5) (vgl. 1.4) und Tenascin-C (vgl. 1.5) sowie Testican-1 (vgl. 1.6). In vorangegangenen Studien konnte in gesunden und tumorösen Geweben die Beteiligung der Fibuline und Tenascin-C an Vorgängen wie Zell-Zell-Interaktion, Zelladhäsion und Zellmigration beobachtet werden, Vorgänge, die auch im Prostatakarzinom von Bedeutung sind. Für Testican-1 (kodiert durch *SPOCK1*-Gen) existieren insgesamt nur wenige Studien zur Expression und Funktion in Tumoren. Zusätzlich wurde ein Gen (*EGR1*) untersucht, das für den Transkriptionsfaktor Egr-1 kodiert, der sich an Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, und Apoptose regulatorisch beteiligt (vgl. 1.6).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der erstmaligen Durchführung einer genauen Analyse der Expression, Lokalisation und Regulation dieser Gene im Prostatakarzinom. Das Interesse an dieser Untersuchung wurde durch die Ergebnisse der letzten Mikroarrayuntersuchung in einer bestimmten Untergruppe von Prostatakarzinomen durch Hinweise auf eine Veränderung dieser Gene geweckt [Schulz et al., 2007].

Zunächst erfolgte die Untersuchung des Expressionsniveaus von *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5* sowie *TENC* und *SPOCK1*. Dafür wurden Prostatakarzinom-Gewebeproben ohne Fernmetastasen sowie normale Prostatagewebeproben mittels Real-time PCR untersucht. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die Proteinexpression und genaue Lokalisation von Fibulin-1 und Fibulin-5 im Prostatanormalgewebe- sowie Tumorgewebe mittels Western-Blot Analyse und Immunhistochemie bestimmt. Zur Ermittlung der genauen Lokalisation folgte weiterhin eine immunzytochemische Färbung von Fibulin-1 und Fibulin-5 in Prostatakarzinom-Zelllinien.

Da mehrere Studien bei der erhöhten *FBLN1*-Expression in Mamma- und Ovarialkarzinom einen Einfluss von Steroidhormonen vermuten lassen, wurde das Expressionsniveau der Fibulin-Gene auch nach Behandlung von Prostatakarzinom-Zelllinien mit Androgenen gemessen.

Da häufig epigenetische Aberrationen zu Expressions-Veränderungen von ECM-Proteinen wie verschiedenen Lamininen und Kollagenen beim Prostatakarzinom führen, wurden *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5* auf ihr Expressionsniveau in Prostatakarzinom-Zelllinien nach Behandlung der Zellen mit dem Methylierungsinhibitor 5-aza-dC ermittelt. Als Folge der Ergebnisse wurde der *FBLN4*-Promotor auf DNA-Methylierung mittels Bisulfitsequenzierung untersucht.

Aufgrund von Hinweisen früherer veröffentlichter CGH-Daten auf Allelverluste in über 20% der Karzinome, sollte in dieser Arbeit die Gendosis der *FBLN*-Gene auf Chromosom 22q13.31, von *SPOCK1* auf Chromosom 5q31 und *EGR1*, einem Nachbarn von *SPOCK1* auf Chromosom 5q31.1, erforscht werden.

Die Ergebnisse der Analysen der vorliegenden Arbeit sollten Aufschluss geben über eine mögliche Beteiligung der untersuchten Gene beim Prostatakarzinom.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Verwendete Zelllinien

#### 2.1.1 Prostatakarzinom-Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf humane Prostatakarzinom-Zelllinien verwendet. Die Zellen der Linie PC-3 stellen humane epitheliale Prostatakarzinom-Zellen dar. Sie entstammen der Knochenmetastase eines Grad IV Adenokarzinoms, welches bei einem 62-jährigen Europäers diagnostiziert worden war [Kaighn et al., 1979]. 22Rv1 wurde über ein Xenograft aus Mäusen isoliert [Sramkoski et al., 1999]. Die DU145 Zelllinie wurde 1978 von Stone et al. aus einer Hirnmetastase eines Prostatakarzinoms bei einem 69-jährigen Europäer etabliert. Es handelt sich dabei um epitheliale Zellen, die kein prostataspezifisches Antigen exprimieren. Die Zelllinie LNCaP entstammt einer Lymphknotenmetastase eines humanen Prostatakarzinoms. Sie wurde aus einer Biopsie aus einem links-supraclavikulären Lymphknoten eines 50-jährigen Europäers gewonnen [Horoszewicz et al., 1983]. LNCaP-Zellen sind eine der wenigen bekannten Prostatakarzinom-Zellen, für welche Androgen-Sensitivität bewiesen wurde. MDAPCa2b entstammt aus einer Knochenmetastase von einem 63-jährigen Mann und ist schwächer androgenabhängig [van Bokhoven et al., 2003]. Prostatakarzinom-Zelllinien 22Rv1, LNCaP, PC-3 und DU145 wurden im RPMI-1640 (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Germany) kultiviert und mit 10% fetalem Kalbsserum und 100 IU Penicillin / 100 µg Streptomycin angereichert. MDAPCa2b wurde in F12K-Medium kultiviert. Das Medium wurde mit 20% FCS, 100 IU Penicillin / 100 µg Streptomycin, 25 ng/ml Cholera-toxin, 10 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor (Gibco), 0,005 nM Phosphoethanolamine, 10 pg/ml Hydrocortison (Sigma, Taufkirchen, Germany) und Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco) angereichert. Normale Prostataepithelzellen (PrEC) wurden im Clonetics PrEGM-Basalmedium mit empfohlenen Ergänzungen gezüchtet (Cambrex, Verviers, Belgium).

#### 2.1.2 Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Als einzige Urothelkarzinom-Zelllinie wurde SW1710 untersucht. Sie stammt aus einem gering differenzierten (G3), fortgeschrittenen Urothelkarzinom mit papillärer Wachstumsform einer weiblichen Patientin [Neveling et al., 2007]. Diese Zelllinie wurde von Dr. J. Fogh, Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, New York, USA über Herrn Prof. Dr. Schmitz-Dräger zur Verfügung gestellt.

### 2.2 Gewebeproben

Die Prostatakarzinom- und Normalgewebeproben für die Gewinnung der DNA und RNA wurden aus der Gewebebank der Urologischen Klinik der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die Proben stammen von Patienten der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Prostatakarzinom-Gewebeproben wurden in den Jahren 1997 bis 2002 nach radikaler Prostatektomie entnommen.

Die TNM-Klassifikation wurde entsprechend den Leitlinien der UICC von 1997 ausgeführt. In der Tabelle 4 sind die klinischen Daten zusammengefasst. Von den 47 PCA-Gewebeproben befanden sich 20 Karzinoma im Stadium pT2, 25 im Stadium

pT3 und 2 im Stadium pT4. Bei 12 Patienten konnten Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt der Prostatektomie hatte kein Patient nachweisbare Fernmetastasen. Die Gleason-Summe der Tumore betrug in 13 Fällen < 6, in 26 Fällen 7 und in 8 Fällen > 7. Das Patientendurchschnittsalter entsprach 67,5 Jahre innerhalb einer Altersgruppe von 59 bis 76 Jahre. Der Zustand der Patienten wurde im weiteren Verlauf für einen Zeitraum in Median 64 Monate beobachtet. Während dieser Zeit erlitten 12 Patienten ein Rezidiv. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität genehmigt.

Zu diesen 47 Prostatatumorproben wurden 13 Proben aus Prostatanormalgewebe von Patienten im Alter von 55 bis 73 Jahren berücksichtigt, die Prostatektomien entstammten. Das von einem Pathologen entnommene Gewebe befand sich vom Tumoreal möglichst weit weg.

**Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten Prostatakarzinom-Gewebeproben mit zugehörigem pathologischen Befund (PT: Prostatatumor; LK: Lymphknoten; n. b.: nicht bekannt).**

Proben	Alter	Tumor-Stadium	LK-Stadium	Rezidiv	Metastasen	Gleason-Summe
PT 36	72	pT3b	pN0	ja	M0	7
PT 38	75	pT2b	pN0	nein	M0	7
PT 50	67	pT3b	pN1	ja	M0	7
PT 65	62	pT3b	pN0	ja	M0	7
PT 83	76	pT3b	pN0	nein	M0	7
PT 89	68	pT2b	pN0	nein	M0	3
PT 93	73	pT3b	pN0	ja	M0	7
PT 95	74	pT3b	pN1	ja	M0	10
PT 97	71	pT3a	pN0	nein	M0	7
PT 99	67	pT2b	pN0	nein	M0	5
PT 101	68	pT3a	pN0	n. b.	M0	8
PT 105	59	pT3a	pN0	nein	M0	5
PT 107	59	pT3a	pN0	ja	M0	7
PT 117	68	pT3b	pN0	nein	M0	5
PT 119	63	pT3b	pN1	n. b.	M0	9
PT 121	65	pT2b	pN0	nein	M0	6
PT 127	71	pT2b	pN0	nein	M0	6
PT 133	72	pT2b	pN1	ja	M0	7
PT 137	73	pT2b	pN0	nein	M0	8
PT 139	65	pT3b	pN1	ja	M0	9
PT 141	69	pT2b	pN0	nein	M0	4
PT 145	70	pT4	pN1	nein	M0	7
PT 161	64	pT2b	pN0	nein	M0	5
PT 163	65	pT3a	pN1	nein	M0	5
PT 169	72	pT3a	pN0	nein	M0	7
PT 171	61	pT2b	pN0	ja	M0	5
PT 175	73	pT2b	pN0	nein	M0	8
PT 183	67	pT3a	pN0	nein	M0	6

Proben	Alter	Tumor-Stadium	LK-Stadium	Rezidiv	Metastasen	Gleason-Summe
PT 187	68	pT2b	pN0	nein	M0	8
PT 189	63	pT2b	pN0	nein	M0	7
PT 191	72	pT2b	pN0	nein	M0	7
PT 205	73	pT3a	pN0	nein	M0	7
PT 209	71	pT3a	pN0	nein	M0	7
PT 213	59	pT2a	pN0	nein	M0	7
PT 215	58	pT3a	pN0	nein	M0	7
PT 217	62	pT2b	pN0	nein	M0	8
PT 219	64	pT4	pN1	nein	M0	7
PT 225	62	pT3b	pN0	nein	M0	6
PT 227	72	pT2a	pN1	nein	M0	7
PT 230	68	pT2a	pN0	ja	M0	7
PT 232	70	pT2b	pN1	ja	M0	7
PT 236	74	pT3a	pN0	nein	M0	7
PT 238	62	pT2a	pN0	nein	M0	6
PT 245	66	pT3a	pN0	nein	M0	7
PT 247	55	pT3b	pN1	ja	M0	7
PT 253	61	pT3a	pN1	nein	M0	7
PT 256	71	pT3b	pN0	nein	M0	7

### 2.3 Chemikalien

Die bei der Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den unten genannten Firmen in Tabelle 5. Alle weiteren Chemikalien wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen) bezogen.

**Tabelle 5**

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid 37,5:1 30%	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
6 x Auftragspuffer	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot
5-Aza-2'-Desoxycytidin	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot
dNTP-Mix	PeqLab, Erlangen
Luria Agar	Becton, Dickinson, Sparks, MD, USA
Magermilchpulver	Trade Service Int., Zewen
Oligo (dT15)	Roche, Mannheim
PBS	Biochrom, Berlin
Tween 20	SERVA, Heidelberg
Luria Broth Base	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Protein-Auftragspuffer	Fermentas, St.- Leon-Rot
Protein-Marker	PeqLab, Erlangen
TAE	Eppendorf, Hamburg
Vectashield	Vector, Californien, USA
Proteinase Inhibitor-Mix	Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen

## 2.4 Enzyme

**Tabelle 6**

Enzym	Hersteller
HotStarTaq-DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Taq Man®Universal PCR Mastermix No AmpErase®UNG	Applied Biosystems, Foster City, USA
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim, MBI Fermentas, St.-Leon-Rot
Ribonuclease Inhibitor	MBI Fermentas, St.-Leon-Rot

## 2.5 Antikörper

**Tabelle 7**

Antikörper	Hersteller
Anti- Fibulin-1 (MEM-2)	ALEXIS
Anti-DANCE	R&D Systems
ALEXA 488 Ziege Anti-Maus	Invitrogen, Mannheim
HRP-conjugiert Ziege-Anti-Maus	Santa-Cruz, Heidelberg
Anti- $\alpha$ -Tubulin	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen

## 2.6 Plasmide

Für Klonierungen von PCR-Produkten wurde das Plasmid pCR<sup>®</sup> 4-TOPO (Invitrogen, Mannheim) verwendet.

## 2.7 E. coli-Stämme

Die für die Plasmidpräparation benötigten kompetenten E.coli-Zellen des Stammes One Shot<sup>®</sup> TOP10 wurden von der Firma Invitrogen (Mannheim) erworben.

## 2.8 Molekularbiologische Kits

Tabelle 8

Molekularbiologische Kits	Hersteller
ECL Western Blot Analysis System	Amersham, Freiburg
Fast Plasmid Mini Kit	Eppendorf, Hamburg
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Holland
BCA <sup>TM</sup> Protein Assay	Pierce, Bonn
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden, Germany
peqGOLD TriFast, peqLab	Erlangen, Germany

## 2.9 Bakterienmedien, autoklaviert

Tabelle 9

Bakterienmedien	Zusammensetzung
LB-Medium	25 g Luria Broth Base ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
LB-Agar	30,5 g Luria Agar Base ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O nach Abkühlen entsprechend Antibiotikum zugeben

## 2.10 Standardlösungen

Tabelle 10

Standardlösungen und Puffer	Zusammensetzung
Ethidiumbromid-Lösung	0,5 mg/ml Ethidiumbromid
PBS, pH 7,2	137,0 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS, steril filtriert
MTT-Lysispuffer	0,6% Eisessig, 10% SDS in DMSO
TE-Puffer	10 mM Tris/HCL pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0

## 2.11 Lösungen für Western-Blot-Analyse

### 2.11.1 Lysis-Puffer

Tabelle 11

<b>Lysis-Puffer, pH 7,4</b>
50 mM Tris-Base
150 mM NaCl
1% TritonX100
5 mM EGTA
20 µl/ml Proteaseinhibitorcocktail (Zugabe vor Gebrauch), Lagerung bei -20 °C

### 2.11.2 Trenngel und Sammelgel

Für Trenngel und Sammelgel wurde ein Ansatz für 2 Gele je 6,2 cm x 8,7 cm verwendet (Tabelle 12).

Tabelle 12

<b>Trenngel</b>
11,5 ml dH <sub>2</sub> O
10 ml Acrylamid 37,5:1, 30%
7,6 ml 1,5 M Tris-Base pH 8,8
600 µl 10% SDS
300 µl 10% APS
12 µl TEMED
<b>Sammelgel</b>
9,6 ml dH <sub>2</sub> O
2,5 ml Acrylamid 37,5:1, 30%
1,0 ml 1 M Tris pH 6,8
150 µl 10% SDS
99 µl 10% APS
9,9 µl TEMED



### 2.11.3 Pufferlösungen

Tabelle 13

<b>Laufpuffer</b>
28,4 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS
ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
<b>Western-Blot-Puffer, pH 8,3</b>
28,4 mM Tris-Base
192 mM Glycin
10% Methanol

Als Blockpuffer wurde 5% Magermilchpulver in PBS verwendet.

### 2.11.4 Antikörperlösungen

Tabelle 14

<b>Antikörper-Lösungen</b>
0,1% Tween 20 in PBS
1% Magermilchpulver
entsprechende Verdünnung des Antikörpers

Tween 20 (0,1%) in PBS diente als Waschlösung.

### 2.12 Lösungen für Immuncytochemie

Tabelle 15

<b>TBS-Puffer, pH 7,4</b>
165 mM NaCl
50 mM Tris
<b>Saponin</b>
5 mg/ml in TBS
<b>Natrium-Borhydrid</b>
1 mg/ml in TBS
<b>Evansblue-Färbelösung</b>
1% in PBS

## 2.13 Spezielle Materialien und Geräte

**Tabelle 16**

<b>Materialien und Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
ABI Prism <sup>®</sup> SDS 7900 HT	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
ABI Prism <sup>®</sup> SDS 7300	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Trio Thermoblock	Biometra, Göttingen
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
ELISA Easy Reader	SLT-Labstruments, Österreich
EASY-CAST <sup>™</sup> Elektrophoresis Systems	Owl Scientific, USA
Gel Print 2000i	MWG-Biotech, Ebersberg
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia, Freiburg
Immobilon <sup>™</sup> -P	Millipore, Bedford, USA
Mikroskop Eclipse E 400	Nikon, Düsseldorf
Mini-V8.10 Vertical, Gel Electrophoresis System	Biometra, Göttingen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Power Supply	Biometra, Göttingen
Spektralphotometer	Eppendorf, Köln
0,1% Tween 20 in PBS	0,1% Tween 20 in PBS
MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate <sup>®</sup>	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur stammen von den Firmen Greiner (Frickenhäuser), Falton/Becton Dickinson (Meylen Cedex, Frankreich) und Nunc (Roksilde, Dänemark). Zentrifugen der Firmen Eppendorf, Beckmann und Thermo Fisher Scientific standen zur Verfügung.

## 2.14 Software

### 2.14.1 Programme

Die Statistiken wurden mit Hilfe von SPSS (SPSS 12.0) erstellt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student T-Test für ungepaarte Stichproben berechnet. Zuvor wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Testes eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung ausgeschlossen.

## 2.14.2 Datenbanken

Tabelle 17

Datenbanken
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
<a href="http://www.biocompare.com">http://www.biocompare.com</a>

## 2.15 Oligonukleotidprimer

Die folgenden Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen (Tabelle 18).

Tabelle 18 *FBLN4*- Primer für Promotoranalysen auf DNA-Methylierung

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	TM	Amplifikat	Verwendung	Referenz
Biseq- <i>FBLN4</i> -fwd	ATAAGTAGGGAT GGTAAGGGGAA	58,9	357 bp	Bisulfitesequen- zierung	eigen
Biseq- <i>FBLN4</i> -rev	ACCCTCCATCCA CAAACACTACA	58,4			

## 2.16 Umgang mit Bakterienzellen

### 2.16.1 Bakterienkulturen

Die Bakterien wurden in mit Ampicillin (50 µg/ml) versehenes LB-Medium (LB<sub>Amp</sub>) gegeben, in dem selektiv die mit dem Plasmid transformierten Zellen heranwachsen. Anschließend wurde bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) für 16-18 h inkubiert.

Zur vorübergehenden Sicherung sowie zur erneuten Anzucht von Gefrierkulturen wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten (50 µg/ml Ampicillin; LB<sub>Amp</sub>) in 10 cm-Schalen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone konnten danach in LB<sub>AMP</sub>-Medium kultiviert werden.

Das Anlegen von Gefrierkulturen erfolgte aus Übernachtskulturen, indem 850 µl der Bakterien suspension mit 170 µl 87%-igem Glycerin in einem Kryoröhrchen vermischt und anschließend als 15%-ige Glycerinlösung bei -70 °C gelagert wurde.

### 2.16.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für eine Plasmidpräparation im Mini-Format wurden in sterile Plastikröhrchen je 4 ml mit 50 µg/ml Ampicillin versetztes LB Medium gefüllt und Kulturen einzelner Klone pro Röhrchen von der Agarplatte in das vorbereitete Medium überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln (250 rpm) wurden 2 ml der Mini-Kultur zur Präparation der Plasmid-DNA mit Hilfe des Eppendorf Fast Plasmid Mini Kits eingesetzt. Die weitere Plasmid-DNA Präparation wurde nach

Herstellerangaben über alkalische Lyse und Säulenaffinitätschromatographie durchgeführt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration sowie der Reinheit der Präparationen wurde photometrisch durchgeführt. Zur Verifizierung der präparierten Plasmid-DNA wurde ein Restriktionsverdau (vgl. 2.17.1) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

## 2.17 Klonierung

### 2.17.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau wurde zur Untersuchung der gewonnenen Plasmid-DNA bzw. zur Isolierung verschiedener DNA-Fragmente eingesetzt. Für den Restriktionsverdau wurde 5 µg Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen in 5-fachem Überschuss (5 U/µg DNA) in einen 20 µl - Ansatz eingesetzt. Der zugehörige Restriktionspuffer wurde einfach eingesetzt. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde der Restriktionsverdau mit 6 x Ladebuffer gestoppt und auf einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.17.2 Klonierung von PCR-Produkten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Klonierungen vorgenommen:

➤ Biseq-FBLN4; zur Herstellung dieses Konstrukts wurde eine Teilsequenz des *FBLN4*-Promotors (357 bp) mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits in den pCR<sup>®</sup> 4-TOPO-Vektor inseriert. Das PCR-Fragment liegt dann zwischen 2 Schnittstellen für das Restriktionsenzym EcoRI und kann damit herausgeschnitten werden.

Bei der PCR-Reaktion wird häufig ein zusätzliches Adenosin-Nukleotid an das 3'-Ende eines neu synthetisierten DNA-Stranges von der Taq-Polymerase angebracht. Dieses wird beim TOPO TA Klonierungs Kit zur Klonierung von PCR-Produkten genutzt, da der enthaltene Klonierungsvektor einen komplementären Thymidin-Überhang aufweist.

Für die Klonierung eines PCR-Produktes wurden nach einer sauberen Agarose-Gelelektrophorese 2 µl vom PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung, 2 µl sterilem und 1 µl TOPO<sup>®</sup>-Vektor in einen Ansatz von 6 µl eingesetzt und max. 30 min bei RT inkubiert. Für die anschließende Transformation von One Shot<sup>®</sup> TOP10 –Bakterienzellen mittels Hitzeschock wurden 2 µl des Ligationsansatzes verwendet. Durch den Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C erfolgte die Aufnahme der DNA in kompetente Zellen. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden jedem Aliquot 250 µl auf 42 °C vorgewärmtes SOC-Medium zugeführt und die Zellen 1 h bei 37 °C bei 200 rpm geschüttelt. Nachdem 50 und 200 µl der Bakteriensuspension auf LB<sub>AMP</sub> –Agarplatten ausgestrichen wurden, folgte anschließend die Inkubation bei 37 °C über Nacht.

### 2.17.3 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Für die Experimente wurden die Prostatakarzinom-Zelllinien mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-aza-dC), einem Inhibitor der DNA-Methylierung, behandelt. Dafür wurde das Medium mit 2 µM 5-aza-dC den Zelllinien alle 24 Stunden für 3 Tage zur Kultivierung zugegeben. Unbehandelte Zellen wurden parallel bis zur RNA-Extraktion

kultiviert. Die verwendete Dosis von 5-aza-dC wurde zuvor bei der Induktion verschiedener anderer Gene als wirksam gezeigt [Hoffmann et al., 2006].

## 2.18 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurden diese in mittelgroßen Zellkulturflaschen bis zu 80% der Oberfläche angezüchtet. Zur Lyse der Zellen wurde 1 ml Trizol auf die Zellen gegeben und danach die Suspension in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 200 µl Chloroform und kurzem Vortexen die Inkubation der Lösung für 3 min bei RT. Nach dem Abzentrifugieren (15 min, 12000 x g, 4 °C) wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen 70%-igem Ethanol versetzt und 15 s gevortext. Die RNA wurde über Säulenaffinitätschromatographie nach Herstellerangaben mit Hilfe des RNeasy Mini Kits isoliert.

Bei Versuchsansätzen mit bis zu  $1 \times 10^5$  Zellen (z.B. 6-Wellis siRNA-Analyse) wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Micro Kits gewonnen. Dabei wurden die Zellen mit dem zum Kit gehörigen Puffer lysiert und anschließend nach Herstellerangaben fortgeföhren.

## 2.19 Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA, genomischer DNA und RNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm vorgenommen.

Darüberhinaus wurde die RNA-Konzentration von Präparationen mit geringem Ausgangsmaterial am Nanodrop bestimmt. Die Qualität wurde durch Kapillarelektrophorese mit Hilfe des Agilent Picochips im BMFZ als Auftragsarbeit analysiert.

## 2.20 RT-PCR

### 2.20.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptions-Reaktion dient der Umwandlung von RNA in cDNA (complementary DNA). Dabei wurde die *SuperScript™ II Reverse Transkriptase* (Invitrogen), eine virale RNA-abhängige DNA-Polymerase, verwendet.

Für die RT-PCR wurden Oligo (dT)<sub>15</sub> –Primer verwendet, die spezifisch an die Poly(A)-Sequenz von eukaryontischer mRNA binden und mit der Reversen Transkriptase ein kontinuierliches cDNA Fragment in 3'-5' Richtung bilden. Zur Vermeidung von Kontaminationen durch Nukleasen (RNAsen) wurde in den Reaktionsansatz ein RNase-Inhibitor (Invitrogen) eingesetzt.

Für die Umschreibung wurde ein 20 µl Reaktionsansatz verwendet. Dabei wurde aus der RNA von Zelllinien und Gewebe die cDNA nach folgendem Schema hergestellt: 2 µg RNA wurden mit 0,04 nmol Oligo (dT)<sub>15</sub> Primern, jeweils 10 nmol dNTPs und sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Ein Mastermix der übrigen Komponenten wurde pro Ansatz nach folgendem Schema angesetzt:

**Tabelle 19 Pipettierschema Mastermix Reverse Transkription**

Komponenten	Endkonzentration
5 x Reaktionspuffer	1 x
0,1 M DTT	0,01 M
RNase Inhibitor	40 U

Nach einer kurzen Abkühlung der Proben auf Eis und Zugabe von 7 µl Mastermix pro Probe folgte eine Inkubation von 2 min bei 42 °C. Im Anschluss an eine Zugabe von 200 U SuperScript™ II Reverse Transkriptase pro Probe wurden die Ansätze 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert. Die so hergestellten cDNAs wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.20.2 Qualitative PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische Sequenzbereiche aus geringsten Ausgangsmengen von Nukleinsäuren *in vitro* und zudem schnell zu amplifizieren, um sie so einer Analyse oder Weiterverarbeitung zugänglich zu machen. Dazu werden spezifische Oligonukleotide, Primer, aus der Sequenz herausgesucht und in die PCR eingesetzt. Die zwischen dem *forward* identischen (*sense*) und *reverse* identischen (*antisense*) Primern liegenden Sequenzen werden mit Hilfe von Polymerasen amplifiziert.

Eine typische PCR-Reaktion besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Schritten: Denaturierung, Annealing der Primer und Amplifikation.

Im ersten Schritt wird die Probe bei 95 °C denaturiert, so dass die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufschmilzt. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer bei einer optimalen Temperatur (60 °C) komplementär an die Zielsequenz an. Während der Amplifikation synthetisiert die DNA-Polymerase bei 72 °C den komplementären DNA-Strang.

Dieser Ablauf verläuft zyklisch mehrere Male hintereinander, dabei wird das PCR-Produkt mit jedem weiteren Zyklus exponentiell vervielfältigt. Dabei wird die Konzentration des PCR-Produktes gegen die PCR-Zykluszahl auf logarithmische Weise dargestellt.

#### 2.20.2.1 ThermoCycler-PCR

Für die Untersuchung des *FBLN4*-Promotors auf DNA-Hypermethylierung mittels Bisulfitsequenzierung wurde bisulfitumgewandelte DNA aus Prostatakarzinom-Zelllinien, einer Harnblasenkarzinom-Zelllinie, zwei Prostatakarzinom-Gewebeproben sowie einer Blutprobe verwendet. Gleichzeitig diente als Positivkontrolle eine universell methylierte DNA (vgl. 3.5). Diese wurde mit *SssI*-Methyltransferase behandelt, deren Funktion in der Methylierung von Cytosinen in allen CpG-Dinukleotiden besteht. Als Probenmaterial wurde jeweils 4 µl DNA (aus 20 µg/µl DNA) eingesetzt. Der zu pipettierende Mastermix der Reaktionen setzte sich pro 50 µl-Ansatz wie folgt zusammen:

**Tabelle 20 Mastermix Primerpaar Biseq-FBLN4**

Komponenten	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer (Finnzymes)	1 x
Fwd-Primer	10 pmol
Rev-Primer	10 pmol
dNTPs	150 µM
HotStar Taq DNA Polymerase	5 U
dH <sub>2</sub> O	ad 46 µl

Nach Optimierung der PCR-Bedingungen ergaben sich für den T3 ThermoCycler folgende PCR-Programme:

**Tabelle 21 PCR-Bedingungen Primerpaar Biseq-FBLN4**

Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
94 °C	15 min	1
95 °C	30 sec	38
60 °C	30 sec	
72 °C	45 sec	
72 °C	10 min	1

Es wurden jeweils 20 µl PCR-Produkt der Reaktionen mit 6 x Auftragspuffer vermischt und über ein Agarosegel (2%) aufgetrennt.

### 2.20.3 Quantitative real-time PCR

#### 2.20.3.1 TaqMan-PCR

Während die qualitative PCR nur eine Darstellung des Endprodukts ermöglicht, bietet die quantitative *real-time* PCR (QRT-PCR) den Vorteil der Detektion des Produkts vom Ansatz bis zur Auswertung.

Für die TaqMan-PCR wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl benötigt (Tabelle 22). Zum Einsatz kamen cDNA aus Prostata-Tumor- (vgl. 2.2, Tabelle 4) und Prostata-normalgewebe, sowie aus verschiedenen Prostatazelllinien (vgl. 2.1.1). Jede cDNA wurde 1:20 verdünnt und in der TaqMan PCR Reaktion (TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG) mit spezifischen Primern für die unterschiedlichen Gene (*FBLN*, *SPOCK1* und *TENC*) verwendet. Um die relative Expression der Zielgene zu quantifizieren, wurde eine Standardkurve durch serielle Verdünnung einer ausgewählten cDNA durchgeführt. Der TaqMan PCR Universal Mastermix wurde manuell vorbereitet, in eine 96-Well Mikrotiterplatte übertragen und auf Eis gestellt. Nach Mischen des Ansatzes wurde als letztes cDNA hinzugeführt (Tabelle 22).



**Tabelle 22 Mastermix Real-time PCR-Assay (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)**

Reaktion Component	Gesamtvolumen (20 µl)
2 x TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG	10
20 x Assay-on-demand™ Gene Expression Assay Mix	1
cDNA	2
Aqua dest.	7

Anschließend wurde die Platte mit optischen Deckeln verschlossen sowie bei 1500 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Jede Probe wurde jeweils 2x gemessen. Zur Analyse wurde als Reaktionsgefäß ein MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate® (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) in den Thermocycler ABI PRISM® 7900HT Sequenz Detektionssystem überführt. Die PCR beinhaltete zuerst eine 10 Minuten dauernde Präinkubation bei 95 °C, nachfolgend 40 Zyklen mit DNA-Denaturation bei 95 °C über 15 Sekunden und Primerbindung / DNA-Synthese bei 60 °C über 60 Sekunden.

Der TaqMan-PCR Assay ermöglicht gemeinsam die Amplifikation und den Nachweis des PCR-Produktes. Die Methode basiert auf der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase. Zwischen den zwei spezifischen Oligonukleotid-Primern liegt ein zusätzliches, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid, die so genannte TaqMan-Probe. TaqMan-Proben sind Sonden, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem intern eingebauten oder am 3'-Ende liegenden Quencher markiert sind. Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die Taq-Man-Probe in kleine Fragmente, wodurch es zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher kommt und die Reporterfluoreszenz freigesetzt werden kann. Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist wiederum proportional der Menge der cDNA. Der Anstieg der Fluoreszenz wird mit Hilfe des ABI Prism® 7900HT Sequence Detektors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst. Die Quantifizierung der Fluoreszenzänderung erfolgt über die Berechnung einer Standardkurve. Die Produktmenge wächst exponentiell, erreicht aber dann ein Plateau.

Die Fluoreszenzzunahme wurde mit der ABI PRISM®-Enterprise Software 2.2.1 (Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland) als Ct-Wert oder auch „threshold cycle“ gemessen. Dabei stellt der Ct-Wert einen zuvor definierten Fluoreszenz-Wert dar, der sicher über den Hintergrund hinaus bestimmt werden kann.

Die relative Expressionsstärke wurde ausgedrückt als Quotient der Ct-Werte zwischen dem Kandidatengen und einem Referenzgen. Als Referenzgen diente *TBP* [Schmidt et al., 2006]. Verwendet wurden Real-time PCR-Assays (Assay-on-demand™ Gene Expression Assay Mix) (Tabelle 23). Alle Proben wurden mindestens doppelt gemessen.



**Tabelle 23 Real-time PCR-Assays**

Genname	Hs-Nummer
<i>FBLN1C</i>	00242546
<i>FBLN1D</i>	00972628
<i>EFEMP2</i> ( <i>FBLN4</i> )	00213545
<i>FBLN5</i>	00197064
<i>SPOCK1</i>	00270274
<i>TENC</i>	00233648

Die aufgelisteten Real-time-Assays sind kommerziell erhältliche, validierte Primer Assays mit der zugehörigen Bestellnummer.

### 2.20.3.2 Genkopienzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Genkopienzahl auf Chromosom 22q13.31 (*FBLN1*), 5q31 (*SPOCK*) und 5q31.1 (*EGR1*) wurde in dieser Arbeit die *real-time* PCR-Methode auf dem ABI Prism<sup>®</sup> SDS 7300 durchgeführt.

Für die Genkopienzahlbestimmung wird die Methode der relativen Quantifizierung von Genen ohne Bestimmung einer absoluten Genkopienzahl eines Gens genutzt. Dabei geht man davon aus, dass im Normalgewebe für das Zielgen und das Referenzgen bezüglich der Genkopienzahl keine Veränderungen vorliegen ( $\Delta\text{CT}=0$ ). Im Gegensatz dazu können im Tumorgewebe Steigerungen in der Genkopienzahl des Zielgens gegenüber dem Referenzgen auftreten. Dabei kann sich die PCR-Zykluszahl bzw. der Ct-Wert ( $\Delta\text{CT}=1$ ) verschieben, wobei das Verhältniss des Zielgens gegenüber dem Referenzgen im Tumor gegenüber Normal erhöht wird.

Die Berechnung der *real-time* PCR-Methode zur relativen Quantifizierung der Genkopienzahl erfolgt nach der abgewandelten Delta-Delta-Ct ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ) Methode, durch die RNA (Gentranskripte) und DNA (Genkopien) untersucht werden können. Dabei wird die Kopienzahl eines Zielgens in der untersuchenden Probe (Tumor) ins Verhältnis zu einem Kontrollgewebe (Normalgewebeprobe) gebracht und auf ein Referenzgen (Haushaltsgen) normalisiert. Das Haushaltsgen tritt in jeder Zelle ubiquitär auf, und zeigt keine Änderungen in der Kopienzahl. Die Unterschiede in der Expression des Zielgens und des Referenzgens wurden in Form einer Ratio geboten und über die Delta-Delta-Ct-Methode berechnet. Das erste Delta ( $\Delta_1$ ) stellt die Abweichung der Ct-Werte eines Zielgens zum Referenzgen dar, das zweite Delta ( $\Delta_2$ ) die Abweichung der Ct-Werte der beiden Gene in der Probe (Tumor) gegenüber der Kontrolle (Normalgewebeprobe).

#### ▪ Berechnung von $\Delta\text{Ct}$ (Gleichung 1)

→  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$

#### ▪ Berechnung von $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Gleichung 2)

→  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Probe} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$

**▪ Berechnung der Ratio (Gleichung 3)**

→ Ratio =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

**▪ Berechnung der Genkopienzahl (Gleichung 4)**

→ Ratio x 2 = Genkopienzahl

Dabei stellt die Gleichung 3 eine relative Genkopienzahl als das Ergebnis dieser Methode dar. Die Gleichung wird in Form einer Ratio dargestellt und als die x-fache Amplifikation (DNA) eines Zielgens gegenüber einem Referenzgen bezeichnet. Zur Berechnung der Genkopienzahl wurde die Ratio mit dem Faktor 2 (Ratio x 2) multipliziert (Gleichung 4). Dabei wird ausgegangen, dass ein Normalgewebe (Normalgewebeproben) diploid ist und 2 Kopien des untersuchten Gens enthält.

Die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Delta-Delta-Ct) Methode stellt eine Methode ohne Effizienzkorrektur dar, in der für alle untersuchten Proben eine Verdopplung der DNA-Menge (E=2) in jedem Zyklus vorausgesetzt wird. So entspricht die PCR-Effizienz nur einem theoretischen Wert.

Für die Genkopienzahlbestimmung wurden handelsübliche SNP (single nucleotide polymorphism) Genotyping Assays eingesetzt (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Dabei wurden SNPs mit Exon-Sequenzen ausgewählt, die eine streng einseitige Verteilung zeigen und einem Allel, das in der deutschen Population in erster Näherung als einziges vorkommt. Informationen zu der rs- (reference SNP) Nummer, den Polymorphismen, chromosomaler Lokalisation und Art des SNP-Typs zeigt Tabelle 24.

**Tabelle 24 Verwendete SNP-Assays zur Genkopienzahlbestimmung**

Genname	rs-Nummer	Chrom. Lokalisation	Polymorphismen-Typ Mögliche Basen	Transkript. Base Nummer
<i>FBLN1</i>	1802787	22q13.3	C/G Missense	1673
<i>SPOCK1</i>	17170968	5q31	A/G Silent	541
<i>ERG1</i>	1803556	5q31.1	G/T 3' UTR	2373
<i>TOP2B</i>	11129202	3p24	C/G Intron	0

Zwei Tumorproben mit stark abweichenden Werten für das Referenzgen, wahrscheinlich aufgrund von Allelverlusten, wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen (daher 45 statt 47 Proben).

Die *TOP2B* (Topoisomerase Il Beta) auf dem Chromosom 3p wurde als Referenzgen eingesetzt, da Veränderungen der Genkopienzahl auf 3p in Prostatakarzinomen selten vorkommen [Erkens et al., 2006].

Als Kontrollgewebe wurden 3 Prostanormalgewebeproben verwendet. Nach Vorversuchen wurden je 10 ng DNA pro Reaktion eingesetzt (Tabelle 25). Für jedes Gen wurden alle Proben doppelt gemessen.

**Tabelle 25 Mastermix SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)**

Reaktion Component	Gesamtvolumen (20 µl)
2 x TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG	10
40 x Assay-on-demand™ Gene Expression Assay Mix	0,5
DNA	2
Aqua dest.	7,5

In den verwendeten SNP-Assays wurden je Allel zwei unterschiedliche fluorogene Sonden eingesetzt, wobei die eine an ihrem 5'Ende einen Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM und die andere den Fluoreszenzfarbstoff VIC als Reporterfarbstoffe enthalten.

## 2.21 Western-Blot-Analyse

Western Blotting ist ein immunologisches Verfahren, mit dem auch recht geringe Mengen eines Proteins in einer Zelle nachgewiesen werden können. Mit dieser Methode sollte überprüft werden, wie sich das mRNA-Expressionsniveau von Fibulin-1D und Fibulin-5 in Zelllinien auf Proteinebene fortsetzt. Dazu werden Proteine von Zellextrakten einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unterworfen. Die aufgetrennten Proteine werden dann auf einer Membran immobilisiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgt über indirekte Immunfluoreszenz. Als Proben wurden Proteinlysate von Prostatakarzinom-, Harnblasenkarzinom-Zelllinien und nicht entarteten Prostata- und Nieren-Gewebe verwendet. Die Proteinlysate wurden freundlicherweise von Michèle Hoffmann zur Verfügung gestellt. Als Positivkontrollen wurde das Lysat von normalem Prostatagewebe eingesetzt. Um Aussagen über Expressionsunterschiede zwischen unterschiedlichen Zelllinien treffen zu können, wurde zusätzlich durch Immundetektion der Nachweis des  $\alpha$ -Tubulin-Proteins als Referenz geführt.

### 2.21.1 Präparation von Proteinlysaten

Hierzu wurden die Zellen zusammen mit Lysis-Puffer auf dem Schüttler für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und zur Homogenisierung mehrfach durch eine Kanüle gezogen. Nach fünf-minütiger Zentrifugation bei 12.000 g wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Zur Präparation von Lysaten aus Prostata- und Nierengewebe wurde ähnlich verfahren. Als Ausgangsmaterial stand Gewebepulver zur Verfügung. Hiervon wurden 20 mg in Lysispuffer gelöst und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines käuflichen Nachweissystems nach Herstellerangaben.

### 2.21.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese über ihre unterschiedlichen Molekulargewichte aufgetrennt

werden. Die Denaturierung der Proteine einer Probe wird durch einen SDS-haltigen Ladepuffer erreicht. Dieser Puffer enthält zur Reduktion von Disulfidbrücken zusätzlich Mercaptoethanol. Durch Bindung der SDS-Anionen an die Hauptketten des Proteins erhält dieser Komplex eine negative Ladung, die proportional zur Masse des Proteins ist. Die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins ist vernachlässigbar. Zusätzliches SDS im Laufpuffer hält das Protein im denaturierten Zustand. Aufgrund der anionischen Sulfatreste des Detergenz wandern die Proteine im elektischen Feld zur Anode.

Für den Gellauf wurde zunächst ein 10%-iges Polyacrylamidgel als Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach einstündiger Polymerisation wurde die Sammelgellösung luftblasenfrei auf das Trenngel pipetiert und der Kamm eingesetzt. Nach Entnahme des Kamms wurden in der Laufkammer die Geltaschen mit Laufpuffer gespült.

Pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Hierzu wurde das entsprechende Probevolumen mit einfach konzentriertem Auftragspuffer versetzt, 2 min bei 99 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 70 V, der Trennlauf bei 150 V.

### 2.21.3 Protein Blot

Das Proteingel aus dem Elektrophoreselauf fand unmittelbar weitere Verwendung für den Proteinblot. Die Proteine wurden auf einer Immobilon<sup>TM</sup>-P-Membran immobilisiert. Dazu wurde der Elektroblot luftblasenfrei aufgebaut und anschliessend in die Kammer des Nassblotters eingesetzt. Der Blotvorgang erfolgte bei 2 mA/cm<sup>2</sup> Gel für etwa 1,5 h.

### 2.21.4 Immundetektion

Die Immundetektion der Zielproteine erfolgte über indirekte Immunlumineszenz. Hierfür wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen der Blotmembran durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in Blockpuffer bzw. Sigma Solution gesättigt. Die Inkubation mit dem zielproteinspezifischen Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht in Blockpuffer mit einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers (MEM-2 für Fibulin-1D: 1,104 µg/ml; DANCE für Fibulin-5: 100 ng/ml; anti-Tubulin: 200 ng/ml). In mehreren Waschsritten wurden überschüssige Antikörper-Moleküle entfernt. Auch die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper) erfolgte für 1 h unter Schwenken mit der entsprechenden Lösung (80 ng/ml) nach Herstellerangaben. Im Anschluss an mehrere Waschsritte mit TBS wurde die Peroxidasereaktion mit einem lumineszierenden Farbstoff gestartet. Hierfür wurden pro Membran 1 ml der im Kit enthaltenen Peroxidase-Nachweislösung mit 1 ml der *Enhancer*-Lösung vermischt und die Membran darin für 1 min geschwenkt. Die Membran wurde luftblasenfrei in Folie verpackt und in der Dunkelkammer gegen geeignete Chemolumineszenzfilme exponiert. Die Belichtungszeit variierte von 10 sec bis zu 3 min.

## 2.22 Immunhistochemische Analyse der Proteinexpression in Geweben

Die immunhistochemischen Färbungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Engers, Institut für Pathologie übernommen. Dafür wurden Gewebeproben, die von denselben Proben mit einer relativ hohen oder niedrigen Expression von *FBLN1*- oder *FBLN5*-mRNA (je fünf Karzinome) genommen wurden, untersucht. Die verwendeten Paraffinschnitte von Gewebeproben wurden zunächst mit Xylol und Ethanol deparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Blockierung endogener Peroxidase-Aktivitäten erfolgte durch  $H_2O_2$ . Nach der Antigendemaskierung mit Hilfe von EDTA, bei pH 9 (Fibulin-1) oder einem Citratpuffer, beim pH 6 (Fibulin 5) in einem Schnellkochtopf, wurde endogenes Biotin blockiert. Die Objektträger wurden mit beiden Antikörpern gegen Fibulin-1 (MEM-2, Alexis) bei einer Verdünnung von 1:20 oder gegen Fibulin-5 (DANCE, R&D Systems) bei einer Verdünnung von 1:400 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einer zweiten Inkubation mit einem biotinkonjugierten polyvalenten Antikörper wurden die Objektträger gemischt mit einem Avidin-Biotin-Peroxydase-Reagenz (Scy Tek, Logan, USA). Die Reaktionsprodukte wurden visualisiert durch das Eintauchen der Objektträger in Diaminobenzidin-Tetrachlorid und abschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt.

## 2.23 Immuncytochemische Analyse von Proteinexpressionen

Mit Hilfe der immuncytochemischen Analyse sollten die Resultate der immunhistochemischen Analyse bzgl. der extrazellulären Lokalisation der Fibulin-Proteine 1 und 5 bestätigt werden. Zudem sollten die Resultate der cDNA-Expression in den Prostatazelllinien untersucht werden.

Für die Färbungen wurden Zellen verschiedener Zelllinien in 6-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät. Die Aussaat der Zellen wurde über Nacht adhärent wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur mit 3% Formaldehyd fixiert. Nach einer Trocknungsphase von 5 min wurden die Zellen mit TBS-Puffer (50 ml 1 M Tris, 33 ml 5 M NaCl, pH 7,4) gewaschen. Nach Zugabe von  $NaBH_4$  (1 mg/ml) für 5 min wurden die Zellen erneut mit TBS gewaschen. Zum Blocken wurden die Deckgläschen für 1 h mit Maus-Serum inkubiert (1:50 in PBS verdünnt). Nach einem Waschschrift wurden die Deckgläschen in die Antikörperlösungen gelegt und für 1 h bei Raumtemperatur gelagert. Die Antikörper wurden in PBS verdünnt (Fibulin-1D: 5,52 ng/ $\mu$ l; Fibulin-5: 10 ng/ $\mu$ l). Die Zellen wurden erneut gewaschen und in die Sekundärantikörperlösungen gelegt (ALEXA 488 Ziege anti-Maus 10 ng/ $\mu$ l). Zur Gegenfärbung der gesamten Zellen wurde der Antikörper-Verdünnung Evansblue (0,01%) zugesetzt. Da die Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren Waschgängen wurden die Deckgläschen kurz getrocknet, eingedeckelt und fixiert. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop Nikon Eclipse E400.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Expressionsanalyse der Kandidatengene

##### 3.1.1 Die Fibulin-Gene *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5*

Aufgrund ihrer Bedeutung als extrazelluläre Matrixproteine und der deutlichen Anzeichen auf eine Beteiligung an der Entstehung verschiedener Tumoren, wurden *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5* (vgl. 1.4), *SPOCK1* (vgl. 1.6) und *TENC* (vgl. 1.5) in ihrer Expression gemessen. Dabei wurden in Relation zum Haushaltsgen *TBP* 47 Prostatakarzinom- und 13 Prostatanormal-Gewebeprobe mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan-PCR) untersucht (vgl. 2.20.3.1). Von den 47 Prostatakarzinom-Gewebeprobe befanden sich 20 Karzinome im Stadium pT2, 25 im Stadium pT3 und 2 im pT4-Stadium (vgl. 2.2 Tabelle 4). Alle Tumoren gehörten zur Kategorie M0, d.h. zum Zeitpunkt der Operation waren in keinem Fall Fernmetastasen nachzuweisen (vgl. 2.2 Tabelle 4). Bei 12 Patienten konnten Lymphknotenmetastasen gefunden werden. In 13 Fällen entsprach die Gleason-Summe der Tumore  $\leq 7$ , in 26 Fällen 7 und in 8 Fällen  $\geq 7$ . Das Patientendurchschnittsalter lag innerhalb einer Altersgruppe von 59 bis 76 Jahre bei 67,5 Jahren.

Bei der Untersuchung der mRNA von *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5* konnte eine deutlich signifikante Abnahme der Expression in tumorösem gegenüber benignem Gewebe gemessen werden (Abbildung 6A-D).

Die Expression von *FBLN1C* und *FBLN1D* in den Tumorproben lag im Mittelwert um 53,4% bzw. 50,3% geringer im Vergleich zu den Normalproben. In den Tumorproben zeigte die Expression von *FBLN1C* und *FBLN1D* eine deutliche Korrelation (Tabelle 26), wobei die Expression von *FBLN1* ebenfalls mit der von *FBLN4* gut korrelierte, jedoch nur schwach mit der *FBLN5*-Expression.

Auch die Expression der übrigen Fibulin-Gene *FBLN4* und *FBLN5* war im Vergleich zu Normalgewebe im Mittel um 34% bzw. 30% vermindert.

Abbildung 6 Expressionsniveau von *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5*

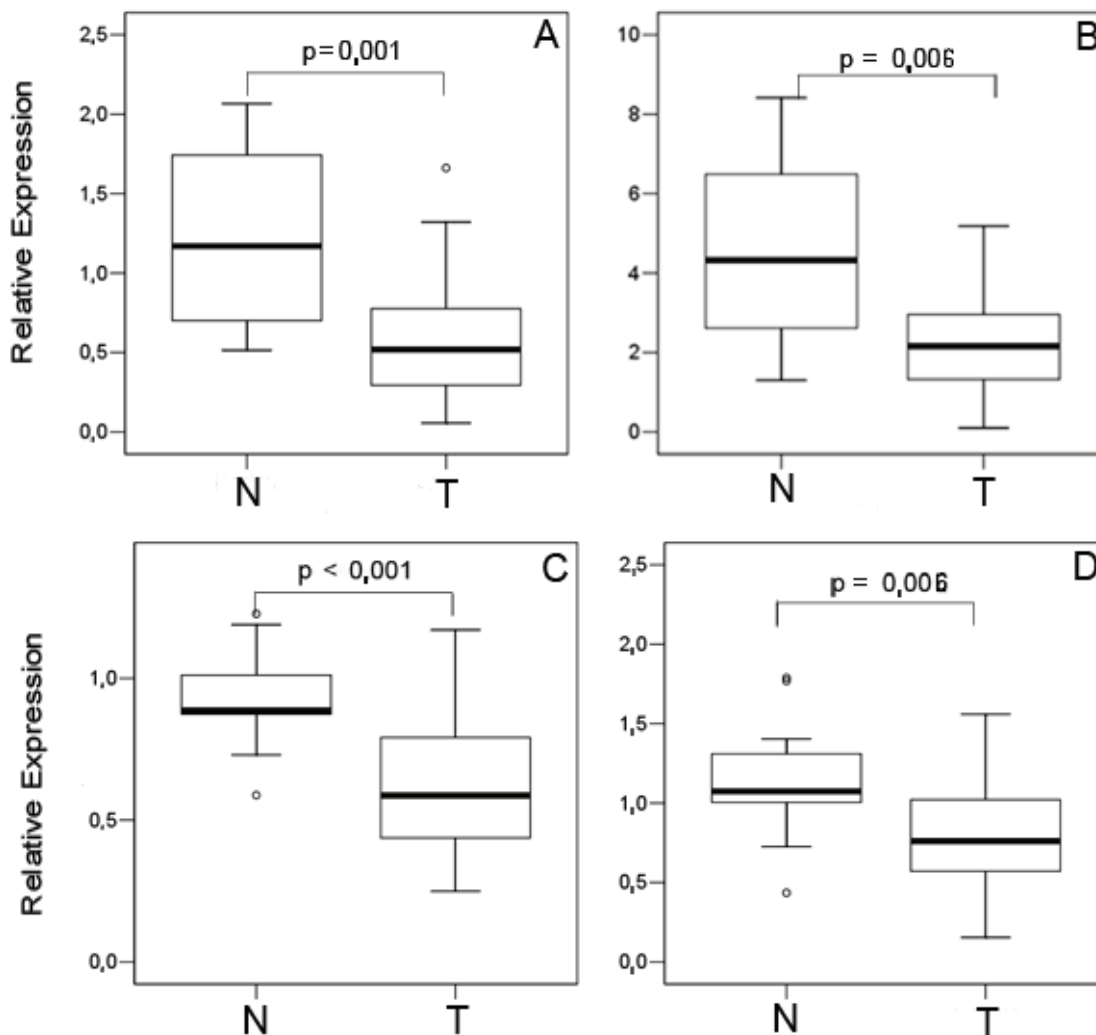


Abbildung 6: Expressionsniveau von *FBLN1C* (A), *FBLN1D* (B), *FBLN4* (C) und *FBLN5* (D) in 47 kanzerösen (T) gegenüber 13 benignen (N) Gewebeproben relativ zu TBP. Boxplot-Darstellung: Die untere Kante der Kästen im Boxplot-Diagramm zeigt den 25%-Wert, die obere den 75%-Wert, so dass 50% der Fälle innerhalb der Kästen liegen. Kreise bezeichnen außergewöhnlich hohe oder niedrige Werte. Senkrechte Linien mit Querbalken, sog. Whiskers, sind von der unteren und oberen Kastenkante gezogen. Die größten und kleinsten Werte (ausgenommen Ausreißer) werden mit diesen Linien eingegrenzt. Signifikanzwerte nach T-Test.

### 3.1.2 Das Testican-1-Gen *SPOCK1* und Tenascin-C-Gen *TENC*

Ergänzend wurde die Expression von zwei weiteren Genen gemessen, *SPOCK1* und *TENC*, die für Proteine der extrazellulären Matrix kodieren, Testican-1 (vgl. 1.6) und Tenascin-C (vgl. 1.5). Diese Gene waren ebenfalls in der letzten Mikroarrayuntersuchung aufgefallen, wobei eine signifikant höhere *SPOCK1*-mRNA Expression in einer Untergruppe von Prostatakarzinomen zu finden war. Dagegen wurde kein Unterschied in der mRNA-Expression von *TENC* beobachtet, obwohl Veränderungen von *TENC* in einer Reihe anderer Tumoren häufig sind (vgl. 1.5).



In der quantitativen RT-PCR wies *SPOCK1* im Prostatakarzinom-Gewebe eine deutliche Expressionserhöhung im Mittel um 57% im Vergleich zum Prostatanormalgewebe (Abbildung 7A) auf. Die Expression von *SPOCK1* zeigte jedoch eine entgegengesetzte Korrelation zu den Fibulingenen (Tabelle 26).

*TENC* lag zwischen Tumor- und benignem Gewebe unverändert vor (Abbildung 7B) und zeigte keine signifikante Korrelation zu der Expression der Fibulin-Gene.

**Abbildung 7** Expressionsniveau von *SPOCK1* und *TENC*

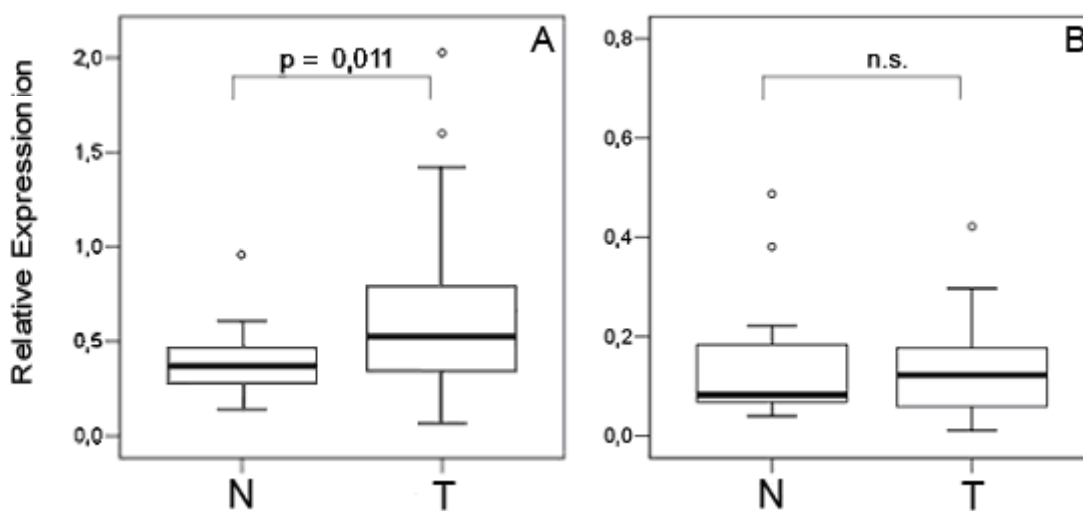


Abbildung 7: Expressionsniveau von *SPOCK1* (A) und *TENC* (B) in 47 kanzerösen (T) gegenüber 13 benignen (N) Gewebeproben relativ zu TBP. Signifikanzwerte nach T-Test. n.s.: nicht signifikant

**Tabelle 26** Korrelationen zwischen den untersuchten Genen im Prostatagewebe, nach Pearson (\*)  $p < 0,01$ , (\*\*)  $p < 0,001$

Genname	<i>FBLN1C</i>	<i>FBNL1D</i>	<i>FBLN4</i>	<i>FBLN5</i>	<i>SPOCK1</i>	<i>TENC</i>
<i>FBLN1C</i>	1	.754(**)	.754(**)	.351(**)	-.501(**)	.054
<i>FBLN1D</i>	.754(**)	1	.579(**)	.481(**)	-.363(**)	.085
<i>FBLN4</i>	.754(**)	.579(**)	1	.648(**)	-.402(**)	.190
<i>FBLN5</i>	.351(**)	.481(**)	.648(**)	1	-.046	.316(*)
<i>SPOCK1</i>	-.501(**)	-.363(**)	-.402(**)	-.046	1	-.008
<i>TENC</i>	.054	.085	.190	.316(*)	-.008	1

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,001 (2-seitig) signifikant

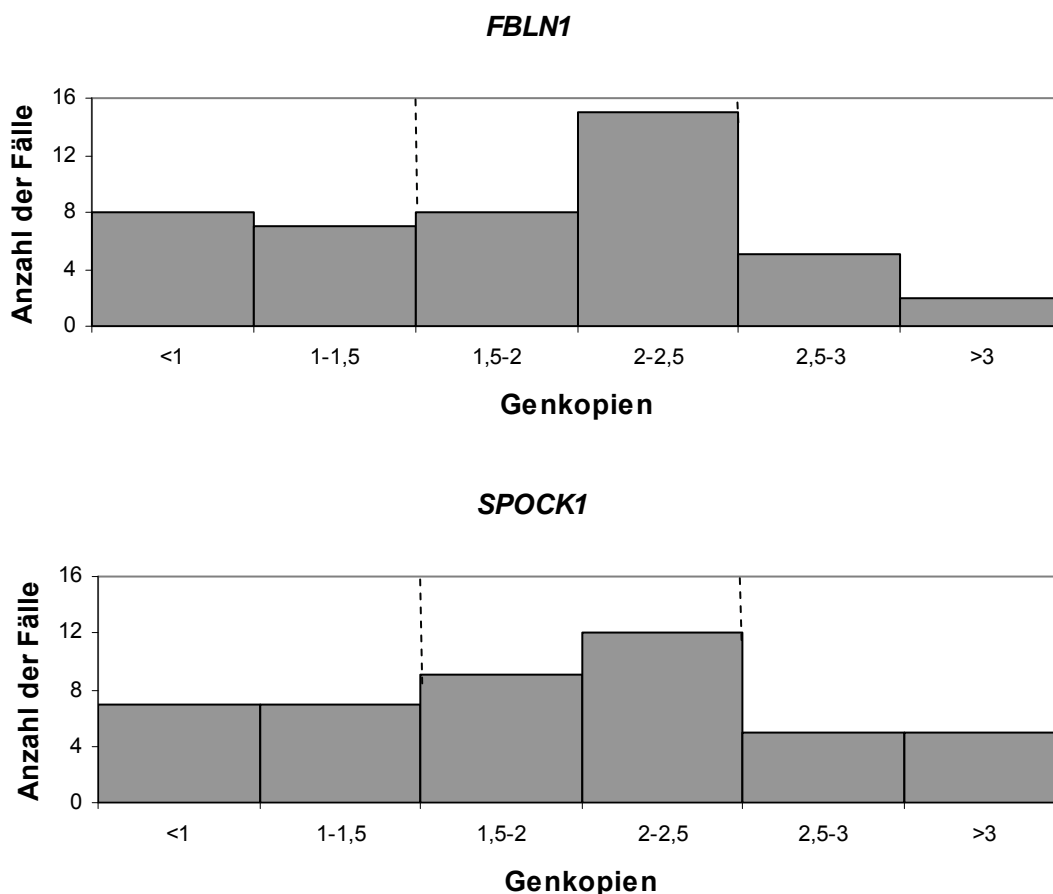
### 3.2 Genkopienzahl von *FBLN1*, *SPOCK1* und *EGR1*

Zur Quantifizierung der *FBLN1*-, *SPOCK1*- und *EGR1*-Genkopienzahl wurden 45 Prostatakarzinom-Gewebeproben und 3 Prostatanormalgewebeproben mittels quantitativer Real-time PCR durch das ABI Prism® SDS 7300 Sequence-Detector-System untersucht (vgl. 2.20.3.2). *FBLN1*-Gen ist lokalisiert auf dem Chromosom

22q13.3, das *SPOCK1*-Gen auf dem Chromosom 5q31 und *EGR1* als direktes Nachbarn von *SPOCK1* auf 5q31.1 (vgl. 2.20.3.2, Tabelle 24). In der CGH-Analyse [Schulz et al., 2007] unterlag Chromosom 22q Verlusten bei 11/47 (23%) der untersuchten Tumoren und zeigte nur in einer einzigen Probe Zugewinn ( $p = 0,031$ ). Entgegengesetzt zu 22q fand sich bei Chromosom 5q31 ein Anstieg in der Kopienzahl bei 16/47 (34%) Tumoren und eine Abnahme in nur zwei Fällen ( $p = 0,025$ ). Für *FBLN4* (lokalisiert auf dem Chromosom 11q13) und *FBLN5* (lokalisiert auf dem Chromosom 14q32.1) wurde kein Zusammenhang zwischen den Expressionsunterschieden und den CGH-Ergebnissen gefunden. Diese Ergebnisse hatten nahe gelegt, dass Änderungen in der Genkopienzahl zu einer veränderten Expression von *FBLN1* und *SPOCK1* beitragen könnten, dieser Mechanismus jedoch von geringerer Bedeutung für eine veränderte Expression von *FBLN4* und *FBLN5* zu sein scheint.

Daher wurden die Genkopienzahlen von *FBLN1* und *SPOCK1* in der vorliegenden Arbeit mittels quantitativer Real-time PCR untersucht (Abbildung 8). Aufgrund der Lokalisation von *EGR1* auf Chromosom 5q31.1 wurde auch seine Genkopienzahl gemessen. Als Normalbereich wurde eine Genkopienzahl zwischen 1,5 und 2,5 laut Messung betrachtet. Als interne Kontrolle wurde der mRNA-Gehalt des Referenzgens *TOP2B* auf dem Chromosom 3p24 bestimmt, da dieser Chromosomenabschnitt im Prostatakarzinom selten von Änderungen betroffen ist [Erkens et al., 2006].

**Abbildung 8 Genkopienzahl von *FBLN1*, *SPOCK1* und *EGR1***



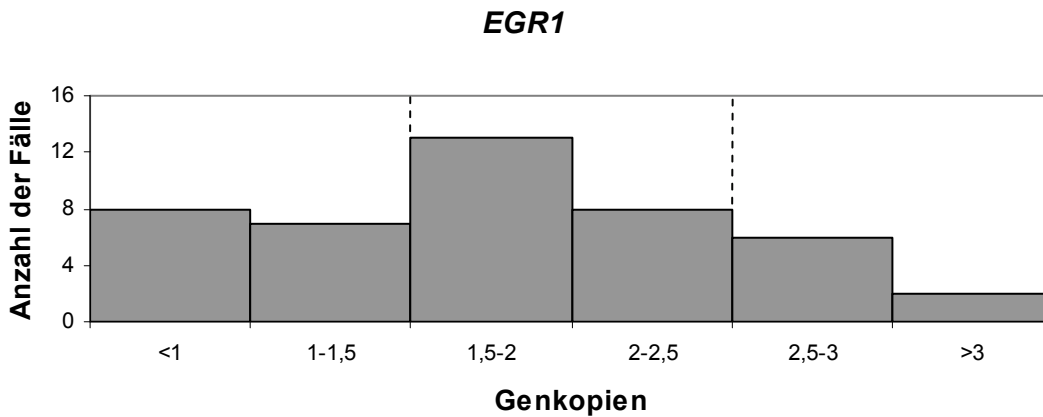


Abbildung 8: Genkopienzahl von *FBLN1*, *SPOCK1* und *EGR1* in 45 kanzerösen Gewebeproben relativ zu *TOP2B*. Die gestrichelten Linien zwischen 1,5 und 2,5 stellen den Normalbereich für die Genkopienzahl dar.

Von den 45 untersuchten Proben zeigten 15 (33%) Verluste in der Genkopienzahl für *FBLN1* (< 1,5 Kopien) im Vergleich zu 7 (16%) mit Zugewinnen (>2,5 Kopien). Für *SPOCK1* lagen in 14 Fällen (31%) Verluste in der Genkopienzahl vor und für 10 (22%) Zugewinne, einschließlich 5 Fällen mit >3mal höherer Genkopienzahl im Vergleich zu nur 2 solchen Fällen für *FBLN1*.

Für *EGR1* lagen in 15 Fällen Verluste und in 8 Fällen Zugewinne vor. Im Gegensatz zu den Erwartungen ergab sich eher eine verminderte Genkopienzahl (Abbildung 8).

### 3.3 Korrelation mit klinischen Parametern

Weiterhin wurde die mRNA-Expression von *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5* sowie *SPOCK1* und *TENC* in Tumoren verglichen, die Lymphknotenmetastasen oder keine zeigten, bei denen im weiteren Verlauf ein Rezidiv oder keines auftrat sowie bei Tumorproben mit Stadium pT2 gegenüber pT3 und pT4 (vgl. 2.2). In den 45 untersuchten Proben zeigten die mRNA-Expressionswerte aller untersuchten Gene keine signifikanten Veränderungen zwischen Tumorproben mit oder ohne Lymphknotenmetastasen oder Rezidiv. Die mRNA-Expressionen fast aller Gene waren im Tumorstadium pT3 und pT4 im Vergleich zu pT2 ebenfalls nicht signifikant verändert. Nur für *FBLN4* konnte eine signifikante Verminderung der mRNA-Expression im Stadium pT3 und pT4 gegenüber pT2 nachgewiesen werden ( $p=0,012$ ). Unter Berücksichtigung der multiplen Tests (6 Gene, 2 klinische Parameter) ist diese Veränderung als statistisch grenzwertig einzuschätzen. Zusammengefasst lässt sich folgern, dass die beobachteten Veränderungen offenbar generell in Prostatakarzinomen auftreten, in der Regel unabhängig von Tumorstadium und weiterem klinischen Verlauf.

### 3.4 Expression und Regulation der Fibulin-Gene in Prostatakarzinom-Zelllinien

Da die niedrige Expression der Fibulin-Gene auf erhöhter DNA-Methylierung der Genpromotoren beruhen könnte, wurde das Expressionsniveau nach Behandlung von Prostatakarzinom-Zellen mit dem Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-aza-dC) bestimmt. Diese Behandlung erhöht in vielen Fällen das

Expressionsniveau von durch Hypermethylierung inaktivierten Genen. Die Expression der Fibulin–Gene wurde im Vergleich zu normalen Prostataepithelzellen (PrEC) als Kontrolle untersucht.

Passend zu den Expressionsergebnissen in den Gewebeproben konnte für *FBLN1C* und *FBLN1D* eine ähnlich verminderte Expression in allen Prostatakarzinom-Zelllinien festgestellt werden (Abbildung 9). Interessanterweise zeigten zwei Prostatakarzinom-Zelllinien, welche keinen Androgenrezeptor aufweisen (DU145, PC-3), eine höhere Expression als die übrigen (22Rv1, LNCaP, MDAPCa2b). Die Behandlung mit 5-aza-dC erzielte jedoch keine Induktion der *FBLN1* Expression.

Ebenfalls ergab sich für *FBLN4* eine deutlich erhöhte Expression in normalen Prostataepithelzellen (PreC) gegenüber allen Prostatakarzinom-Zelllinien, ausgenommen MDAPCa2b (Abbildung 9).

In allen Prostatakarzinom-Zelllinien mit niedriger *FBLN4*-Expression konnte eine relativ geringe, jedoch reproduzierbare Induktion (schwarze Balken) durch 5-aza-dC erlangt werden. Besonders deutlich war die Induktion in PC-3-Zellen.

Die *FBLN5*-Expression in androgenrezeptor-negativen Zelllinien, DU145 und PC-3, übertraf diejenige in normalen Prostataepithelzellen (PreC), während die Expression in androgenrezeptor-positiven Zelllinien niedriger vorlag als in Kontrollzellen. Durch die Behandlung mit 5-aza-dC wurde nur ein geringer Anstieg der Expression erzielt (Abbildung 9).

Abbildung 9 Expressionsniveau von *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5*

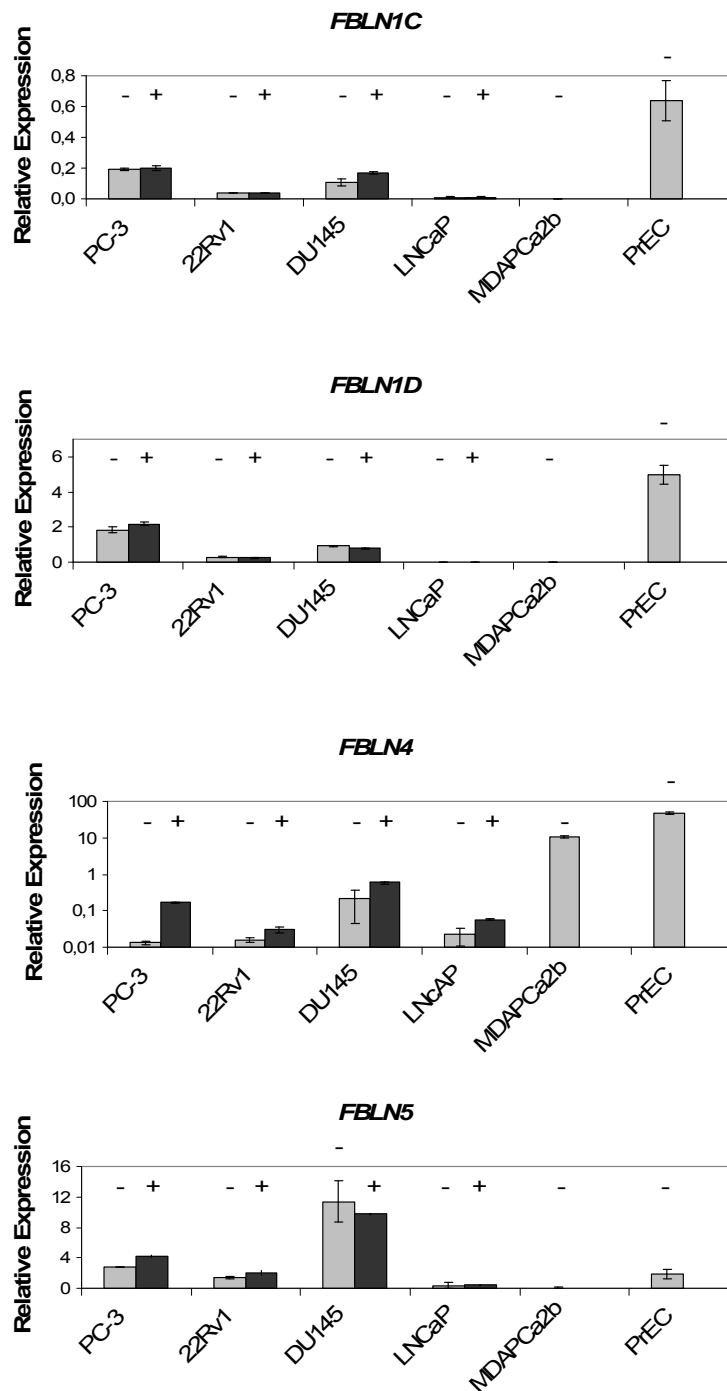


Abbildung 9: Expressionsniveau von *FBLN1C*, -1D, -4 und -5 in Prostatakarzinom-Zelllinien (PC-3 bis MDAPCa2b) und normalen Prostataepithelzellen (PreC), relativ zum Haushaltsgen *TBP*. Schwarze Balken geben das jeweilige Expressionsniveau nach Behandlung der Zellen mit 5-aza-dC an.

### 3.5 Untersuchung der DNA-Methylierung der *FBLN4*-Promotorregion

Da in allen Prostatakarzinom-Zelllinien eine Induktion der *FBLN4*-Expression mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-aza-dC erzielt werden konnte, wurde der *FBLN4*-Promotor auf DNA-Hypermethylierung untersucht (Abbildung 10). Dazu wurden in einem Areal um den Transkriptionsstart insgesamt 26 CpG-Dinukleotide mittels Bisulfitsequenzierung auf ihren Methylierungsstatus geprüft.

**Abbildung 10 Untersuchung des *FBLN4*-Promotorbereiches mittels Bisulfitsequenzierung**

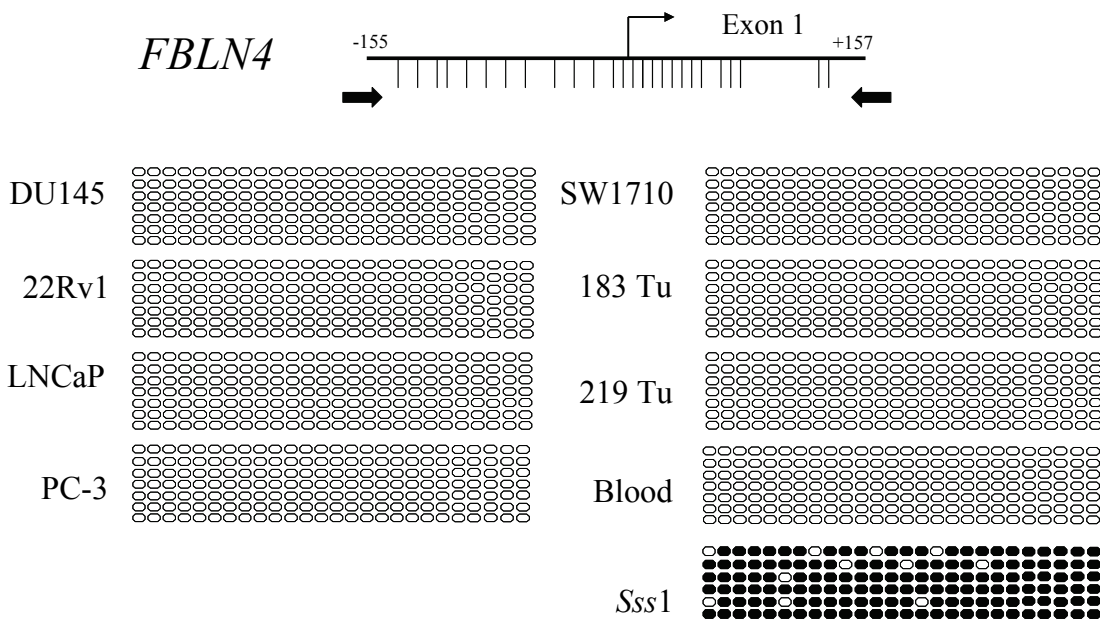


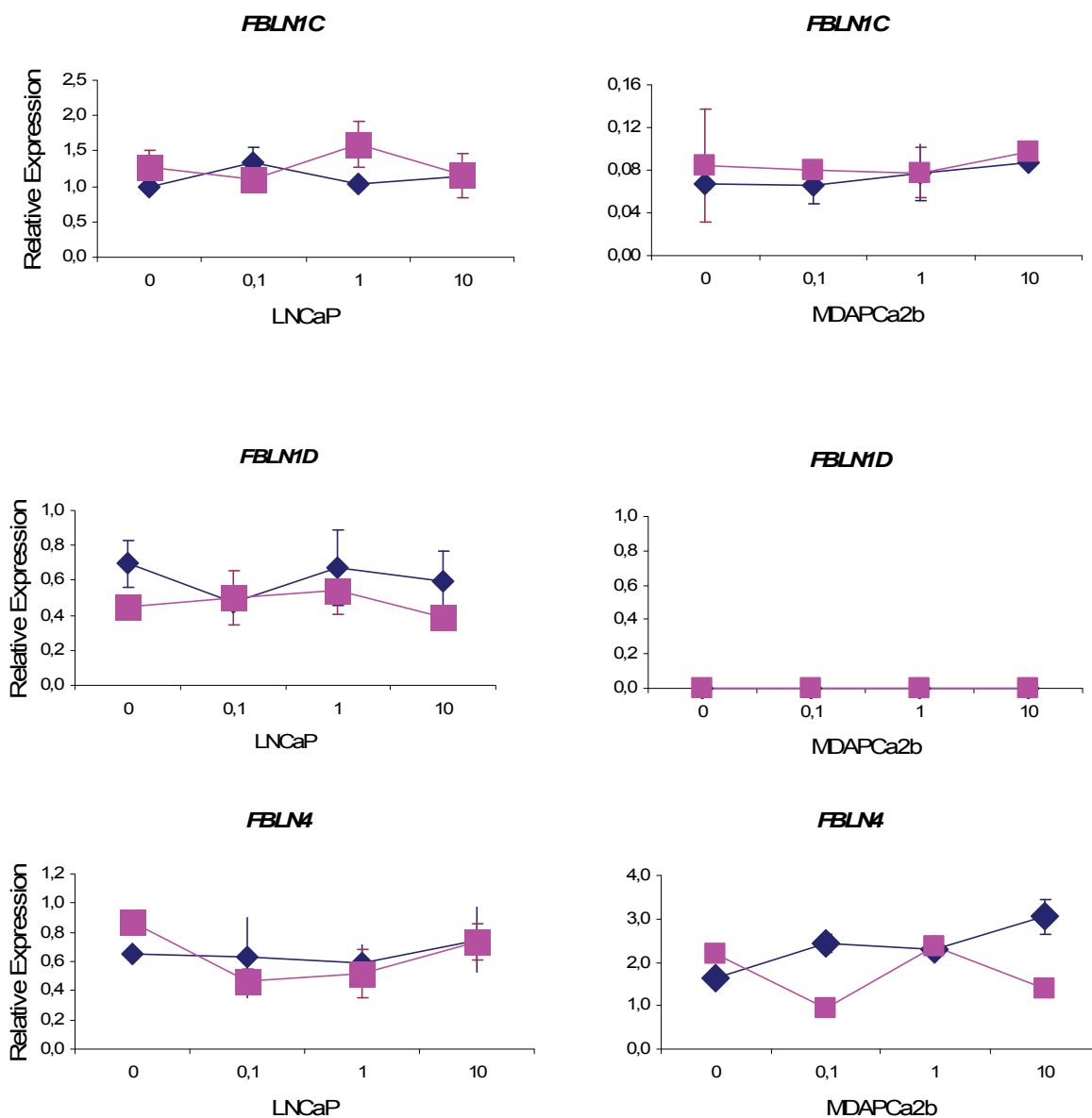
Abbildung 10: DU145 bis PC-3: Prostatakarzinom-Zelllinien; SW1710: Harnblasenkarzinomzelllinie; Tu: Tumorgewebe; Blood: Blutleukozyten; Sss1: Positivkontrolle. Oben: Der Transkriptionsstart ist als schlanker Pfeil angegeben, breitere Pfeile zeigen die Lokalisation der PCR-Primer an, senkrechte Striche unterhalb die relative Lage der 26 untersuchten CpG-Dinukleotide zueinander. Unten: Jedes Kreissymbol steht für ein CpG-Dinukleotid; schwarze Kreise zeigen Methylierung an; weiße Kreise bedeuten keine Methylierung. Jede Reihe steht für einen untersuchten Klon, der die DNA eines einzelnen Allels in einer Zelle entspricht. Für jede Probe wurden wenigstens 6 Klone sequenziert.

Untersucht wurden DNA-Proben aus vier Prostatakarzinom-Zelllinien, einer Harnblasenzelllinie, zwei Tumorgewebeproben, Blutleukozyten sowie als Positivkontrolle eine mit SssI-(CpG)-Methylase behandelte DNA aus Leukozyten (vgl. 2.20.2.1). Die Methylierungsanalyse ergab in keiner der Zelllinien eine Methylierung der Cytosine, trotz der Ergebnisse nach 5-aza-dC-Induktion. Ferner fehlte in zwei Prostatakarzinom-Gewebeproben mit der niedrigsten Expression von *FBLN4* die Methylierung in der Promotorregion. Die DNA von Blutleukozyten lag ebenfalls absolut unmethyliert vor, wohingegen beinahe alle CpG-Dinukleotide der DNA, die in vitro mit SssI-(CpG)-Methylase behandelt wurden, methyliert waren (Abbildung 10).

### 3.6 Einfluss eines Androgens auf die Expression der Fibulin-Gene

Es wurde berichtet, dass die Fibuline durch Östrogene reguliert werden [Bardin et al., 2005]. Um den Einfluss der Androgene auf die *FBLN*-Expression zu untersuchen, wurden androgensensible Zelllinien LNCaP und MDAPCa2b mit synthetischem Androgen R1881 mit einer Konzentration von 0,1 nM, 1 nM und 10 nM, für 6 h und 12 h behandelt. Die Expressionsspiegel für *FBLN1C*, *FBLN1D*, *FBLN4* und *FBLN5* wurden mittels quantitativer Realtime-PCR relativ zu *TBP* ermittelt (Abbildung 11). Es wurde jedoch keine signifikante Induktion beobachtet.

Abbildung 11 Wirkung von Androgenen auf Fibulin-Expression





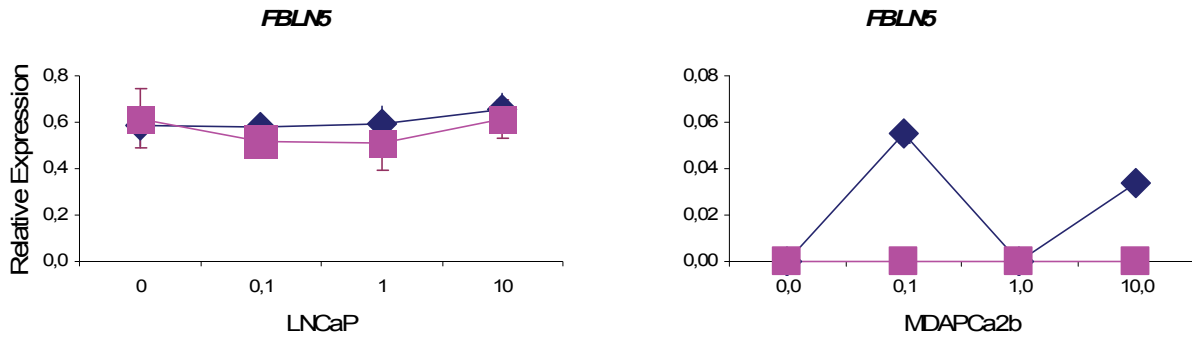


Abbildung 11: Untersuchung der FBLN1C-, FBLN1D-, FBLN4- und FBLN5-mRNA-Expression relativ zu TBP mittels quantitativer RT-PCR mit Behandlung durch synthetisches Androgen R1881 nach 6 (blau) und 12 Stunden (rosa). Es wurden zwei androgensensible Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und MDAPCa2b verwendet. Bei der Darstellung sind die unterschiedlichen Skalen zu beachten. So bewegen sich die scheinbaren Schwankungen der FBLN5-Expression in MDAPCa2b auf extrem niedrigem Niveau.

### 3.7 Western-Blot-Analyse der Fibulinexpression in Prostatakarzinom-Zelllinien

Bei der Expressionsanalyse auf Proteinebene wurde für Fibulin-1D eine Proteinbande bei 73 kDa und für Fibulin-5 bei 55 kDa unter der Annahme erwartet, dass keine posttranslationale Modifikation stattfindet (Abbildung 12).

Für Fibulin-1D wurden als Positivkontrolle Proteinlysate aus normalem und tumorösem Nierengewebe verwendet. Diese zeigten eine Proteinbande bei ca. 63 kDa, die unter Beachtung der Bandenstärke für  $\alpha$ -Tubulin (50 kDa) als Ladungskontrolle, ein schwaches Signal ergab. Außerdem wurden Prostatakarzinom-Zelllinien untersucht. Den mRNA-Expressionsdaten entsprechend zeigte die Zelllinie PC-3 im Vergleich zu allen anderen Prostatakarzinom-Zelllinien auch die höchste Fibulin-1D-Expression, jedoch lag das starke Signal statt der erwarteten 73 kDa bei ca. 55 kDa. Bei den normalen Prostataepithelzellen (PreC), die auf mRNA-Ebene die stärkste Expression im Vergleich zu allen Zelllinien zeigten, konnte keine Proteinbande nachgewiesen werden, ebenfalls bei den übrigen Prostatakarzinom-Zelllinien.

**Abbildung 12 Proteinblot zum Nachweis von Fibulin-1D und Fibulin-5 in Prostatakarzinom-Zelllinien.**

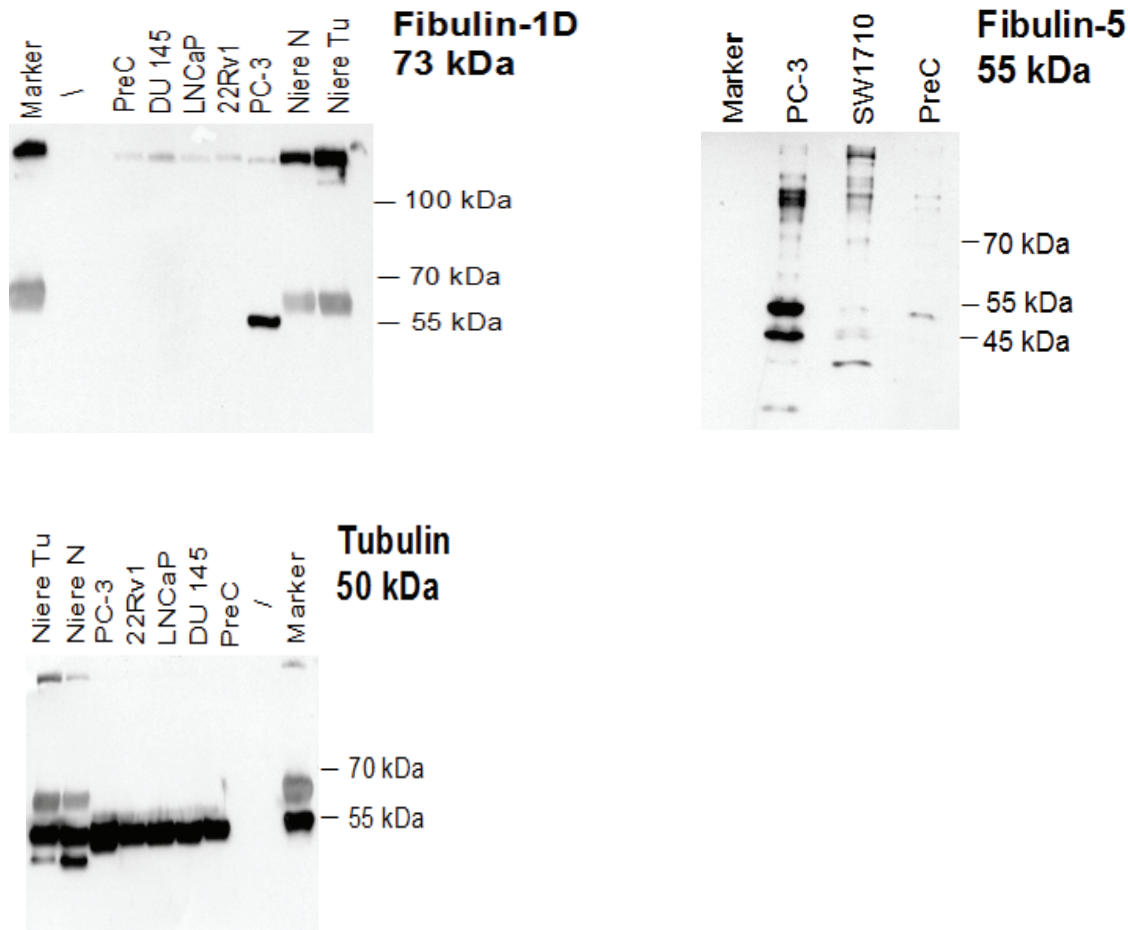


Abbildung 12: Proteinblot zum Nachweis von Fibulin-1D und Fibulin-5 in Prostatakarzinom-Zelllinien und einer normalen Prostataepithelzellen (PreC). Als Vergleichskontrollen wurden Proteinlysate aus normalem und tumorösem Nierengewebe für Fibulin-1D und für Fibulin 5 PreC verwendet. Aufgetragen sind jeweils 20  $\mu$ g Protein. Als Ladungskontrolle erfolgte anschließend für Fibulin-1D der Nachweis von  $\alpha$ -Tubulin.

Für Fibulin-5 wurden Proteinlysate aus einer Prostatakarzinom-Zelllinie (PC-3), einer Harnblasenzelllinie (SW1710), sowie benignen Prostataepithelzellen (PreC) als Positivkontrolle verwendet. Entsprechend den mRNA-Expressionsdaten zeigte die Zelllinie PC-3 auch eine erhöhte Proteinexpression. Diese wies zwei Proteinbanden bei ca. 45 kDa und 55 kDa auf. Die übrigen Zelllinien-Lysate ergaben vergleichbar schwache Proteinbanden, die sich im Bereich zwischen 45 kDa und 55 kDa befanden (Abbildung 12).

### 3.8 Verteilung von Fibulin-1 und Fibulin-5 im Prostatagewebe

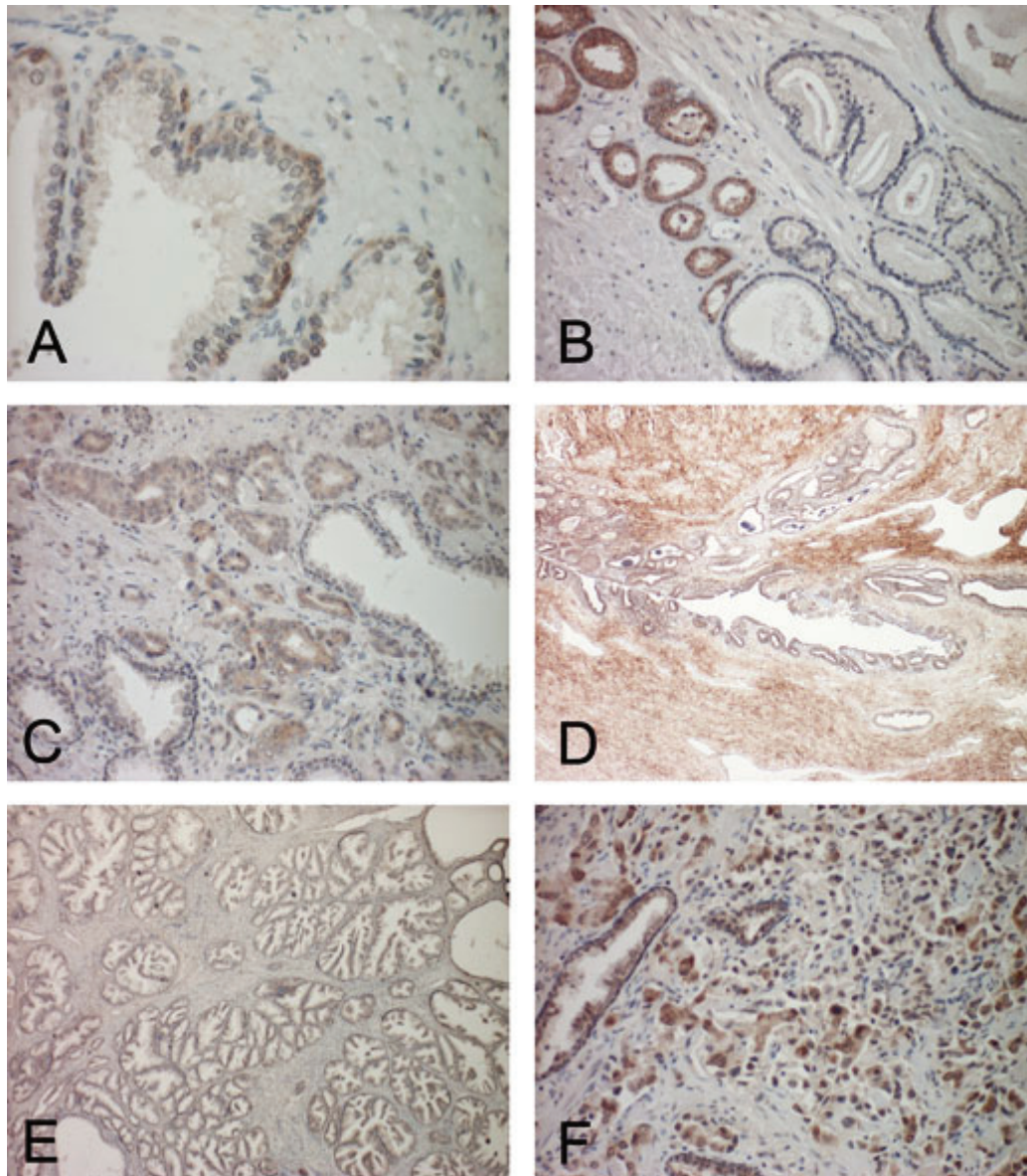
Zur Untersuchung der Fibulin-1- und Fibulin-5-Expression im Gewebe wurde Paraffin-Material von Prostatakarzinom immunhistochemisch mit dem Fibulin-1-Antikörper (MEM-2) sowie mit dem Fibulin-5-Antikörper (DANCE) gefärbt (Abbildung 13). Untersucht wurden jeweils mehrere Präparate mit hoher oder niedriger mRNA-

Expression für Fibulin-1- und Fibulin-5 im Prostatagewebe. Für Fibulin-4 stand kein geeigneter Antikörper zur Verfügung.

In morphologisch normalen Prostataedrüsen waren die sekretorischen Epithelzellen überwiegend negativ oder zeigten nur fokal eine schwache positive Färbung für Fibulin-1. Ähnlich wiesen die Basalzellen nur fokal eine schwache positive Färbung in einigen benignen Drüsen auf. Die Mesenchymzellen waren überwiegend negativ (Abbildung 13A). In Prostatakarzinom-Arealen zeigte Fibulin-1 eine hochvariable und heterogene Expression (Abbildung 13B). Überall war tendenziell eine stärkere intrazelluläre Fibulin-1-Expression im Prostatakarzinom im Vergleich zu jeweiligen benignen Drüsen zu sehen (Abbildung 13C). In der ECM war Fibulin-1 kaum nachweisbar. Vielmehr wurde eine Akkumulation von Fibulin-1 im Zytosol der Karzinomzellen beobachtet.

Im Gegensatz zu Fibulin-1 zeigte Fibulin-5 eine intensive Färbung in der ECM mit absteigenden Gradienten von der periurethralen Zone (Abbildung 13D) zur peripheren Zone (Abbildung 13E). In Übereinstimmung mit den mRNA-Expressionsergebnissen waren die meisten Tumore negativ oder nur schwach positiv. Nur in zwei Tumoren mit vergleichsweise hoher *FBLN5*-mRNA-Expression fand sich eine intrazelluläre Akkumulation von Fibulin-5 (Abbildung 13F). Im Gegensatz zu Fibulin-1 zeigte Fibulin-5 in einigen Fällen nicht nur eine zytoplasmatische Expression, sondern auch eine im Nukleus der Tumorzellen (Abbildung 13F). Es ist unwahrscheinlich, dass diese nukleäre Färbung auf einem Artefakt beruht, weil sie sich heterogen in den Tumorzellen verteilte und in den angrenzenden benignen epithelialen Zellen komplett fehlte.

**Abbildung 13 Immunhistochemischer Nachweis von Fibulin-1 und Fibulin-5 im Prostatagewebe**



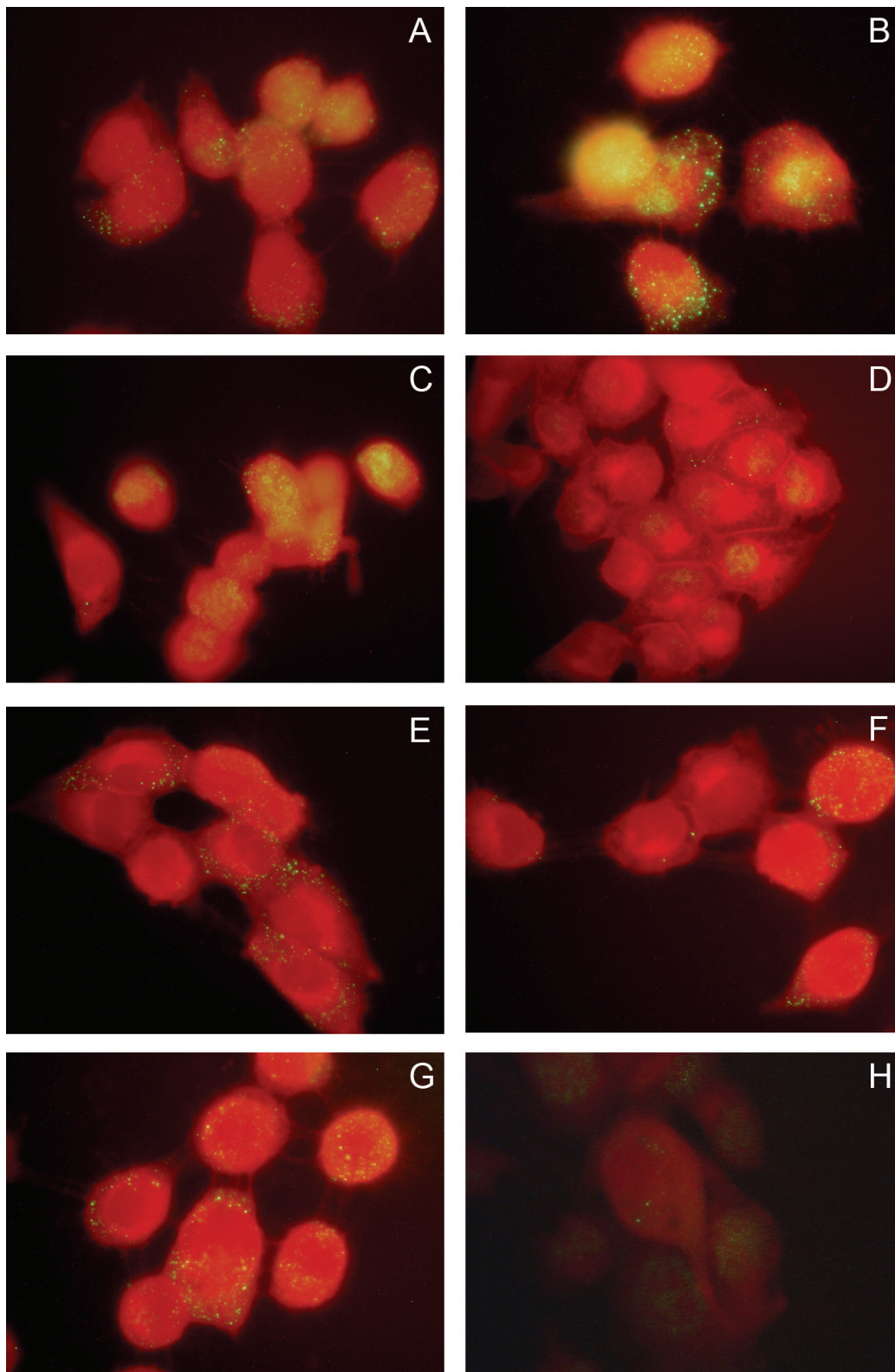
*Abbildung 13: A-C: Lokalisation von Fibulin-1: nur ganz fokale, schwach positive Färbung in sekretorischen Epithelzellen und mittelgradige positive Reaktion der Basalzellen (dunkelbraun) (A); heterogene Expression im Tumor (B); stärkere Expression im Tumor als in den angrenzenden benignen Drüsen (C) D-F: Lokalisation von Fibulin-5: starke Färbung in der periurethralen ECM (D); schwache Färbung peripher (E); starke intrazelluläre Färbung im Tumor (F).*

### 3.9 Immuncytochemische Analyse

Zur Etablierung eines immuncytochemischen Färbeprotokolls wurde der Fibulin-5-Antikörper (DANCE) eingesetzt. Die Färbeverfahren für Fibulin-1 lieferten keine eindeutigen Ergebnisse (Ergebnisse nicht dargestellt). Für den Nachweis von Fibulin-5 wurden dabei zwei Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145 und 22Rv1) auf Deckgläschen ausgesät.



**Abbildung 14** Immuncytochemischer Nachweis von Fibulin-5



*Abbildung 14: Fibulin-5 (grüne Fluoreszenz) in zwei Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 (A-G) und 22Rv1 (H) mit Evansblue-Gegenfärbung (rot).*

Die Prostatakarzinom-Zelllinie Du145 wurde als Positivkontrolle gefärbt (Abbildung 14 A-G), da diese auf mRNA-Ebene ein hohes Expressionsniveau gezeigt hatte. Fibulin-5 zeigt hier eine punktförmig betonte perinukleäre Lokalisation im Cytoplasma

der Zellen. Bei der Prostatakarzinom-Zelllinie 22Rv1 lag entsprechend einem niedrigeren Expressionsniveau auf mRNA-Ebene ein schwächerer Nachweis von Fibulin-5 perizellulär vor (Abbildung 14H).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Grundsätzliche Überlegungen zum Kontext der Arbeit

Störungen in der Struktur und der Zusammensetzung der ECM und insbesondere der Basalmembran unterhalb des Epithels spielen im Prostatakarzinom eine entscheidende Rolle (vgl. 1.3.2). Diese Veränderungen sind durch morphologische Untersuchungen des Prostatakarzinoms generell lange bekannt. Seit neuerem wurde eine veränderte Expression zahlreicher individueller ECM-Proteine durch Mikroarray-Expressionsanalysen im Vergleich von benignen und kanzerösen Prostatageweben oder verschiedenen Untergruppen der Prostatakarzinome entdeckt. Die Auflistung unterschiedlich exprimierter Gene aus den wichtigsten Untersuchungen dieser Art, wie sie z.B. in der Oncomine Datenbank [<http://www.oncomine.com>] zusammengestellt wurden, enthält Hinweise auf Expressionsänderungen für zahlreiche Mitglieder aus der Kollagen- und Lamininfamilie. Obwohl der Mechanismus, der diesen Veränderungen zugrunde liegt, bisher kaum im Detail untersucht worden war, deuteten die verfügbaren Untersuchungen auf überwiegend epigenetische Veränderungen hin, die dafür verantwortlich seien. Beispielsweise wurden bei einigen Lamininen Abnahmen durch veränderte DNA-Methylierung ihrer Gene beobachtet [Sathyanarayana et al., 2003]. Laminine bilden eine Familie von heterotrimeren Proteinen, die üblicherweise in der Basalmembran gefunden werden (vgl. 1.3.1). Diese großen Moleküle fördern Zelladhäsion und steuern Migration über Integrine und andere Zelloberflächenrezeptoren.

Auf ähnliche Weise werden Veränderungen beim Heparansulfat in der ECM der Prostatakarzinome von ansteigender Heparanaseexpression beeinflusst, die mit der Hypomethylierung ihres Genpromotors assoziiert ist [Ogishima et al., 2005] (vgl. 1.2). Heparansulfat und Heparansulfat-Proteoglykane sind ubiquitäre und wesentliche Bestandteile der ECM und der Basalmembran. Über die Spaltung von Heparansulfat durch die Heparanase ist diese aktiv in dem Prozess der Tumordinvasion und der Metastasierung beteiligt. Die Veränderung der Heparanaseexpression kann von der Überexpression des Transkriptionsfaktors Egr-1 ausgelöst werden [Ogishima et al., 2005]. Vom Egr-1 wurde berichtet, dass er im Prostatakarzinom häufig überexprimiert vorkommt [Abdulkadir et al., 2001] und in engem Zusammenhang mit der Pathogenese und der Progression steht [Adamson et al., 2003] (vgl. 1.6).

Vor diesem Hintergrund war es nicht überraschend, dass ein Mikroarrayvergleich von Prostatakarzinomen [Schulz et al., 2007], der zum Teil auf Unterschieden in der DNA-Methylierung basierte, Laminine und Fibuline als differentiell exprimierte Gene ergab. Da bisher keine Untersuchungen zu Fibulinen im Prostatakarzinom publiziert worden waren, waren diese Ergebnisse Anlass, die Expression von drei Fibulingenen im Prostatakarzinom zu untersuchen. Dabei wurde aus den oben genannten Gründen besonderer Schwerpunkt auf die DNA-Methylierung als potentieller Mechanismus für veränderte Genexpression gelegt.

### 4.2 Verminderte Expression aller Fibulingene

Die Mikroarrayuntersuchung hatte Anhaltspunkte für eine Herunterregulation der mRNA für drei unterschiedliche Fibulingene, *FBLN1*-, *FBLN4*- und *FBLN5*, in einer bestimmten Untergruppe der Prostatakarzinome im Vergleich zu benignem Gewebe ergeben [Schulz et al., 2007]. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass diese Herunterregulation in den Prostatakarzinomen im Vergleich zu benignem Gewebe häufig anzutreffen ist. Dabei wurde kein Zusammenhang mit dem Tumorstadium



beobachtet, was nahe legt, dass es sich bei den Expressionsveränderungen um relativ frühe und konsistente Ereignisse im Prostatakarzinom handeln könnte. Im Fall von *FBLN1* und *FBLN4* wurde die Herunterregulation der jeweiligen Expressionsniveaus auch in Prostatakarzinom-Zelllinien im Vergleich zu kultivierten normalen Prostataepithelzellen gezeigt.

Da berichtet worden war, dass unterschiedliche Expressionen der *FBLN1C*- und *FBLN1D*-Spleißformen das Tumorwachstum beeinflusst [Moll et al., 2002; Qing et al., 1997] (vgl. 1.4), wurden beide Varianten untersucht. Dennoch war in allen Prostatagewebeproben, sowohl in benignen als auch kanzerösen, sowie in den Zelllinien, das Verhältnis der beiden Spleißvarianten im Wesentlichen konstant. Demnach sind funktionelle Unterschiede zwischen diesen Spleißvarianten für das Prostatakarzinom wahrscheinlich unerheblich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine verminderte Expression aller *FBLN*-Gene in Prostatakarzinom-Gewebeproben gemessen. Fibuline sind an einer Vielfalt von Vorgängen im Gewebe beteiligt, wie dem Wachstum, der Adhäsion und der Motilität von Zellen (vgl. 1.4). Verminderte Expressionen verschiedener *FBLN*-Gene wurden von einigen Studien in anderen Karzinomen gefunden, so auch im Kolonkarzinom, in dem die Verminderung von Fibulin-1 in Zusammenhang mit einer Überexpression des Chemokins CXCL1 (GRO $\alpha$ ) gebracht wurde [Wen et al., 2006]. Da ebenfalls von einer zunehmenden CXCL1-Expression im Prostatakarzinom berichtet wurde [Moore et al., 1999], könnte dieses Chemokin auch im Prostatakarzinom für die verminderte Expression von Fibulin-1 verantwortlich sein.

Frühere Studien beschrieben *FBLN5* als ein Zielgen für die Hemmung der Angiogenese und als allgemeinen Tumorsuppressor [Albig et al., 2006]. Passend dazu wurden bereits verminderte Expressionen von *FBLN5* in anderen Tumoren, wie Mamma-, Nieren-, Ovarial- und Kolonkarzinom beschrieben (vgl. 1.4), so dass die Ergebnisse dieser Arbeit gut zur allgemeinen Hypothese passen, Fibulin-5 wirke als Tumorsuppressor.

Im Zusammenhang mit der verminderten Expression der drei Fibulin-Gene könnten auch Autoimmunprozesse eine Rolle spielen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine verminderte Expression des Fibulin-6-Gens beim Sjögren-Syndrom nach Behandlung mit spezifischen Autoantikörpern ermittelt [Sisto et al., 2009]. Das Sjögren-Syndrom ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die zu einer verminderten Tränen- und Speichelproduktion führt. Fibulin-1 wurde in Folge seiner Überexpression im Mammakarzinom als Autoantigen erkannt [Pupa et al., 2004]. In der oben genannten Microarray-Untersuchung [Schulz et al., 2007] fielen vor allem Gene der natürlichen Immunantwort auf. Im Prostatakarzinom muss man eine veränderte Fibulinexpression möglicherweise auch unter diesem Aspekt bedenken.

### 4.3 Epigenetische Rolle bei der Expression der Fibulin-Gene

Änderungen der Zelladhäsion und extrazellulärer Matrixproteine werden oft als Folge epigenetischer Einflüsse angesehen. Unter diesem Aspekt wurde in dieser Arbeit nach Hinweisen auf veränderte Methylierung der *FBLN*-Gene gesucht. So wurden Prostatakarzinom-Zelllinien, die eine niedrige Expression aufwiesen, mit dem DNA-Methyltransferaseinhibitor 5-aza-dC behandelt. Es wurde eine deutliche Induktion hypermethylierter Gene erwartet. Durch diese Behandlung wurde jedoch nur die Expression von *FBLN4* induziert, die einigermaßen gleichmäßig in allen Zelllinien nachzuweisen war. Die Bisulfitsequenzierung wies aber einen unmethylierten *FBLN4*-Promotor in allen Zelllinien und sogar in zwei Karzinomgewebeproben mit einer sehr niedrigen Expression nach. Die Wirkung von 5-aza-dC könnte deshalb

eher durch eine Demethylierung einer entfernteren regulatorischen Stelle erklärt werden. 5-aza-dC wirkt jedoch auch indirekt auf die Expression vieler Gene [Liang et al., 2002]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Induktion eines regulatorischen Faktors, wie Egr-1 im Falle des Heparanase-Gens [Ogishima et al., 2005]. Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es insgesamt eher unwahrscheinlich, dass die Verminderung der Fibuline im Prostatakarzinom durch DNA-Hypermethylierung verursacht wird, wie es bei verschiedenen Lamininen nachgewiesen wurde [Sathyanarayana et al., 2003].

In einer neueren Studie fand sich dagegen eine verminderte Expression von *FBLN1* in allen Zelllinien und den meisten primären Gewebeproben des Magenkarzinoms, die auf eine Hypermethylierung des *FBLN1*-Promotors zurückgeführt wurde [Cheng et al., 2008]. Dort wurde *FBLN1* als ein neues Tumorsuppressorgen vorgeschlagen, das im Magenkarzinom epigenetisch inaktiviert wird.

Ebenfalls gelang im Mammakarzinom der Nachweis, dass die Expression eines weiteren Fibulinmitglieds, des Fibulin-3, in etwa der Hälfte sporadischer Mammakarzinome auf RNA und Proteinebene vermindert ist. Dies wurde ebenfalls auf erhöhte Promotormethylierung zurückgeführt [Sadr-Nabavi et al., 2009].

Diese beiden Beobachtungen passen zur Hypothese dieser Arbeit, dass viele Veränderungen von ECM-Proteinen in Karzinomen durch epigenetische Mechanismen zustande kommen. Andere epigenetische Mechanismen, wie Histondeacetylierung, sollten in der Zukunft genauer untersucht werden.

#### 4.4 Expression von *SPOCK1* und *TENC*

In Übereinstimmung mit den Mikroarrayergebnissen wurde die mRNA für weitere ECM-Komponenten, *SPOCK1* (vgl. 1.6) und *TENC* (vgl. 1.5), untersucht. In der quantitativen RT-PCR lag die Expression von *SPOCK1* (Testican-1) im Prostatakarzinom-Gewebe im Vergleich zu Prostatanormalgewebe im Mittel um 57% erhöht vor (vgl. 3.1.2, Abbildung 7A). Bisher beschrieben Edgell et al. eine Expression der mRNA von Testican-1 in der normalen Prostata, dort v.a. in den Basalzellen, Stromazellen sowie großen und kleinen Blutgefäßen [Edgell et al., 2004]. In Tumoren existieren aktuell nur wenige Studien über Testican. Eine Studie dokumentierte eine reduzierte Expression von Testican in der metastasierten Form einer humanen Ösophaguskarzinom-Zelllinie im Vergleich zur nicht metastasierenden Ausgangslinie [Kawamata et al., 2003]. Da bisher keine Untersuchungen der Expression und Funktion von Testican-1 im Prostatakarzinom durchgeführt wurden, folgte im Rahmen dieser Dissertation die Messung des Expressionsniveaus von *SPOCK1*.

Das Expressionsprodukt von *SPOCK1*, Testican-1 ist bisher für seine tumorprotektive Funktion aufgrund der hemmenden Wirkung auf die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen sowie Cathepsin L bekannt (vgl. 1.6). Daher fallen funktionelle Begründungen für die gemessene erhöhte *SPOCK1*-Expression zunächst schwer. Es wurden auch bisher keine verstärkten *SPOCK1*-Expressionen in anderen Tumoren berichtet.

Im Vergleich zu den anderen Testicanen weist Testican-1 eine hohe Ähnlichkeit in der AS-Sequenz und Funktion zu Testican-3 auf (vgl. 1.6). Beide Testicane hemmen über ihre typische gemeinsame Domäne die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen und damit möglicherweise die Infiltration von Tumorzellen durch die Endothelzellen in die Gefäße, was einen kritischen Schritt in der Karzinominvasion und Metastasierung darstellt (vgl. 1.6). Dazu passt, dass ein Mangel an Testican-3-mRNA-Expression in metastasierten Gliomzellen registriert

wurde [Nakada et al., 2001]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie jedoch wurde zum ersten Mal eine verstärkte Expression von Testican-3-mRNA in frühen Stadien einer adulten T-Zell Leukämie gemessen [Kamioka et al., 2009]. Auf der Proteinebene mittels Westernblot konnte ebenfalls ein deutlicher Nachweis des Testican-3-Proteins bei dieser Leukämieform gelingen. Die Funktion von Testican-3 in der adulten T-Zell Leukämie ist bisher noch unbekannt, jedoch wurde eine Reduktion der Infiltration tumoröser Zellen durch die Hemmung der Matrix-Metalloproteinasen-Aktivierung vermutet.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine verstärkte Expression von *SPOCK1* in Prostatakarzinom-Gewebeproben gemessen, wobei in keinem Fall Fernmetastasen nachzuweisen waren. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Tumorzellen an dem Eindringen in die Gefäße durch Hemmung der Matrix-Metalloproteinasen über Testican-1 gehindert werden und somit die Bildung von Fernmetastasen verhindert wird. Allerdings ergab sich kein Zusammenhang zwischen Testican-1-Expression und Tumorstadium oder klinischem Verlauf. Um die Verhältnisse genauer zu verstehen, müsste Testican-1 auf Proteinebene auf sein Expressionsniveau untersucht werden. Speziell könnten immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von Testican-1 im Prostatakarzinom-Gewebe hilfreich sein. Nicht zuletzt müssten metastasierende Karzinome einbezogen werden.

Es wurde berichtet, dass Testican-1 neben der schon beschriebenen blockierenden Wirkung auf MT1-MMP und damit der Inhibierung der Aktivierung von Pro-MMP, auch ein Substrat für MT1-MMP darstellt (vgl. 1.6). Kudo et al. stellten fest, dass die Spaltung von Testican-1 bei Abwesenheit von TIMP-2 am effektivsten sei [Kudo et al., 2007]. Bei hohen TIMP-2-Konzentrationen wurde die Testican-1-Spaltung gehemmt. Ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhte *SPOCK1*-Expression im Rahmen dieser Arbeit könnte daher sein, dass Testican-1 im Prostatakarzinom-Gewebe durch die MT1-MMP gespalten wird und folglich eine verstärkte *SPOCK1*-Expression im Sinne einer Rückkopplung aktiviert wird.

Es ist bekannt, dass das Proteoglykan Testican als Glykosaminoglykan neben Chondroitinsulfat Heparansulfat enthält. Heparansulfat und Heparansulfat-Proteoglykane sind wesentliche Bestandteile der ECM. Die Heparanase, eine Endo- $\beta$ -D-Glucuronidase, besitzt die Fähigkeit, die Heparansulfat-Ketten von Heparansulfat-Proteoglykanen zu spalten und beteiligt sich am Abbau der ECM. Die Heparanase wurde auch im Prostatakarzinom nachgewiesen [Kosir et al., 1997] und ein Einfluss von Heparanase auf das Wachstum von Prostatakarzinom und Metastasierung in die Knochen und in andere Organe vermutet [Lerner et al., 2008]. Bisher ist die genaue Funktion der Glykosaminoglykane in Testican nicht bekannt. Edgell et al. vermuteten eine Wirkung der Glykosaminoglykane auf die Stabilität des Proteins und auf die Lokalisation im Gewebe. Eine Spaltung der Heparansulfat-Kette von Testican-1 könnte womöglich zu einer Instabilität des Proteoglykans und sogar seiner Inaktivierung führen. Wiederum in Form einer Rückkopplung könnte dann die verstärkte *SPOCK1*-Expression erklärt werden.

BaSalamah et al. beschrieben Testican-1 als instabile Form von 130 kDa in frischem Blutplasma, die in stabile Spaltprodukte konvertiert. Dabei ist nicht sicher, ob es in der 130 kDa Form die beschriebenen Funktionen erfüllt oder ob es für seine Aktivierung gespalten werden muss [Basalamah et al., 2001]. Ebenfalls steht nicht fest, ob und dann welche Funktionen die Spaltprodukte von Testican-1 erfüllen, die durch die MT1-MMP-Spaltung entstehen [Kudo et al., 2007]. Von einigen Studien wurden ECM-Proteine beschrieben, die nach ihrer Spaltung durch Matrix-Metalloproteinasen aktiviert wurden. Ein Beispiel für solches ECM-Protein ist Laminin-5, das nach der Spaltung durch Matrix-Metalloproteinase-2 in seiner

Funktion, der Förderung von Zellmigration, verstärkt wird [Giannelli et al., 1997]. Somit könnten in Bezug auf diese Arbeit im Prostatakarzinom aktivierte Testican-1-Spaltprodukte hervorgehen, die andere Funktionen aufweisen und womöglich zur Tumorprogression beitragen. Ein bekanntes Beispiel dieser Art sind Spaltprodukte von Kollagen, welche die Angiogenese modulieren.

Bei der Untersuchung der Tenascin-C-mRNA-Expression konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und benignem Gewebe nachgewiesen werden (vgl. 3.1.2, Abbildung 7B). Es wurde berichtet, dass Tenascin-C in den meisten soliden Tumoren ein hohes Expressionsniveau erreicht, besonders im Mammakarzinom, im Lungenkarzinom und den Gliomen [Orend et al., 2005; Orend und Chiquet-Ehrismann, 2006] (vgl. 1.5). In einer neueren Studie wurde eine erhöhte Expression von Tenascin-C in einer metastasierten Form des Prostatakarzinoms im Knochen gemessen, was darauf hindeutet, dass wahrscheinlich hohe Tenascin-C-Expressionen für die stromale Migration der Tumorzellen im Knochen benötigt werden [Sung et al., 2008]. Die unveränderte Expression von Tenascin-C in primären, nicht metastasierten Prostatakarzinomen könnte dahingehend interpretiert werden, dass sie für die Tumorzellmigration ausreichend ist.

#### **4.5 Lokalisation von Fibulin-1 und Fibulin-5 im Prostatagewebe**

Geeignete Antikörper für die Immunhistochemie standen für Fibulin-1 und Fibulin-5 zur Verfügung. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertungen ergaben keine vollkommene Übereinstimmung mit den Ergebnissen der mRNA-Analyse. Dies ist keineswegs unerwartet, da die Menge und die Verteilung der ECM-Proteine von vielen Faktoren beeinflusst werden. Zu diesen Faktoren zählen insbesondere die Effizienz der mRNA-Translation in das Protein, intrazelluläre posttranslationale Prozesse und Glykosylierung, die Sekretion und die Ablagerung der Proteine und der Umsatz, beispielsweise durch extrazelluläre Proteasen. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei zelleigenen Proteinen ist es möglich, dass die aktuell synthetisierten Proteinmengen bei extrazellulären Strukturproteinen nur einen Bruchteil der Gesamtmenge ausmachen. Außerdem könnte es aus technischen Gründen schwierig sein, Proteine, die tief in der Basalmembran verankert sind, durch Immunhistochemie nachzuweisen. Dies könnte besonders für Fibulin-1 gelten, zumal angenommen wird, dass eine abnorme Exposition von Epitopen, die üblicherweise in der Basalmembran tief verankert sind, sich im Mammakarzinom in Form des überexprimierten Fibulin-1 als Autoantigen auswirkt [Pupa et al., 2004].

Die oben genannten Gründe für die Schwierigkeit der Detektion der Fibuline lassen sich durch die Ergebnisse der Immunzytochemie an Prostatakarzinom-Zelllinien illustrieren, in denen Fibulin-5 eine punktförmig betonte perinukleäre Lokalisation im Cytoplasma der Zellen zeigte (vgl. 3.9, Abbildung 14). Der immunzytochemische Nachweis von Fibulin-5 ist nur sehr vorsichtig zu interpretieren, da es sich um eine Momentdarstellung der Zellen handelt, die Zellmigration und die Menge der Fibulin-5-Sekretion in die ECM oder im Kulturmedium jedoch mit dieser Methode nicht beurteilt werden können.

Es wird davon ausgegangen, dass Fibulin-1 in normalen Epithelien von Epithelzellen auf der Lamina basalis produziert wird, sowie von den darunterliegenden mesenchymalen Zellen und es innerhalb der Basalmembran abgelagert und eingebettet wird. Obwohl Fibulin-1 in der Immunhistochemie in der Basalmembran von normalen Prostatadrüsen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde Fibulin-1 entsprechend in einigen Basalzellen beobachtet, während die Expression in

sekretorischen Zellen fast vollständig fehlte. Offensichtlich war die Produktion von Fibulin-1 in gesunden Prostataedrüsen älterer Männer relativ niedrig. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, dass eine maximale Produktion von Tenascin-C bei dem Wachstumsschub in jugendlichen Prostatae beobachtet wurde [Shiraishi et al., 1994]. Dieser Befund könnte auch auf die anderen Bestandteile der ECM zutreffen.

Umso überraschender war die Beobachtung, dass obwohl die *FBLN1*-mRNA-Expression niedriger in Karzinomen vorlag, das Fibulin-1-Protein im Zytoplasma vieler Karzinomzellen nachgewiesen werden konnte. Da eine extrazelluläre Ablagerung des Proteins kaum beobachtet wurde, ist die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Befund, dass das Protein in Karzinomzellen aufgrund einer defekten Sekretion akkumuliert. Derartige Defekte sind für andere sekretorischen Proteine der Prostata gut dokumentiert, als Beispiel mögen hierfür die veränderten Formen des PSA dienen [Tabarés et al., 2007].

Einer weiteren Studie gelang ebenfalls durch immunhistochemische Färbungen der Nachweis von intrazellulärem Fibulin-1 in Tumorzellen eines metastasierten Prostatakarzinoms [Morrissey et al., 2008]. Dabei wurde in vielen Fällen des metastasierten Prostatakarzinoms, beispielsweise in der Leber, eine erhöhte Expression von Fibulin-1, aber auch von Fibrinogen in den Tumorzellen in der Peripherie der Tumormasse angrenzend an das tumoröse Stroma beobachtet. Die Expression der beiden Proteine in zentralen Zellen der Tumormasse lag deutlich vermindert vor. Morrissey et al. merken an, dass diese Form der Expression im Falle von Fibrinogen bereits während der vaskulären Invasion im Hepatozellulärem Karzinom beobachtet wurde [Quaglia et al., 2005]. Es wurde berichtet, dass Fibulin-1 einen wichtigen Bestandteil der Blutgefäße bildet und dort mit Fibrinogen in Verbindung steht (vgl. 1.4). Morrissey et al. vermuten, dass Fibrinogen in Verbindung mit Fibulin dazu beitragen könnte, die Endothelzellen in die Tumorperipherie zu befördern und somit die Angiogenese zu erleichtern. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Expression von *FBLN1* auf mRNA-Ebene in metastasierten Prostatakarzinomen.

Auch die Assoziation von Fibulin-1 mit Fibronectin könnte relevant sein. Fibronectin sowie weitere ECM-Proteine, wie Laminin und Kollagen-Typ I, die über Integrine die Adhäsion von Tumorzellen vermitteln, spielen eine entscheidende Rolle in der Tumordinvasion und Metastasenbildung [Saiki, 1997]. In einer Studie wurde beobachtet, dass Fibulin-1 einen hemmenden Einfluss auf Fibronectin ausübt und somit die Migration von Mammakarzinomzellen hemmt [Twal et al., 2001]. In dieser Arbeit fehlte der Nachweis von Fibulin-1 im Stroma des Prostatakarzinom-Gewebes (vgl. 3.8, Abbildung 13A), so dass Fibronectin die Adhäsion und Migration der Tumorzellen unterstützen kann. Da Fibulin-1 in Basalzellen einiger benignen Prostataedrüsen fokal nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.8, Abbildung 13A) könnte sich die Nähe von Fibulin-1 zum Fibronectin, welches einen wesentlichen Bestandteil der Basalmembran darstellt, tumorprotektiv auf benigne Zellen ausüben, da es Fibronectin blockiert.

Fibulin-5 konnte in der ECM von benignem Prostatagewebe leichter nachgewiesen werden. Dort geht es sichtbar eine Verbindung insbesondere mit elastischen Fasern ein. Das Protein weist einen starken Gradienten mit der stärksten Konzentration in der periurethralen Zone auf. Solche Gradienten sind für die Expression mehrerer Gene beschrieben worden. Es wurde daher vermutet, dass sie mitverantwortlich für die höhere Häufigkeit und Malignität der Karzinome in der peripheren Zone der Prostata sind [Stamey et al., 2003; van der Heul-Nieuwenhuijsen et al., 2006]. Für Fibulin-5 wurde eine tumorsuppressive Wirkung in anderen Karzinomtypen angenommen, da die mit Fibulin-5 gebildeten Gewebe-Strukturen wahrscheinlich ein



Hindernis für die Tumorzellinvasion und insbesondere die Angiogenese darstellen [Argraves et al., 2003; Gallagher et al., 2005; Preis et al., 2006; Albig et al., 2004]. Diese Interpretation passt gut zu den Beobachtungen in der Prostata. Im Gegensatz zu Fibulin-1 zeigten die meisten Prostatakarzinome nicht nur eine Verminderung von *FBLN5* mRNA, sondern auch eine fehlende Proteinexpression. Demnach folgt auf die vergleichsweise niedrige Expression von Fibulin-5 in der peripheren Zone eine noch stärkere Abnahme in Karzinomen. Falls sich die Interpretation von anderen Karzinomtypen übertragen lässt, dann würde diese Abnahme die Tumorausbreitung und die Angiogenese erleichtern. Interessanterweise war die Fibulin-5-Expression in Prostatakarzinom-Zellen nicht in allen Fällen auf das Zytoplasma begrenzt, sondern wurde auch im Nukleus einiger Tumorzellen beobachtet. Diese Beobachtung scheint eher spezifischer Natur zu sein, denn die nukleäre Färbung verteilte sich in den Tumorzellen heterogen, fehlte jedoch in angrenzenden normalen Epithelzellen. Eine Untersuchung einer möglichen Funktion dieser nukleären Fibulin-5-Expression steht noch aus.

#### **4.6 Androgenwirkungen auf Expression der Fibulin-Gene**

Während die Verminderung der *FLBN5*-Expression mit den Beobachtungen in anderen Karzinomen weitgehend übereinstimmt, waren jene von *FBLN1* zunächst überraschend, insbesondere im Vergleich zu gynäkologischen Karzinomen, in denen die Expression mit der Tumorprogression zunimmt [Argraves et al., 2003; Gallagher et al., 2005; Bardin et al., 2005; Pupa et al., 2004]. Inzwischen wurde allerdings auch im Colonkarzinom eine Verminderung von *FBLN1* beschrieben [Wen et al., 2006]. Eine wahrscheinliche Erklärung für diesen Unterschied ist der Einfluss von Östrogenen, die Fibulin-1 induzieren können. Insbesondere bewirken die Östrogene eine starke Induktion der Fibulin-1C gegenüber der Fibulin-1D-Spleißvariante [Bardin et al., 2005; Moll et al., 2002]. Demnach könnte ein Fehlen des Östrogeneinflusses im Prostata- und Colonkarzinom erklären, wieso es bei diesen Tumorarten zu einer Verminderung der Fibulin-1 Expression kommt gegenüber der Überexpression in gynäkologischen Tumoren. Dasselbe Argument kann auch angeführt werden, um zu erklären, wieso die beiden Spleißformen im Prostatakarzinom, aber nicht im Mammakarzinom gut miteinander korrelieren. Die Östrogene werden auch als Faktoren angesehen, die Tenascin-C im Mammakarzinom induzieren, im Prostatakarzinom scheint ihre Wirkung jedoch zu fehlen. Gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit üben Androgene keinen Einfluss auf die Expression der Fibuline in sonst androgen-sensiblen Prostatakarzinom-Zellen aus.

#### **4.7 Expression von Fibulinproteinen und mögliche Prozessierung**

Bei der Expressionsanalyse auf Proteinebene wurde für Fibulin-1D eine Proteinbande bei 73 kDa und für Fibulin-5 bei 55 kDa erwartet (vgl. 3.7, Abbildung 12). Trotz der Übereinstimmung mit den mRNA-Expressionsdaten in der starken Fibulin-1D-Expression für die Zelllinie PC-3 lag jedoch das starke Signal bei ca. 55 kDa, statt der erwarteten 73 kDa. Bei den benignen Prostataepithelzellen (PreC), die auf mRNA-Ebene die stärkste Expression im Vergleich zu allen Zelllinien zeigten, konnte keine Proteinbande nachgewiesen werden, ebenfalls keine bei den übrigen Prostatakarzinom-Zelllinien.

Ein Erklärungsansatz für das fehlende Bandenmuster für PreC könnte in einer guten Sekretion und die deutliche Bande für PC-3 in einer mangelhaften Sekretion des Proteins liegen. Auch die übrigen Zelllinien-Lysate ergaben keine Proteinbanden.

Auffällig sind bei den Gewebeprobeen Signale bei  $\gg 100$  kDa im Fibulin-1 Westernblot. Offensichtlich reflektieren sie hochmolekulares Material, dass nicht vollständig denaturiert werden konnte. Da Fibulin-1 bekanntlich ein Bestandteil der Basalmembran ist, könnte die schlechte Detektion dieses Proteins durch den Antikörper auf einer tiefen Verankerung in der Basalmembran beruhen, der nicht nur den Zugang des Antikörpers zu Fibulin-1 in situ erschwert, sondern auch die Extraktion des Proteins.

Bei den vorgefundenen Banden (PC-3 und Nierengewebe) zeigte sich jedoch eine geringere Größe, als für Fibulin-1D erwartet wurde. Eine mögliche Erklärung könnte das Enzym Cathepsin D bieten, welches Fibulin-1 spalten kann [Xie et al., 2008]. Dabei fiel auf, dass ein Fibulin-1-Fragment ein annähernd gleiches molekulares Gewicht ergibt, wie Fibulin-5. Cathepsin D scheint als lysosomales Enzym eine wichtige Rolle bei der Metastasierung verschiedener Karzinome wie auch im Prostatakarzinom zu spielen [McConnell et al., 2006]. Dabei wird es von malignen Zellen sezerniert und beteiligt sich wahrscheinlich am Abbau der ECM.

Eine ähnliche Prozessierung von Fibulin-1 wurde auch in Mammakarzinom beobachtet. Dabei gelang in normalen und tumorösen Geweben der Nachweis mehrerer unterschiedlich großer Fibulin-1-Spaltfragmente [Greene et al., 2003]. Es wurde häufig ein Fragment von 50 kDa in Mammakarzinomen beobachtet, die Östrogenrezeptor-positiv waren. Hierzu wurde u.a. vermutet, dass ein beobachtetes Fibulin-1-Fragment von 55 kDa eine Vorläuferform darstellt, die weiter in ein 50 kDa-Fragment gespalten wird.

Für Fibulin-5 ergab entsprechend den mRNA-Expressionsdaten die Zelllinie PC-3 eine erhöhte Proteinexpression. Diese zeigte zwei Proteinbanden, zum einen die erwartete bei 55 kDa, zum anderen eine überraschende zweite Bande bei ca. 45 kDa, was auf eine posttranslationale Modifikation hindeutet. Diese Vermutung wird verstärkt mit vergleichbaren Ergebnissen einer im Jahr 2007 durchgeführten Studie. Dort wurden in Hautgewebeprobeen einer Maus bei der Westernblotanalyse ebenfalls Proteinbanden von Fibulin-5 in einem Bereich von 45- und 55-kDa entdeckt, die auf eine Spaltung durch Serinproteasen zurückzuführen waren [Hirai et al., 2007]. Zudem wurde beobachtet, dass der Anteil an Fibulin-5 (55 kDa), der mit vollständiger Größe entscheidend zur Elastizität des Gewebes beiträgt, mit dem Alter abnimmt, während das gespaltene Fibulin-5 (45 kDa) zunimmt und zur Erschlaffung des Gewebes beiträgt.

#### 4.8 Ursachen veränderter Expression

Wie oben diskutiert, könnte eine defekte Östrogenregulation einen Grund für die Verminderung von *FBLN1* im Prostatakarzinom bilden. Eine weitere Ursache könnte eine reduzierte Gendosis infolge von Verlusten auf dem Chromosom 22q13.31 darstellen, die in einer signifikanten Anzahl an Prostatakarzinomen vorkommen. Die früheren veröffentlichten CGH-Daten [Schulz et al., 2007] und die Ergebnisse der quantitativen PCR in der jetzigen Untersuchung deuteten übereinstimmend auf Allelverluste in über 20% der Karzinome hin. Als Ursache häufiger signifikanter *FBLN4*- und *FBLN5*-Verminderung oder *SPOCK1*-Überexpression sind im Gegensatz zu *FBLN1* Veränderungen der Gendosis eher unwahrscheinlich, da die entsprechenden chromosomalen Regionen in CGH-Analysen nicht auffallen.



Die ermittelten Verluste in der Genkopienzahl könnten tatsächlich zu einer verminderten Expression von *FBLN1* in einigen Prostatakarzinomen beitragen. Die erhöhte Expression von *SPOCK1* jedoch könnte nur in vereinzelt Fällen einem Zugewinn der Genkopienzahl zugeschrieben werden.

Aufgrund der Lokalisation von *EGR1* als Nachbarn von *SPOCK1* auf Chromosom 5q31.1 wurde auch seine Genkopienzahl gemessen. Die Untersuchung von *EGR1* ergab jedoch keine Erhöhung, sondern eher eine Tendenz zu einer verminderten Genkopienzahl (vgl. 3.2, Abbildung 8). Dies wirkt auf den ersten Blick überraschend, da für *EGR1* eine Überexpression in Prostatakarzinomen berichtet worden war [Thigpen et al., 1996]. Allerdings betonten die früheren Arbeiten die Bedeutung von *EGR1* bei stark fortgeschrittenen Fällen. Andererseits wurde eine verminderte Expression von *EGR1* in anderen Karzinomen besonders im Mammakarzinom berichtet [Huang et al., 1997]. Zusammengefasst könnten die Ergebnisse dieser Arbeit so interpretiert werden, dass in den untersuchten primären Tumoren noch keine verstärkte Funktion von *EGR1* relevant ist oder zumindest keine Genamplifikationen auftreten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Störungen in der Struktur und Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix und der Basalmembran spielen beim Prostatakarzinom eine zentrale Rolle. Bekannt sind bereits Veränderungen in der Expression zahlreicher Mitglieder aus der Laminin- und Kollagenfamilie, die häufig auf epigenetische Aberrationen zurückzuführen sind. Hinweise aus einer Mikroarrayuntersuchung deuteten auf Veränderungen bei weiteren Genen, die für die Extrazellulären Matrixproteine kodieren, nämlich *FBLN1*, *4*, *5* (Fibuline), *SPOCK1* (Testican-1) und *TENC* (Tenascin-C).

Als Bestandteile von Basalmembranen und elastischen Fasern stehen die Fibuline mit der Progression verschiedener Tumorarten im Zusammenhang. Bisher konnte durch immunhistochemische Analysen eine Überexpression von Fibulin-1 in gynäkologischen Karzinomen, jedoch auch eine Herunterregulation im Kolonkarzinom nachgewiesen werden. Auch für Fibulin-4 gelang ein Nachweis einer Überexpression im Kolonkarzinom und könnte auf eine onkogene Wirkung hinweisen. Da für Fibulin-5 hingegen eine verminderte Expression in verschiedenen Tumorarten und eine hemmende Wirkung auf Angiogenese nachgewiesen wurde, wird es als möglicher Tumorsuppressor betrachtet. Tenascin-C stimuliert die Tumorzell-Proliferation, indem es der proliferations-supprimierenden Wirkung von Fibronektin entgegenwirkt und wird z. B. im Mammakarzinom und in Gliomen mit einer schlechten Prognose stark exprimiert. Hohe Expressionen von Testican-1 wurden im Gehirn, speziell im Thalamus gefunden, an dessen Entwicklung und Funktion es vermutlich regulatorisch beteiligt ist. Seine Funktion in Tumoren ist unbekannt, jedoch inhibiert es Matrixmetalloproteinasen.

In dieser Arbeit wurde zunächst mittels quantitativer RT-PCR die Expression von *FBLN1*, *FBLN4*, *FBLN5*, *SPOCK1* sowie *TENC* an einer Gruppe von 47 M0 Prostatakarzinom- und 13 Prostatanormal-Gewebeproben gemessen. Alle *FBLN*-Gene waren in Tumorgewebe deutlich signifikant vermindert exprimiert. Die Expression der Spleißvarianten *FBLN1C* und *FBLN1D* war dabei sehr ähnlich. *SPOCK1* hingegen wurde im Tumorgewebe signifikant überexprimiert. Dagegen lagen für *TENC* keine signifikanten Unterschiede vor. Keine der Expressionsveränderungen hing signifikant mit Tumorstadium oder klinischem Verlauf zusammen. Als mögliche Ursache der verminderten *FBLN*-Expressionen, wurde nach Hinweisen auf eine veränderte Methylierung gesucht. Induktionsversuche mit einem Inhibitor der DNA-Methylierung (5-Aza-2'-Desoxycytidin) ergaben für *FBLN4* in Prostatakarzinom-Zelllinien eine Induktion, nicht jedoch für *FBLN1* und *FBLN5*. Der *FBLN4* Gen-Promotor war jedoch generell unmethyliert; nur Sssl-(CpG)-Methylase behandelte DNA als Positivkontrolle zeigte eine fast vollständige Methylierung. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass die Herunterregulation der *FBLN*-Gene im Prostatakarzinom auf DNA-Hypermethylierung zurückzuführen ist.

Als weitere Ursache veränderter Genexpression -gestützt auf veröffentlichte CGH-Daten- wurde die Gendosis von *FBLN1* auf Chromosom 22q13.31, von *SPOCK1* auf Chromosom 5q31 und zusätzlich eines direkten Nachbargens von *SPOCK1*, nämlich *EGR1*, gemessen. Dabei zeigte *FBLN1* in einigen Prostatakarzinom-Gewebeproben tatsächlich verminderte Genkopienzahl; bei *SPOCK1* hingegen wurde in vereinzelt Fällen eine Erhöhung der Genkopienzahl ermittelt. Die Untersuchungen der Genkopienzahl von *ERG1* ergab keine Erhöhung. Somit könnte am ehesten das verminderte Expressionsniveau von *FBLN1* auf Genverluste zurückzuführen sein.

Immunhistochemische Analysen zeigten insgesamt eine sehr schwache Expression von Fibulin-1 in gesunden Prostataarealen. Bei den meisten Prostatakarzinomen lag

eine stärkere, jedoch intrazelluläre Fibulin-1-Expression im Vergleich zu benignen Drüsen vor. Diese zeigte keine Korrelation zu den mRNA-Expressionsergebnissen. Fibulin-5 wurde überwiegend im Stroma der Prostata lokalisiert mit der stärksten Färbung in der periurethralen Zone. In Übereinstimmung mit den mRNA-Expressionsergebnissen waren die meisten Tumore negativ oder nur schwach positiv. Für Fibulin-4 war kein Antikörper verfügbar.

Zusammenfassend war bei drei Genen, die Fibuline kodieren, nämlich *FBLN1*, *FBLN4* und *FBLN5* eine signifikante Herunterregulation des mRNA-Expressionsniveaus im Prostatakarzinom festzustellen. Im Gegensatz dazu war die Expression von *SPOCK1*, eines weiteren extrazellulären Matrix-Gens, hochreguliert. Aberrante DNA-Methylierungsmuster scheinen für die Veränderungen in der *FBLN*-Expression nicht verantwortlich zu sein, jedoch in einigen Fällen Kopienzahlveränderungen. Die Lokalisation von Fibulin-5 in Prostatazonen, die für die Entstehung von Karzinomen weniger anfällig sind und die Herunterregulation im Prostatakarzinom unterstützt die Hypothese, dass Fibulin-5 auch im Prostatakarzinom als Tumorsuppressor wirkt. Fibulin-1 neigt zur Akkumulation im Zytoplasma von Prostatakarzinomzellen, obwohl seine mRNA herunterreguliert ist. Die verminderte *FBLN1*-Expression im Prostatakarzinom steht im Gegensatz zu der in gynäkologischen Karzinomen und beruht am ehesten auf unterschiedlicher Regulation, vielleicht durch Östrogene.

## 6 LITERATUR

- Abdulkadir, S. A., Qu, Z., Garabedian, E., Song, S. K., Peters, T. J., Svaren, J., Carbone, J. M., Naughton, C. K., Catalona, W. J., Ackerman, J. J., Gordon, J. I., Humphrey, P. A. und Milbrandt, J. (2001) Impaired prostate tumorigenesis in Egr1-deficient mice. *Nat.Med.* **7**: 101-7.
- Adams, J. C. und Watt, F. M. (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**: 1183-98.
- Adamson, E., de Belle, I., Mittal, S., Wang, Y., Hayakawa, J., Korkmaz, K., O'Hagan, D., McClelland, M. und Mercola, D. (2003) Egr1 signaling in prostate cancer. *Cancer Biol.Ther.* **2**: 617-22.
- Akhurst, R. J., Lehnert, S. A., Faissner, A. und Duffie, E. (1990) TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development* **108**: 645-56.
- Albig, A. R. und Schiemann, W. P. (2004) Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA Cell Biol.* **23**: 367-79.
- Albig, A. R., Neil, J. R. und Schiemann, W. P. (2006) Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* **66**: 2621-9.
- Amălinei, C. (2006) [Reciprocal epithelio-stromal interactions in normal and neoplastic prostate] *Rev.Med.Chir.Soc.Med.Nat.Iasi* **110**: 391-8.
- Argraves, W. S., Dickerson, K., Burgess, W. H. und Ruoslahti, E. (1989) Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor beta subunit cytoplasmic domain. *Cell* **58**: 623-9.
- Argraves, W. S., Tran, H., Burgess, W. H. und Dickerson, K. (1990) Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *J.Cell Biol.* **111**: 3155-64.
- Argraves, W. S., Greene, L. M., Cooley, M. A. und Gallagher, W. M. (2003) Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep.* **4**: 1127-31.
- Aspberg, A., Adam, S., Kostka, G., Timpl, R. und Heinegård, D. (1999) Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J.Biol.Chem.* **274**: 20444-9.
- Aumailley, M. und Gayraud, B. (1998) Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J.Mol.Med.* **76**: 253-65.
- Bailey, A. J. (2001) Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech.Ageing Dev.* **122**: 735-55.
- Balbona, K., Tran, H., Godyna, S., Ingham, K. C., Strickland, D. K. und Argraves, W. S. (1992) Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *J.Biol.Chem.* **267**: 20120-5.
- Bardin, A., Moll, F., Margueron, R., Delfour, C., Chu, M. L., Maudelonde, T., Cavailles, V. und Pujol, P. (2005) Transcriptional and posttranscriptional regulation of fibulin-1 by estrogens leads to differential induction of messenger ribonucleic acid variants in ovarian and breast cancer cells. *Endocrinology* **146**: 760-8.

- BaSalamah, M. A., Marr, H. S., Duncan, A. W. und Edgell, C. J. (2001) Testican in human blood. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **283**: 1083-90.
- Bastian, P. J., Ellinger, J., Schmidt, D., Wernert, N., Wellmann, A., Müller, S. C. und von Rücker, A. (2004) GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostatic cancer: is there a correlation with clinical stage, Gleason grade, PSA value or age? *Eur.J.Med.Res.* **9**: 523-7.
- Bernhard, E. J., Gruber, S. B. und Muschel, R. J. (1994) Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic phenotype in transformed rat embryo cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**: 4293-7.
- Bocock, J. P., Edgell, C. J., Marr, H. S. und Erickson, A. H. (2003) Human proteoglycan testican-1 inhibits the lysosomal cysteine protease cathepsin L. *Eur.J.Biochem.* **270**: 4008-15.
- Bonnet, F., Perin, J. P., Maillet, P., Jolles, P. und Alliel, P. M. (1992) Characterization of a human seminal plasma glycosaminoglycan-bearing polypeptide. *Biochem.J.* **288**: 565-9.
- Bonnet, F., Périn, J. P., Charbonnier, F., Camuzat, A., Roussel, G., Nussbaum, J. L. und Alliel, P. M. (1996) Structure and cellular distribution of mouse brain testican. Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. *J.Biol.Chem.* **271**: 4373-80.
- Bosman, F. T. und Stamenkovic, I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J.Pathol.* **200**: 423-8.
- Bostwick, D. G. (1992) Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): current concepts. *J.Cell.Biochem.Suppl.* **16H**: 10-9.
- Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H. J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., Gasser, T. C., Koivisto, P., Lack, E. E., Kononen, J., Kallioniemi, O. P. und Gelmann, E. P. (2000) Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res.* **60**: 6111-5.
- Brar, P. K., Dalkin, B. L., Weyer, C., Sallam, K., Virtanen, I. und Nagle, R. B. (2003) Laminin alpha-1, alpha-3, and alpha-5 chain expression in human prepubertal [correction of prepubetal] benign prostate glands and adult benign and malignant prostate glands. *Prostate* **55**: 65-70.
- Brooks, J. D., Bova, G. S., Ewing, C. M., Piantadosi, S., Carter, B. S., Robinson, J. C., Epstein, J. I. und Isaacs, W. B. (1996) An uncertain role for p53 gene alterations in human prostate cancers. *Cancer Res.* **56**: 3814-22.
- 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, O. P., Burk, R., Meyers, D., Grönberg, H., Meltzer, P., Silverman, R., Bailey-Wilson, J., Walsh, P., Isaacs, W. und Trent, J. (2002) Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat.Genet.* **30**: 181-4.
- Carter, B. S., Beaty, T. H., Steinberg, G. D., Childs, B. und Walsh, P. C. (1992) Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 3367-71.

- Charbonnier, F., Périn, J. P., Roussel, G., Nussbaum, J. L. und Alliel, P. M. (1997) [Cloning of testican/SPOCK in man and mouse. Neuromuscular expression perspectives in pathology]. *C.R.Seances Soc.Biol.Fil.* **191**: 127-33.
- Charbonnier, F., Chanoine, C., Cifuentes-Diaz, C., Gallien, C. L., Rieger, F., Alliel, P. M. und Périn, J. P. (2000) Expression of the proteoglycan SPOCK during mouse embryo development. *Mech.Dev.* **90**: 317-21.
- Chen, H., Griffin, A. R., Wu, Y. Q., Tomsho, L. P., Zuhlke, K. A., Lange, E. M., Gruber, S. B. und Cooney, K. A. (2003) RNASEL mutations in hereditary prostate cancer. *J.Med.Genet.* **40**: e21.
- Cheng, Y. Y., Jin, H., Liu, X., Siu, J. M., Wong, Y. P., Ng, E. K., Yu, J., Leung, W. K., Sung, J. J. und Chan, F. K. (2008) Fibulin 1 is downregulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Br.J.Cancer.* **99**: 2083-7.
- Chiquet, M. und Fambrough, D. M. (1984) Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J.Cell Biol.* **98**: 1926-36.
- Chiquet-Ehrismann, R. und Chiquet, M. (2003) Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J.Pathol.* **200**: 488-99.
- Chiquet-Ehrismann, R. (2004) Tenascins. *Int.J.Biochem. Cell Biol.* **36**: 986-90.
- Clinton, G. M., Rougeot, C., Derancourt, J., Roger, P., Defrenne, A., Godyna, S., Argraves, W. S. und Rochefort, H. (1996) Estrogens increase the expression of fibulin-1, an extracellular matrix protein secreted by human ovarian cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**: 316-20.
- Davis, L. A., Ogle, R. C. und Little, C. D. (1989) Embryonic heart mesenchymal cell migration in laminin. *Dev.Biol.* **133**: 37-43.
- Davis, T. L., Cress, A. E., Dalkin, B. L. und Nagle, R. B. (2001) Unique expression pattern of the alpha6beta4 integrin and laminin-5 in human prostate carcinoma. *Prostate* **46**: 240-8.
- De Marzo, A. M., Marchi, V. L., Epstein, J. I. und Nelson, W. G. (1999) Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am.J.Pathol.* **155**: 1985-92.
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B. und Nelson, W. G. (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat.Rev.Cancer* **7**: 256-69.
- Demichelis, F., Fall, K., Perner, S., Andrén, O., Schmidt, F., Setlur, S. R., Hoshida, Y., Mosquera, J. M., Pawitan, Y., Lee, C., Adami, H. O., Mucci, L. A., Kantoff, P. W., Andersson, S. O., Chinnaiyan, A. M., Johansson, J. E. und Rubin, M. A. (2007) TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* **26**:4596-9.
- de Vega, S., Iwamoto, T., Nakamura, T., Hozumi, K., McKnight, D. A., Fisher, L. W., Fukumoto, S. und Yamada, Y. (2007) TM14 is a new member of the fibulin family (fibulin-7) that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding. *J.Biol.Chem.* **282**: 30878-88.
- de Vega, S., Iwamoto, T. und Yamada, Y. (2009) Fibulins: Multiple roles in matrix structures and tissue functions. *Cell Mol.Life Sci.*



- De Wever, O., Nguyen, Q. D., Van Hoorde, L., Bracke, M., Bruyneel, E., Gespach, C. und Mareel, M. (2004) Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* **18**: 1016-8.
- Dohchin, A., Suzuki, J. I., Seki, H., Masutani, M., Shioto, H. und Kawakami, Y. (2000) Immunostained cathepsins B and L correlate with depth of invasion and different metastatic pathways in early stage gastric carcinoma. *Cancer* **89**: 482-7.
- Dong, J. T. (2001) Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **20**: 173-93.
- Duband, J. L., Dufour, S. und Thiery, J. P. (1990) The instructive role of fibronectins in cell migrations during embryonic development. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **588**: 273-80.
- Edgell, C. J., BaSalamah, M. A. und Marr, H. S. (2004) Testican-1: a differentially expressed proteoglycan with protease inhibiting activities. *Int.Rev.Cytol.* **236**: 101-22.
- Erkens, T., Van Poucke, M., Vandesompele, J., Goossens, K., Van Zeveren, A. und Peelman, L. J. (2006) Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. *BMC Biotechnol.* **6**: 41.
- Evanko, S. P., Raines, E. W., Ross, R., Gold, L. I. und Wight, T. N. (1998) Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am.J.Pathol.* **152**: 533-46.
- Feldman, B. J. und Feldman, D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat.Rev.Cancer* **1**: 34-45.
- Flintoff-Dye, N. L., Welser, J., Rooney, J., Scowen, P., Tamowski, S., Hatton, W. und Burkin, D. J. (2005) Role for the alpha7beta1 integrin in vascular development and integrity. *Dev.Dyn.* **234**: 11-21.
- Florl, A. R., Löwer, R., Schmitz-Dräger, B. J. und Schulz, W. A. (1999) DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br.J.Cancer* **80**: 1312-21.
- Florl, A. R., Steinhoff, C., Müller, M., Seifert, H. H., Hader, C., Engers, R., Ackermann, R. und Schulz, W. A. (2004) Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br.J.Cancer* **91**: 985-94.
- Frauscher, F., Klauser, A., Berger, A. P., Halpern, E. J., Feuchtner, G., Koppelstaetter, F., Pallwein, L., Pinggera, G. M., Weirich, H., Horninger, W., Bartsch, G. und zur Nedden, D. (2003) Sonographie des Prostatakarzinoms. *Radiologe* **43**: 455-463.
- Freeman, L. J., Lomas, A., Hodson, N., Sherratt, M. J., Mellody, K. T., Weiss, A. S., Shuttleworth, A. und Kielty, C. M. (2005) Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils. *Biochem.J.* **388**: 1-5.
- Gallagher, W. M., Greene, L. M., Ryan, M. P., Sierra, V., Berger, A., Laurent-Puig, P. und Conseiller, E. (2001) Human fibulin-4: analysis of its biosynthetic processing and mRNA expression in normal and tumour tissues. *FEBS Lett.* **489**: 59-66.
- Gallagher, W. M., Currid, C. A. und Whelan, L. C. (2005) Fibulins and cancer: friend or foe? *Trends Mol.Med.* **11**: 336-40.



- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G. und Quaranta, V. (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277**: 225-8.
- Giltay, R., Timpl, R. und Kostka, G. (1999) Sequence, recombinant expression and tissue localization of two novel extracellular matrix proteins, fibulin-3 and fibulin-4. *Matrix Biol.* **18**: 469-80.
- Godyna, S., Diaz-Ricart, M. und Argraves, W. S. (1996) Fibulin-1 mediates platelet adhesion *via* a bridge of fibrinogen. *Blood* **88**: 2569-77.
- Grazioli, A., Alves, C. S., Konstantopoulos, K. und Yang, J. T. (2006) Defective blood vessel development and pericyte/pvSMC distribution in alpha 4 integrin-deficient mouse embryos. *Dev.Biol.* **293**: 165-77.
- Greene, L. M., Twal, W. O., Duffy, M. J., McDermott, E. W., Hill, A. D., O'Higgins, N. J., McCann, A. H., Dervan, P. A., Argraves, W.S. und Gallagher, W. M. (2003) Elevated expression and altered processing of fibulin-1 protein in human breast cancer. *Br.J.Cancer* **24**: 871-8.
- Hao, J., Jackson, L., Calaluce, R., McDaniel, K., Dalkin, B. L. und Nagle, R. B. (2001) Investigation into the mechanism of the loss of laminin 5 (alpha3beta3gamma2) expression in prostate cancer. *Am.J.Pathol.* **158**: 1129-35.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. und Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **45**: 51-88.
- Hermans, K. G., van Marion, R., van Dekken, H., Jenster, G., van Weerden, W. M. und Trapman, J. (2006) TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer. *Cancer Res.* **66**: 10658-63.
- Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Okawa, K., Hagiwara, A., Chien, K. R., Kita, T. und Nakamura, T. (2007) Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage *in vivo*. *J.Cell Biol.* **176**: 1061-71.
- Hoffmann, M. J., Müller, M., Engers, R. und Schulz, W. A. (2006) Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. *Biochem.Pharmacol.* **72**: 1577-88.
- Hohenester, E., Maurer, P., Hohenadl, C., Timpl, R., Jansonius, J. N. und Engel, J. (1996) Structure of a novel extracellular Ca(2+)-binding module in BM-40. *Nat.Struct.Biol.* **3**: 67-73.
- Horan, A. H. und McGehee, M. (2000) Mean time to cancer-specific death of apparently clinically localized prostate cancer: policy implications for threshold ages in prostate-specific antigen screening and ablative therapy. *BJU Int.* **85**: 1063-6.
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A. und Murphy, G. P. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**: 1809-18.
- Hotary, K. B., Allen, E. D., Brooks, P. C., Datta, N. S., Long, M. W. und Weiss, S. J. (2003) Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* **114**: 33-45.
- Huang, R. P., Fan, Y., de Belle, I., Niemeyer, C., Gottardis, M. M., Mercola, D. und Adamson, E. D. (1997) Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int.J.Cancer* **72**: 102-9.

- Huang, W., Chiquet-Ehrismann, R., Moyano, J. V., Garcia-Pardo, A. und Orend, G. (2001) Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res.* **61**: 8586-94.
- Huchtagowder, V., Sausgruber, N., Kim, K. H., Angle, B., Marmorstein, L. Y. und Urban, Z. (2006) Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* **78**: 1075-80.
- Hultgårdh-Nilsson, A. und Durbeej, M. (2007) Role of the extracellular matrix and its receptors in smooth muscle cell function: implications in vascular development and disease. *Curr.Opin.Lipidol.* **18**: 540-5.
- Huang, R. P., Fan, Y., de Belle, I., Niemeyer, C., Gottardis, M. M., Mercola, D. und Adamson, E. D. (1997) Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int.J.Cancer* **72**: 102-9.
- Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-87.
- Jean, D., Rousselet, N. und Frade, R. (2006) Expression of cathepsin L in human tumor cells is under the control of distinct regulatory mechanisms. *Oncogene* **25**: 1474-84.
- Jones, P. A. und Laird, P. W. (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat.Genet.* **21**: 163-7.
- Jones, F. S. und Jones, P. L. (2000) The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev.Dyn.* **218**: 235-59.
- Kaighn, M E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. und Jones, L. W. (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest.Urol.* **17**: 16-23.
- Kamioka, M., Imamura, J., Komatsu, N., Daibata, M. und Sugiura, T. (2009) Testican 3 expression in adult T-cell leukemia. *Leuk.Res.*
- Kawamata, H., Furihata, T., Omotehara, F., Sakai, T., Horiuchi, H., Shinagawa, Y., Imura, J., Ohkura, Y., Tachibana, M., Kubota, K., Terano, A. und Fujimori, T. (2003) Identification of genes differentially expressed in a newly isolated human metastasizing esophageal cancer cell line, T.Tn-AT1, by cDNA microarray. *Cancer Sci.* **94**: 699-706.
- Kiefer, J. C. (2007) Epigenetics in development. *Dev.Dyn.* **236**: 1144-56.
- Klezovitch, O., Chevillet, J., Mirosevich, J., Roberts, R. L., Matusik, R. J. und Vasioukhin, V. (2004) Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis. *Cancer Cell* **6**: 185-95.
- Kobayashi, N., Kostka, G., Garbe, J. H., Keene, D. R., Bächinger, H. P., Hanisch, F. G., Markova, D., Tsuda, T., Timpl, R., Chu, M. L. und Sasaki, T. (2007) A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. *J.Biol.Chem.* **282**: 11805-16.
- Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T., Hyytinen, E., Isola, J., Trapman, J., Cleutjens, K., Noordzij, A., Visakorpi, T. und Kallioniemi, O. P. (1997)

Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* **57**: 314-9.

- Kosir, M. A., Quinn, C. C., Zukowski, K. L., Grignon, D. J. und Ledbetter, S. (1997) Human prostate carcinoma cells produce extracellular heparanase. *J.Surg.Res.* **67**: 98-105.
- Kostka, G., Giltay, R., Bloch, W., Addicks, K., Timpl, R., Fässler, R. und Chu, M. L. (2001) Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice. *Mol.Cell.Biol.* **21**: 7025-34.
- Kowal, R. C., Richardson, J. A., Miano, J. M. und Olson, E. N. (1999) EVEC, a novel epidermal growth factor-like repeat-containing protein upregulated in embryonic and diseased adult vasculature. *Circ.Res.* **84**: 1166-76.
- Kresse, H. und Schönherr, E. (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J.Cell.Physiol.* **189**: 266-74.
- Kudo, T., Takino, T., Miyamori, H., Thompson, E. W. und Sato, H. (2007) Substrate choice of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is dictated by tissue inhibitor of metalloproteinase-2 levels. *Cancer Sci.* **98**: 563-8.
- Landers, K. A., Burger, M. J., Tebay, M. A., Purdie, D. M., Scells, B., Samaratunga, H., Lavin, M. F. und Gardiner, R. A. (2005) Use of multiple biomarkers for a molecular diagnosis of prostate cancer. *Int.J.Cancer* **114**: 950-6.
- Le, H. V., Minn, A. J. und Massagué, J. (2005) Cyclin-dependent kinase inhibitors uncouple cell cycle progression from mitochondrial apoptotic functions in DNA-damaged cancer cells. *J.Biol.Chem.* **280**: 32018-25.
- Lecka-Czernik, B., Lumpkin, CK, J. r. und Goldstein, S. (1995) An overexpressed gene transcript in senescent and quiescent human fibroblasts encoding a novel protein in the epidermal growth factor-like repeat family stimulates DNA synthesis. *Mol.Cell.Biol.* **15**: 120-8.
- Ledda, F., Bravo, A. I., Adris, S., Bover, L., Mordoh, J. und Podhajcer, O. L. (1997) The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J.Invest.Dermatol.* **108**: 210-4.
- Lee, S. S., Knott, V., Jovanović, J., Harlos, K., Grimes, J. M., Choulier, L., Mardon, H. J., Stuart, D. I. und Handford, P. A. (2004) Structure of the integrin binding fragment from fibrillin-1 gives new insights into microfibril organization. *Structure* **12**: 717-29.
- Lerner, I., Baraz, L., Pikarsky, E., Meirovitz, A., Edovitsky, E., Peretz, T., Vlodaysky, I. und Elkin, M. (2008) Function of heparanase in prostate tumorigenesis: potential for therapy. *Clin.Cancer Res.* **14**: 668-76.
- Li, L. C., Carroll, P. R. und Dahiya, R. (2005) Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J.Natl.Cancer Inst.* **97**: 103-15.
- Li, H. und Tai, B. C. (2006) RNASEL gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Clin.Cancer Res.* **12**: 5713-9.
- Liang, G., Gonzales, F. A., Jones, P. A., Orntoft, T. F. und Thykjaer, T. (2002) Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **62**: 961-6.

- Lin, D. L., Whitney, M. C., Yao, Z. und Keller, E. T. (2001) Interleukin-6 induces androgen responsiveness in prostate cancer cells through up-regulation of androgen receptor expression. *Clin.Cancer Res.* **7**: 1773-81.
- Liu, C., Calogero, A., Ragona, G., Adamson, E. und Mercola, D. (1996) EGR-1, the reluctant suppression factor: EGR-1 is known to function in the regulation of growth, differentiation, and also has significant tumor suppressor activity and a mechanism involving the induction of TGF-beta1 is postulated to account for this suppressor activity. *Crit.Rev.Oncog.* **7**: 101-25.
- Liu, C., Yao, J., de Belle, I., Huang, R. P., Adamson, E. und Mercola, D. (1999) The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J.Biol.Chem.* **274**: 4400-11.
- Loeys, B., Van Maldergem, L., Mortier, G., Coucke, P., Gerniers, S., Naeyaert, J. M. und De Paepe, A. (2002) Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa. *Hum.Mol.Genet.* **11**: 2113-8.
- Lomas, A. C., Mellody, K. T., Freeman, L. J., Bax, D. V., Shuttleworth, C. A. und Kielty, C. M. (2007) Fibulin-5 binds human smooth-muscle cells through alpha5beta1 and alpha4beta1 integrins, but does not support receptor activation. *Biochem.J.* **405**: 417-28.
- Mackie, E. J., Thesleff, I. und Chiquet-Ehrismann, R. (1987) Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J.Cell Biol.* **105**: 2569-79.
- Marinkovich, M. P. (2007) Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat.Rev.Cancer* **7**: 370-80.
- Marr, H. S. und Edgell, C. J. (2003) Testican-1 inhibits attachment of Neuro-2a cells. *Matrix Biol.* **22**: 259-66.
- Massagué, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.* **67**: 753-91.
- Massagué, J. (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**: 215-30.
- McConnell, R. M., Green, A. W., Trana, C. J., McConnell, M. S., Lindley, J. F., Sayyar, K., Godwin, W. E. und Hatfield, S. E. (2006) New cathepsin d inhibitors with hydroxyethylamine isosteres: preparation and characterization. *Med.Chem.* **2**: 27-38.
- McLaughlin, P. J., Chen, Q., Horiguchi, M., Starcher, B. C., Stanton, J. B., Broekelmann, T. J., Marmorstein, A. D., McKay, B., Mecham, R., Nakamura, T. und Marmorstein, L. Y. (2006) Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. *Mol.Cell Biol.* **26**: 1700-9.
- McNeal, J. E. (1980) Anatomy of the prostate: an historical survey of divergent views. *Prostate* **1**: 3-13.
- McNeal, J. E. und Bostwick, D. G. (1986) Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. *Hum.Pathol.* **17**: 64-71.
- Meeker, A. K. (2006) Telomeres and telomerase in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer biology. *Urol.Oncol.* **24**: 122-30.
- Mehra, R., Tomlins, S. A., Yu, J., Cao, X., Wang, L., Menon, A., Rubin, M. A., Pienta, K. J., Shah, R. B. und Chinnaiyan, A. M. (2008) Characterization of

TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* **68**: 3584-90.

- Midwood, K. S., Valenick, L. V., Hsia, H. C. und Schwarzbauer, J. E. (2004) Coregulation of fibronectin signaling and matrix contraction by tenascin-C and syndecan-4. *Mol.Biol.Cell.* **15**: 5670-7.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L. und Massagué, J. (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**: 518-24.
- Miner, J. H. und Yurchenco, P. D. (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **20**: 255-84.
- Mo, Z., Gao, Y., Cao, Y., Gao, F. und Jian, L. (2009) An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate* **69**: 662-88.
- Moll, F., Katsaros, D., Lazennec, G., Hellio, N., Roger, P., Giacalone, P. L., Chabos, D., Maudelonde, T., Rochefort, H. und Pujol, P. (2002) Estrogen induction and overexpression of fibulin-1C mRNA in ovarian cancer cells. *Oncogene* **21**: 1097-107.
- Molnar, J., Fong, K. S., He, Q. P., Hayashi, K., Kim, Y., Fong, S. F., Fogelgren, B., Szauter, K. M., Mink, M. und Csiszar, K. (2003) Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim.Biophys. Acta* **1647**: 220-4.
- Moore, B. B., Arenberg, D. A., Stoy, K., Morgan, T., Addison, C. L., Morris, S. B., Glass, M., Wilke, C., Xue, Y. Y., Sitterding, S., Kunkel, S. L., Burdick, M. D. und Strieter, R. M. (1999) Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am.J.Pathol.* **154**: 1503-12.
- Morrissey, C., True, L. D., Roudier, M. P., Coleman, I. M., Hawley, S., Nelson, P. S., Coleman, R., Wang, Y. C., Corey, E., Lange, P. H., Higano, C. S. und Vessella, R. L. (2008) Differential expression of angiogenesis associated genes in prostate cancer bone, liver and lymph node metastases. *Clin.Exp.Metastasis* **25**: 377-88.
- Motamed, K. und Sage, E. H. (1997) Regulation of vascular morphogenesis by the matricellular protein SPARC. *Kidney Int.* **51**: 1383-7.
- Mundlos, S., Meyer, R., Yamada, Y. und Zabel, B. (1991) Distribution of cartilage proteoglycan (aggrecan) core protein and link protein gene expression during human skeletal development. *Matrix* **11**: 339-46.
- Nagle, R. B., Knox, J. D., Wolf, C., Bowden, G. T. und Cress, A. E. (1994) Adhesion molecules, extracellular matrix, and proteases in prostate carcinoma. *J.Cell.Biochem.Suppl.* **19**: 232-7.
- Nagle, R. B., Hao, J., Knox, J. D., Dalkin, B. L., Clark, V. und Cress, A. E. (1995) Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *Am.J.Pathol.* **146**: 1498-507.
- Nair, P., Muthukumar, S., Sells, S. F., Han, S. S., Sukhatme, V. P. und Rangnekar, V. M. (1997) Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J.Biol.Chem.* **272**: 20131-8.
- Nakada, M., Yamada, A., Takino, T., Miyamori, H., Takahashi, T., Yamashita, J. und Sato, H. (2001) Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase



(MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Res.* **61**: 8896-902.

- Nakada, M., Miyamori, H., Yamashita, J. und Sato, H. (2003) Testican 2 abrogates inhibition of membrane-type matrix metalloproteinases by other testican family proteins. *Cancer Res.* **63**: 3364-9.
- Nakamura, T., Lozano, P. R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C. F., Kobuke, K., Dalton, N., Takada, Y., Tashiro, K., Ross, Jr. J., Honjo, T. und Chien, K. R. (2002) Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* **415**: 171-5.
- Nakamura, T., Ruiz-Lozano, P., Lindner, V., Yabe, D., Taniwaki, M., Furukawa, Y., Kobuke, K., Tashiro, K., Lu, Z., Andon, N. L., Schaub, R., Matsumori, A., Sasayama, S., Chien, K. R. und Honjo, T. (1999) DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries. *J.Biol.Chem.* **274**: 22476-83.
- Nakayama, M., Bennett, C. J., Hicks, J. L., Epstein, J. I., Platz, E. A., Nelson, W. G. und De Marzo, A. M. (2003) Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am.J.Pathol.* **163**: 923-33.
- Nakayama, T., Watanabe, M., Suzuki, H., Toyota, M., Sekita, N., Hirokawa, Y., Mizokami, A., Ito, H., Yatani, R. und Shiraishi, T. (2000) Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. *Lab.Invest.* **80**: 1789-96.
- Neveling, K., Kalb, R., Florl, A. R., Herterich, S., Friedl, R., Hoehn, H., Hader, C., Hartmann, F. H., Nanda, I., Steinlein, C., Schmid, M., Tonnies, H., Hurst, C. D., Knowles, M. A., Hanenberg, H., Schulz, W. A. und Schindler, D. (2007) Disruption of the FA/BRCA pathway in bladder cancer. *Cytogenet.Genome Res.* **118**: 166-76.
- Ogishima, T., Shiina, H., Breault, J. E., Tabatabai, L., Bassett, W. W., Enokida, H., Li, L. C., Kawakami, T., Urakami, S., Ribeiro-Filho, L. A., Terashima, M., Fujime, M., Igawa, M. und Dahiya, R. (2005) Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin.Cancer Res.* **11**: 1028-36.
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M. und Okada, Y. (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J.Biol.Chem.* **272**: 2446-51.
- Olin, A. I., Mörgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegård, D. und Aspberg, A. (2001) The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J.Biol.Chem.* **276**: 1253-61.
- Olivero, D. K. und Furcht, L. T. (1993) Type IV collagen, laminin, and fibronectin promote the adhesion and migration of rabbit lens epithelial cells in vitro. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* **34**: 2825-34.
- Orend, G. (2005) Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **37**: 1066-83.
- Orend, G. und Chiquet-Ehrismann, R. (2006) Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.* **244**: 143-63.

- Pan, T. C., Sasaki, T., Zhang, R. Z., Fässler, R., Timpl, R. und Chu, M. L. (1993) Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding. *J.Cell Biol.* **123**: 1269-77.
- Pasquali-Ronchetti, I. und Baccarani-Contri, M. (1997) Elastic fiber during development and aging. *Microsc.Res.Tech.* **38**: 428-35.
- Perner, S., Mertz, K. D., Küfer, R. und Rubin, M. A. (2007) Biomarker beim Prostatakarzinom. *Onkologe* **13**: 669-676.
- Perner, S., Mosquera, J. M., Demichelis, F., Hofer, M. D., Paris, P. L., Simko, J., Collins, C., Bismar, T. A., Chinnaiyan, A. M., De Marzo, A. M. und Rubin, M. A. (2007) TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am.J.Surg.Pathol.* **31**: 882-8.
- Perner, S., Schmidt, F. H., Hofer, M. D., Kuefer, R. und Rubin, M. (2007) Die TMPRSS2-ETS-Genfusion beim Prostatakarzinom. *Urologe* **46**: 754-760.
- Perner, S., Demichelis, F., Beroukhim, R., Schmidt, F. H., Mosquera, J. M., Setlur, S., Tchinda, J., Tomlins, S. A., Hofer, M. D., Pienta, K. G., Kuefer, R., Vessella, R., Sun, X. W., Meyerson, M., Lee, C., Sellers, W. R., Chinnaiyan, A. M. und Rubin, M. A. (2006) TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res.* **66**: 8337-41.
- Pfaff, M., Sasaki, T., Tangemann, K., Chu, M. L. und Timpl, R. (1995) Integrin-binding and cell-adhesion studies of fibulins reveal a particular affinity for alpha IIb beta 3. *Exp.Cell Res.* **219**: 87-92.
- Piek, E., Heldin, C. H. und Ten Dijke, P. (1999) Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* **13**: 2105-24.
- Pihan, G. A., Wallace, J., Zhou, Y. und Doxsey, S. J. (2003) Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res.* **63**: 1398-404.
- Pound, C. R., Partin, A. W., Eisenberger, M. A., Chan, D. W., Pearson, J. D. und Walsh, P. C. (1999) Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* **281**: 1591-7.
- Preis, M., Cohen, T., Sarnatzki, Y., Ben Yosef, Y., Schneiderman, J., Gluzman, Z., Koren, B., Lewis, B. S., Shaul, Y. und Flugelman, M. Y. (2006) Effects of fibulin-5 on attachment, adhesion, and proliferation of primary human endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **348**: 1024-33.
- Pupa, S. M., Argraves, W. S., Forti, S., Casalini, P., Berno, V., Agresti, R., Aiello, P., Invernizzi, A., Baldassari, P., Twal, W. O., Mortarini, R., Anichini, A. und Ménard, S. (2004) Immunological and pathobiological roles of fibulin-1 in breast cancer. *Oncogene* **23**: 2153-60.
- Qing, J., Maher, V. M., Tran, H., Argraves, W. S., Dunstan, R. W. und McCormick, J. J. (1997) Suppression of anchorage-independent growth and matrigel invasion and delayed tumor formation by elevated expression of fibulin-1D in human fibrosarcoma-derived cell lines. *Oncogene* **15**: 2159-68.
- Quaglia, A., Etesami, N., Sim, R., Difford, J. und Dhillon, A. P. (2005) Vascular invasion and herniation by hepatocellular carcinoma in cirrhosis: A wolf in sheep's clothing? *Arch.Pathol.Lab.Med.* **129**: 639-44.



- Reinhardt, D. P., Sasaki, T., Dzamba, B. J., Keene, D. R., Chu, M. L., Göhring, W., Timpl, R. und Sakai, L. Y. (1996) Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J.Biol.Chem.* **271**: 19489-96.
- Ribeiro, F. R., Henrique, R., Martins, A. T., Jerónimo, C. und Teixeira, M. R. (2007) Relative copy number gain of MYC in diagnostic needle biopsies is an independent prognostic factor for prostate cancer patients. *Eur.Urol.* **52**: 116-25.
- Robert Koch-Institut (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends. *Eine gemeinsame Veröffentlichung des RKI und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.* **6. überarbeitete Auflage**
- Rohde, V., Katalinic, A., Wasem, J. und Aidelsburger, P. (2007) Prostataerkrankungen. In: Robert Koch-Institut (Hrsg) Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 36. Robert Koch-Institut, Berlin.
- Rosenblatt, S., Bassuk, J. A., Alpers, C. E., Sage, E. H., Timpl, R. und Preissner, K. T. (1997) Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins: characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC). *Biochem.J.* **324**: 311-9.
- Rosenbloom, J., Abrams, W. R. und Mecham, R. (1993) Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* **7**: 1208-18.
- Ryan, M. C., Christiano, A. M., Engvall, E., Wewer, U. M., Miner, J. H., Sanes, J. R. und Burgeson, R. E. (1996) The functions of laminins: lessons from in vivo studies. *Matrix Biol.* **15**: 369-81.
- Sadr-Nabavi, A., Ramser, J., Volkmann, J., Naehrig, J., Wiesmann, F., Betz, B., Hellebrand, H., Engert, S., Seitz, S., Kreutzfeld, R., Sasaki, T., Arnold, N., Schmutzler, R., Kiechle, M., Niederacher, D., Harbeck, N., Dahl, E. und Meindl, A. (2009) Decreased expression of angiogenesis antagonist EFEMP1 in sporadic breast cancer is caused by aberrant promoter methylation and points to an impact of EFEMP1 as molecular biomarker. *Int.J. Cancer* **124**: 1727-35.
- Sage, E. H. (1997) Terms of attachment: SPARC and tumorigenesis. *Nat.Med.* **3**: 144-6.
- Saiki, I. (1997) Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn.J.Pharmacol.* **75**: 215-42.
- Sakr, W. A. und Partin, A. W. (2001) Histological markers of risk and the role of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* **57**: 115-20.
- Sasaki, M., Tanaka, Y., Perincher, G., Dharia, A., Kotcherquina, I., Fujimoto, S. und Dahiya, R. (2002) Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **94**: 384-90.
- Sasaki, T., Göhring, W., Pan, T. C., Chu, M. L. und Timpl, R. (1995) Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *J.Mol.Biol.* **254**: 892-9.
- Sasaki, T., Kostka, G., Göhring, W., Wiedemann, H., Mann, K., Chu, M. L. und Timpl, R. (1995) Structural characterization of two variants of fibulin-1 that differ in nidogen affinity. *J.Mol.Biol.* **245**: 241-50.
- Sasaki, T., Wiedemann, H., Matzner, M., Chu, M. L. und Timpl, R. (1996) Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix. *J.Cell Sci.* **109**: 2895-904.

- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. und Seiki, M. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370**: 61-5.
- Sato, H., Takino, T. und Miyamori, H. (2005) Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci.* **96**: 212-7.
- Sathyanarayana, U. G., Padar, A., Suzuki, M., Maruyama, R., Shigematsu, H., Hsieh, J. T., Frenkel, E. P. und Gazdar, A. F. (2003) Aberrant promoter methylation of laminin-5-encoding genes in prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin.Cancer Res.* **9**: 6395-400.
- Schalken, J. (2006) Interview with Jack Schalken. PCA3 and its use as a diagnostic test in prostate cancer. Interview by Christine McKillop. *Eur.Urol.* **50**: 153-4.
- Schiemann, W. P., Blobel, G. C., Kalume, D. E., Pandey, A. und Lodish, H. F. (2002) Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades. *J.Biol.Chem.* **277**: 27367-77.
- Schmidt, U., Fuessel, S., Koch, R., Baretton, G. B., Lohse, A., Tomasetti, S., Unversucht, S., Froehner, M., Wirth, M. P. und Meye, A. (2006) Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate* **66**: 1521-34.
- Schmitz, M., Grignard, G., Margue, C., Dippel, W., Capesius, C., Mossong, J., Nathan, M., Giacchi, S., Scheiden, R. und Kieffer, N. (2007) Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis. *Int.J.Cancer* **120**: 1284-92.
- Schulz, W. A., Elo, J. P., Florl, A. R., Pennanen, S., Santourlidis, S., Engers, R., Buchardt, M., Seifert, H. H. und Visakorpi, T. (2002) Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **35**: 58-65.
- Schulz, W. A. und Hatina, J. (2006) Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J.Cell.Mol.Med.* **10**: 100-125.
- Schulz, W. A., Alexa, A., Jung, V., Hader, C., Hoffmann, M. J., Yamanaka, M., Fritzsche, S., Wlazlinski, A., Müller, M., Lengauer, T., Engers, R., Florl, A. R., Wullich, B. und Rahnenführer, J. (2007) 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.
- Schultz, D. W., Klein, M. L., Humpert, A. J., Luzier, C. W., Persun, V., Schain, M., Mahan, A., Runckel, C., Cassera, M., Vittal, V., Doyle, T. M., Martin, T. M., Weleber, R. G., Francis, P. J. und Acott, T.S. (2003) Analysis of the ARMD1 locus: evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family. *Hum.Mol.Genet.* **12**: 3315-23.
- Seiki, M. (1999) Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* **107**: 137-43.
- Shimizu, H., Ross, R. K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B. E. und Mack, T. M. (1991) Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br.J.Cancer* **63**: 963-6.
- Shiraishi, T., Kato, H., Komada, S., Imai, H., Hirokawa, Y., Kusano, I., Yatani, R. und Sakakura, T. (1994) Tenascin expression and postnatal development of the human prostate. *Int.J.Dev.Biol.* **38**: 391-5.

- Singer, A. J. und Clark, R. A. (1999) Cutaneous wound healing. *N.Engl.J.Med.* **341**: 738-46.
- Sisto, M., D'Amore, M., Lofrumento, D. D., Scagliusi, P., Amore, S.D., Mitolo, V. und Lisi, S. (2009) Fibulin-6 expression and anoikis in human salivary gland epithelial cells: implications in Sjogren's syndrome. *Int.Immunol.*
- Smith, J. R., Freije, D., Carpten, J. D., Grönberg, H., Xu, J., Isaacs, S. D., Brownstein, M. J., Bova, G. S., Guo, H., Bujnovszky, P., Nusskern, D. R., Damber, J. E., Bergh, A., Emanuelsson, M., Kallioniemi, O. P., Walker-Daniels, J., Bailey-Wilson, J. E., Beaty, T. H., Meyers, D. A., Walsh, P. C., Collins, F. S., Trent, J. M. und Isaacs, W. B. (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**: 1371-4.
- Sökeland, J., Lutz, W., Krieger, M. und Hassdenteufel, H. (2000) Urologie für Pflegeberufe. Krankheitslehre *Thieme* **7**. Auflage.
- Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G. 2nd., Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., Sy, M. S., Marengo, S. R., Rhim, J. S., Zhang, D. und Jacobberger, J. W. (1999) A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Anim.* **35**: 403-9.
- Sriramarao, P., Mendler, M. und Bourdon, M. A. (1993) Endothelial cell attachment and spreading on human tenascin is mediated by alpha 2 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J.Cell Sci.* **105**: 1001-12.
- Stamey, T. A., Caldwell, M. C., Fan, Z., Zhang, Z., McNeal, J. E., Nolley, R., Chen, Z., Mahadevappa, M. und Warrington, J. A. (2003) Genetic profiling of Gleason grade 4/5 prostate cancer: which is the best prostatic control tissue? *J.Urol.* **170**: 2263-8.
- Stark, M., Danielsson, O., Griffiths, W. J., Jörnvall, H. und Johansson, J. (2001) Peptide repertoire of human cerebrospinal fluid: novel proteolytic fragments of neuroendocrine proteins. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **754**: 357-67.
- Stephan, C., Yousef, G. M., Scorilas, A., Jung, K., Jung, M., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Kishi, T., Nakamura, T., Loening, S. A. und Diamandis, E. P. (2004) Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. *J.Urol.* **171**: 187-91.
- Stephenson, R. A. (2002) Prostate cancer trends in the era of prostate-specific antigen. An update of incidence, mortality, and clinical factors from the SEER database. *Urol.Clin.North.Am.* **29**: 173-81.
- Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S. und Liotta, L. A. (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu.Rev.Cell Biol.* **9**: 541-73.
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H. und Paulson, D. F. (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int.J.Cancer* **21**: 274-81.
- Stone, E. M., Braun, T. A., Russell, S. R., Kuehn, M. H., Lotery, A. J., Moore, P. A., Eastman, C. G., Casavant, T. L. und Sheffield, V. C. (2004) Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *N.Engl.J.Med.* **351**: 346-53.
- Ström, A., Olin, A. I., Aspberg, A. und Hultgårdh-Nilsson, A. (2006) Fibulin-2 is present in murine vascular lesions and is important for smooth muscle cell migration. *Cardiovasc.Res.* **69**: 755-63.

- Sung, S. Y., Hsieh, C. L., Law, A., Zhau, H. E., Pathak, S., Multani, A. S., Lim, S., Coleman, I. M., Wu, L.C., Figg, W. D., Dahut, W. L., Nelson, P., Lee, J. K., Amin, M. B., Lyles, R., Johnstone, P. A., Marshall, F. F. und Chung, L. W. (2008) Coevolution of prostate cancer and bone stroma in three-dimensional coculture: implications for cancer growth and metastasis. *Cancer Res.* **68**: 9996-10003.
- Tabarés, G., Jung, K., Reiche, J., Stephan, C., Lein, M., Peracaula, R., de Llorens, R. und Hoesel, W. (2007) Free PSA forms in prostatic tissue and sera of prostate cancer patients: analysis by 2-DE and western blotting of immunopurified samples. *Clin.Biochem.* **40**: 343-50.
- Talts, J. F., Andac, Z., Göhring, W., Brancaccio, A. und Timpl, R. (1999) Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* **18**: 863-70.
- Tang, D. G. und Porter, A. T. (1997) Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. *Prostate* **32**: 284-93.
- Taraboletti, G., Roberts, D. D. und Liotta, L. A. (1987) Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *J.Cell Biol.* **105**: 2409-15.
- Tavtigian, S. V., Simard, J., Teng, D. H., Abtin, V., Baumgard, M., Beck, A., Camp, N. J., Carillo, A. R., Chen, Y., Dayananth, P., Desrochers, M., Dumont, M., Farnham, J. M., Frank, D., Frye, C., Ghaffari, S., Gupte, J. S., Hu, R., Iliev, D., Janecki, T., Kort, E. N., Laity, K. E., Leavitt, A., Leblanc, G., McArthur-Morrison, J., Pederson, A., Penn, B., Peterson, K. T., Reid, J. E., Richards, S., Schroeder, M., Smith, R., Snyder, S. C., Swedlund, B., Swensen, J., Thomas, A., Tranchant, M., Woodland, A. M., Labrie, F., Skolnick, M. H., Neuhausen, S., Rommens, J. und Cannon-Albright, L. A. (2001) A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat.Genet.* **27**: 172-80.
- Thiel, G. und Cibelli, G. (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J.Cell.Physiol.* **193**: 287-92.
- Thigpen, A. E., Cala, K. M., Guileyardo, J. M., Molberg, K. H., McConnell, J. D. und Russell, D. W. (1996) Increased expression of early growth response-1 messenger ribonucleic acid in prostatic adenocarcinoma. *J.Urol.* **155**: 975-81.
- Thomas, L. (2007) Labor und Diagnose. *TH-Books Verlagsgesellschaft* **7**: 1345.
- Thompson, I., Thrasher, J. B., Aus, G., Burnett, A. L., Candy-Hagino, E. D., Cookson, M. S., D'Amico, A. V., Dmochowski, R. R., Eton, D. T., Forman, J. D., Goldenberg, S. L., Hernandez, J., Higano, C. S., Kraus, S. R., Moul, J. W., Tangen, C. M., AUA Prostate Cancer Clinical Guideline Update Panel (2007) Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *J.Urol.* **177**: 2106-31.
- Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G. und Chu M. L. (2003) Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**: 479-89.
- Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X. W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J.E., Shah, R.B., Pienta, K. J., Rubin, M. A. und Chinnaiyan, A.M. (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**: 644-8.

- Tran, H., Tanaka, A., Litvinovich, S. V., Medved, L. V., Haudenschild, C. C. und Argraves, W. S. (1995) The interaction of fibulin-1 with fibrinogen. A potential role in hemostasis and thrombosis. *J.Biol.Chem.* **270**: 19458-64.
- Tran, P. K., Agardh, H. E., Tran-Lundmark, K., Ekstrand, J., Roy, J., Henderson, B., Gabrielsen, A., Hansson, G. K., Swedenborg, J., Paulsson-Berne, G. und Hedin, U. (2007) Reduced perlecan expression and accumulation in human carotid atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **190**: 264-70.
- Tripathi, M., Nandana, S., Yamashita, H., Ganesan, R., Kirchhofer, D. und Quaranta, V. (2008) Laminin-332 is a substrate for hepsin, a protease associated with prostate cancer progression. *J.Biol.Chem.* **283**: 30576-84.
- Tucker, R. P., Drabikowski, K., Hess, J. F., Ferralli, J., Chiquet-Ehrismann, R. und Adams, J. C. (2006) Phylogenetic analysis of the tenascin gene family: evidence of origin early in the chordate lineage. *BMC Evol.Biol.* **6**: 60.
- Turley, E. A., Noble, P. W. und Bourguignon, L. Y. (2002) Signaling properties of hyaluronan receptors. *J.Biol.Chem.* **277**: 4589-92.
- Twal, W. O., Czirok, A., Hegedus, B., Knaak, C., Chintalapudi, M. R., Okagawa, H., Sugi, Y. und Argraves, W. S. (2001) Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility. *J.Cell Sci.* **114**: 4587-98.
- Udayakumar, T. S., Chen, M. L., Bair, E. L., Von Bredow, D. C., Cress, A. E., Nagle, R. B. und Bowden, G. T. (2003) Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by prostate carcinoma cells cleaves human laminin-5 beta3 chain and induces cell migration. *Cancer Res.* **63**: 2292-9.
- van Bokhoven, A., Caires, A., Maria, M. D., Schulte, A. P., Lucia, M. S., Nordeen, S. K., Miller, G. J. und Varella-Garcia, M. (2003) Spectral karyotype (SKY) analysis of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* **57**: 226-44.
- van der Heul-Nieuwenhuijsen, L., Hendriksen, P. J., van der Kwast, T. H. und Jenster, G. (2006) Gene expression profiling of the human prostate zones. *BJU Int.* **98**: 886-97.
- Vogel, B. E. und Hedgecock, E. M. (2001) Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development* **128**: 883-94.
- Walker, R. A., Dearing, S. J. und Gallacher, B. (1994) Relationship of transforming growth factor beta 1 to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma. *Br.J.Cancer* **69**: 1160-5.
- Welsch, U. (1997) Sobotta Histologie *Urban & Schwarzenberg* **5**. Auflage.
- Wen, Y., Giardina, S. F., Hamming, D., Greenman, J., Zachariah, E., Bacolod, M. D., Liu, H., Shia, J., Amenta, P. S., Barany, F., Paty, P., Gerald, W. und Notterman, D. (2006) GROalpha is highly expressed in adenocarcinoma of the colon and down-regulates fibulin-1. *Clin. Cancer Res.* **12**: 5951-9.
- Werb, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**: 439-42.
- Wight, T. N., Lara, S., Riessen, R., Le Baron, R. und Isner, J. (1997) Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. *Am.J.Pathol.* **151**: 963-73.



- 
- Wilson, K. E., Bartlett, J. M., Miller, E. P., Smyth, J. F., Mullen, P., Miller, W. R. und Langdon, S. P. (1999) Regulation and function of the extracellular matrix protein tenascin-C in ovarian cancer cell lines. *Br.J.Cancer* **80**: 685-92.
  - Xiang, Y., Sekine, T., Nakamura, H., Imajoh-Ohmi, S., Fukuda, H., Yudoh, K., Masuko-Hongo, K., Nishioka, K. und Kato, T. (2006) Fibulin-4 is a target of autoimmunity predominantly in patients with osteoarthritis. *J.Immunol.* **176**: 3196-204.
  - Xie, L., Palmsten, K., MacDonald, B., Kieran, M. W., Potenta, S., Vong, S. und Kalluri, R. (2008) Basement membrane derived fibulin-1 and fibulin-5 function as angiogenesis inhibitors and suppress tumor growth. *Exp.Biol.Med. (Maywood)*. **233**: 155-62.
  - Xu, J., Zheng, S. L., Komiya, A., Mychaleckyj, J. C., Isaacs, S. D., Hu, J. J., Sterling, D., Lange, E. M., Hawkins, G. A., Turner, A., Ewing, C. M., Faith, D. A., Johnson, J. R., Suzuki, H., Bujnovszky, P., Wiley, K. E., DeMarzo, A. M., Bova, G. S., Chang, B., Hall, M. C., McCullough, D. L., Partin, A. W., Kassabian, V. S., Carpten, J. D., Bailey-Wilson, J. E., Trent, J. M., Ohar, J., Bleecker, E. R., Walsh, P. C., Isaacs, W. B. und Meyers, D. A. (2002) Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat.Genet.* **32**: 321-5.
  - Yanagisawa, H., Davis, E. C., Starcher, B. C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J. A. und Olson, E. N. (2002) Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* **415**: 168-71.
  - Yegnasubramanian, S., Haffner, M. C., Zhang, Y., Gurel, B., Cornish, T. C., Wu, Z., Irizarry, R. A., Morgan, J., Hicks, J., DeWeese, T. L., Isaacs, W. B., Bova, G. S., De Marzo, A. M. und Nelson, W. G. (2008) DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res.* **68**: 8954-67.
  - Yi, C. H., Smith, D. J., West, W. W. und Hollingsworth, M. A. (2007) Loss of fibulin-2 expression is associated with breast cancer progression. *Am.J.Pathol.* **170**: 1535-45.
  - Yoshida, H., Yoshida, T., Iizuka, T., Sakakura, T. und Fujita, S. (1999) The expression of transforming growth factor beta (TGF-beta) in the synovial membrane of human temporomandibular joint with internal derangement: a comparison with tenascin expression. *J.Oral.Rehabil.* **26**: 814-20.



## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### 7.1 Allgemeine Abkürzungen

5-aza-dC	5-aza-2'-Desoxycytidin
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Ca	Karzinom
cDNA	Complementary Deoxyribo Nucleic Acid
CGH	Comparative Genomic Hybridization
COPA	Cancer Outlier Profile Analysis
CpG	Cytosin/Guanin-Dinukleotid
Ct	Cycle Threshold
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRU	digitale rektale Untersuchung
DTT	Dithiothreitol
FISH	fluorescence in situ hybridization
ECM	Extrazelluläre Matrix
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
Egr-1	early growth response 1
FCS	fötales Kälberserum
F-PSA	freies Prostata-spezifisches Antigen
fwd	forward
HGPIN	high-grade prostatic intraepitheliale Neoplasie
HPC1, 2	hereditary prostate cancer 1, 2
IL-6	Interleukin-6
LINE	long interspersed nuclear element
kDa	Kilodalton
LOH	Loss Of Heterozygosity
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MT-MMP	membrane-type Matrix-Metalloproteinasen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PIA	proliferative inflammatorische Atrophie
PIN	prostatic intraepitheliale Neoplasie
PreC	Normale Prostataepithelzellen
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	single nucleotide polymorphism
SPOCK	SPARC/Osteonectin, CWCV and Kazal-like domains proteoglycan
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,'N`-Tetramethyl-ethylendiamin
TGFβ	transforming growth factor beta
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TM	Schmelztemperatur
TNM	Tumor, Nodulus, Metastase
T-PSA	totales Prostata-spezifisches Antigen
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan
TRUS	transrektaler Ultraschall
TSG	Tumorsuppressor-Gen
UICC	Union internationale contre le cancer
WHO	World Health Organisation

## 7.2 Genbezeichnungen

<i>AR</i>	Androgenrezeptor
<i>APC</i>	adenomatous polyposis coli
<i>BRCA 1, 2</i>	breast cancer gene 1, 2
<i>c-MYC</i>	cellular myelocytomatosis oncogene
<i>COX2</i>	cyclooxygenase 2
<i>ERG</i>	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
<i>EGR1</i>	early growth response 1
<i>ELAC2</i>	elaC homolog 2 (E.coli)
<i>ETV1</i>	ETS variant gene 1
<i>ETV4</i>	ETS variant gene 4
<i>GSTP1, M1, T1</i>	Glutathion-S-Transferase Pi-1, M1, T1
<i>HPSE</i>	heparanase
<i>LOX</i>	lysyl oxidase
<i>LOXL1</i>	lysyl oxidase-like 1
<i>MSR1</i>	macrophage scavenger receptor 1
<i>NKX3.1</i>	NK3 homeobox 1
<i>PCA3</i>	prostate cancer gene 3
<i>PTEN</i>	Phosphatase and Tensin Homologue chromosome 10
<i>p53 (TP53)</i>	Protein 53 kDa
<i>RNASEL</i>	Ribonuclease L
<i>SPOCK1</i>	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1
<i>TBP</i>	TATA-box-binding protein-Gen
<i>TMPRSS2</i>	Transmembrane protease, serine 2

## 8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schulz für das sehr interessante Thema, die freundliche und gute Betreuung meiner Arbeit, viele wertvolle Anregungen und die hilfsbereite Unterstützung jederzeit, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, sowie die Möglichkeit, aktiv am Kongress teilzunehmen und in Homburg eine neue Methode der Genkopienzahlbestimmung kennenzulernen.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Engers für die Ermöglichung der Durchführung der immunhistochemischen Arbeiten und die Übernahme des Zweitgutachtens, PD Dr. Eisenberger für die Übernahme der Drittprüfung, allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Atmosphäre und unkomplizierte, hilfsbereite Zusammenarbeit, Christiane Hader für die hilfsbereite und freundliche Einarbeitung in die Methoden der PCR, Michèle Janine Hoffmann für die großartige Unterstützung beim Westernblot, die Bereitstellung der Proteinlysate sowie bei den immunzytochemischen Färbungen, Dr. Volker Jung für die Ermöglichung und freundliche Hilfsbereitschaft bei dem Kennenlernen der Methode für Genkopienzahlbestimmung und natürlich meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Freund Dr. Günther Kappert, die mir mit viel Liebe und Unterstützung immer beigestanden und an mich geglaubt haben.

**Tabellarischer Lebenslauf**

Name	Agnes Wlazlinski
Wohnort, Straße	47809 Krefeld, Lanker Str. 38
Geburtsdatum	28 März 1978
Geburtsort	Köslin / Polen
Eltern	Wladyslawa Wlazlinski geb. Miszkiewicz, Maschinenschlosserin, Georg Wlazlinski, Berufschullehrer
Bruder	Michael Wlazlinski, Chemielaborant

**Schulbesuch**

09/1985-12/1987	Volksschule in Köslin
01/1988-07/1989	Kath. Grundschule in Krefeld
09/1989-07/1995	Ter-Meer-Realschule in Krefeld
08/1995-05/1998	Gymnasium Fabritianum in Krefeld
Abschluss	Allgemeine Hochschulreife

**Berufsausbildung**

10/1998-10/2001	Ausbildung zur Krankenschwester im Allgemeinen Krankenhaus Viersen
-----------------	---

**Studium**

10/2001-11/2008	Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
-----------------	--

**Famulaturen**

Pathologie, Dermatologie, Mund-Kiefer-  
Gesichtschirurgie, Radiologie, Hämostaseologie

**Praktisches Jahr**

Wahlfach: Gynäkologie in Marienhospital  
Düsseldorf

## Veränderungen in der Expression von Fibulinen und anderen Proteinen der extrazellulären Matrix im Prostatakarzinom

Störungen in der Struktur und Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix und der Basalmembran spielen beim Prostatakarzinom eine zentrale Rolle. Bekannt sind bereits Veränderungen in der Expression zahlreicher Mitglieder aus der Laminin- und Kollagenfamilie, die häufig auf epigenetische Aberrationen zurückzuführen sind. Hinweise aus einer Mikroarrayuntersuchung deuteten auf Veränderungen bei weiteren Genen, die für die Extrazellulären Matrixproteine kodieren, nämlich FBLN1, 4, 5 (Fibuline), SPOCK1 (Testican-1) und TENC (Tenascin-C).

Als Bestandteile von Basalmembranen und elastischen Fasern stehen die Fibuline mit der Progression verschiedener Tumorarten im Zusammenhang. Bisher konnte durch immunhistochemische Analysen eine Überexpression von Fibulin-1 in gynäkologischen Karzinomen, jedoch auch eine Herunterregulation im Kolonkarzinom nachgewiesen werden. Auch für Fibulin-4 gelang ein Nachweis einer Überexpression im Kolonkarzinom und könnte auf eine onkogene Wirkung hinweisen. Da für Fibulin-5 hingegen eine verminderte Expression in verschiedenen Tumorarten und eine hemmende Wirkung auf Angiogenese nachgewiesen wurde, wird es als möglicher Tumorsuppressor betrachtet. Tenascin-C stimuliert die Tumorzell-Proliferation, indem es der proliferations-supprimierenden Wirkung von Fibronectin entgegenwirkt und wird z. B. im Mammakarzinom und in Gliomen mit einer schlechten Prognose stark exprimiert. Hohe Expressionen von Testican-1 wurden im Gehirn, speziell im Thalamus gefunden, an dessen Entwicklung und Funktion es vermutlich regulatorisch beteiligt ist. Seine Funktion in Tumoren ist unbekannt, jedoch inhibiert es Matrixmetalloproteinasen.

In dieser Arbeit wurde zunächst mittels quantitativer RT-PCR die Expression von FBLN1, FBLN4, FBLN5, SPOCK1 sowie TENC an einer Gruppe von 47 M0 Prostatakarzinom- und 13 Prostatanormal-Gewebeproben gemessen. Alle FBLN-Gene waren in Tumorgewebe deutlich signifikant vermindert exprimiert. Die Expression der Spleißvarianten FBLN1C und FBLN1D war dabei sehr ähnlich. SPOCK1 hingegen wurde im Tumorgewebe signifikant überexprimiert. Dagegen lagen für TENC keine signifikanten Unterschiede vor. Keine der Expressionsveränderungen hing signifikant mit Tumorstadium oder klinischem Verlauf zusammen. Als mögliche Ursache der verminderten FBLN-Expressionen, wurde nach Hinweisen auf eine veränderte Methylierung gesucht. Induktionsversuche mit einem Inhibitor der DNA-Methylierung (5-Aza-2'-Desoxycytidin) ergaben für FBLN4 in Prostatakarzinom-Zelllinien eine Induktion, nicht jedoch für FBLN1 und FBLN5. Der FBLN4 Gen-Promotor war jedoch generell unmethyliert; nur SssI-(CpG)-Methylase behandelte DNA als Positivkontrolle zeigte eine fast vollständige Methylierung. Es ist daher eher unwahrscheinlich, dass die Herunterregulation der FBLN-Gene im Prostatakarzinom auf DNA-Hypermethylierung zurückzuführen ist.

Als weitere Ursache veränderter Genexpression -gestützt auf veröffentlichte CGH-Daten- wurde die Gendosis von FBLN1 auf Chromosom 22q13.31, von SPOCK1 auf Chromosom 5q31 und zusätzlich eines direkten Nachbargens von SPOCK1, nämlich EGR1, gemessen. Dabei zeigte FBLN1 in einigen Prostatakarzinom-Gewebeproben tatsächlich verminderte Genkopienzahl; bei SPOCK1 hingegen wurde in vereinzelt Fällen eine Erhöhung der Genkopienzahl ermittelt. Die Untersuchungen der Genkopienzahl von EGR1 ergab keine Erhöhung. Somit könnte am ehesten das verminderte Expressionsniveau von FBLN1 auf Genverluste zurückzuführen sein.

Immunhistochemische Analysen zeigten insgesamt eine sehr schwache Expression von Fibulin-1 in gesunden Prostataarealen. Bei den meisten Prostatakarzinomen lag eine stärkere, jedoch intrazelluläre Fibulin-1-Expression im Vergleich zu benignen Drüsen vor. Diese zeigte keine Korrelation zu den mRNA-Expressionsergebnissen. Fibulin-5 wurde überwiegend im Stroma der Prostata lokalisiert mit der stärksten Färbung in der periurethralen Zone. In Übereinstimmung mit den mRNA-Expressionsergebnissen waren die meisten Tumore negativ oder nur schwach positiv. Für Fibulin-4 war kein Antikörper verfügbar.

Zusammenfassend war bei drei Genen, die Fibuline kodieren, nämlich FBLN1, FBLN4 und FBLN5 eine signifikante Herunterregulation des mRNA-Expressionsniveaus im Prostatakarzinom festzustellen. Im Gegensatz dazu war die Expression von SPOCK1, eines weiteren extrazellulären Matrix-Gens, hochreguliert. Aberrante DNA-Methylierungsmuster scheinen für die Veränderungen in der FBLN-Expression nicht verantwortlich zu sein, jedoch in einigen Fällen Kopienzahlveränderungen. Die Lokalisation von Fibulin-5 in Prostatazonen, die für die Entstehung von Karzinomen weniger anfällig sind und die Herunterregulation im Prostatakarzinom unterstützt die Hypothese, dass Fibulin-5 auch im Prostatakarzinom als Tumorsuppressor wirkt. Fibulin-1 neigt zur Akkumulation im Zytoplasma von Prostatakarzinomzellen, obwohl seine mRNA herunterreguliert ist. Die verminderte FBLN1-Expression im Prostatakarzinom steht im Gegensatz zu der in gynäkologischen Karzinomen und beruht am ehesten auf unterschiedlicher Regulation, vielleicht durch Östrogene.