

Aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

(Direktor Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert)

**Expression und prognostische Relevanz von Tiam1 und Rac im  
humanen Prostatakarzinom: Eine semiquantitative  
immunhistochemische Untersuchung**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf

vorgelegt von

Alexandra Walter

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: PD Dr. med. Rainer Engers

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Schulz

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	4
1 EINLEITUNG .....	5
1.1 Die Prostata .....	5
1.2 Das Prostatakarzinom .....	6
1.3 Prognosekriterien des Prostatakarzinoms .....	11
1.4 Molekularbiologie des Prostatakarzinoms .....	12
1.5 Der Tiam1/ Rac Signalweg .....	14
1.6 Fragestellung .....	18
2 MATERIAL UND METHODEN .....	19
2.1 Patientenkollektiv .....	19
2.1.1 Histologische Untersuchung .....	19
2.2 Immunhistochemie .....	19
2.2.1 Das Ventana Benchmark Gerät .....	20
2.2.2 Der Tiam1 Antikörper .....	21
2.2.3 Der Rac Antikörper .....	21
2.3 Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbung .....	22
2.4 Reagenzien und Geräte .....	23
2.4.1 Statistische Analyse .....	23
3 ERGEBNISSE .....	25
3.1 Patientenkollektiv, klinische und pathologische Daten .....	25
3.2 Tiam1-Expression .....	26
3.2.1 Expressionsanalyse von Tiam1 .....	26
3.2.2 Univariate Analyse .....	30
3.2.3 Multivariate Analyse .....	32

3.3	Rac-Expression .....	33
3.3.1	Expressionsanalyse von Rac.....	33
3.3.2	Univariate Analyse.....	36
3.3.3	Multivariate Analyse.....	38
4	DISKUSSION .....	39
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	43
6	LITERATUR.....	45
7	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	51
8	DANKSAGUNG .....	52
9	LEBENS LAUF .....	53

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BVI	Blutgefäßinvasion
CC	Coiled-Coil Domain
DAB	Diaminobenzidin
DH	Dbl-Homology Domain
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
EX	Extended Domain
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GDS	GDP Dissoziationsstimulator
HE	Hämatoxylin und Eosin
HG-PIN	High-grade prostatistische intraepitheliale Neoplasie
IRS	Immunreaktiver Score
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal Kinase
kDa	Kilo Dalton
LAB	Avidin Biotin Methode
LG-PIN	Low-grade prostatistische intraepitheliale Neoplasie
LHRH	Luteisierendes Hormon-Releasing-Hormon
LVI	Lymphgefäßinvasion
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
PAP	Saure Phosphatase
PDZ	PSD-95/DlgA/ZO-1 Domain
PH	Pleckstrin Homology Domain
PIN	Prostatistische intraepitheliale Neoplasie
PNSI	Perineuralscheideninvasion
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RBD	Ras Binding Domain
Tiam1	T-Lymphoma invasion and metastasis

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

### Abbildungen:

- Abb.1 Domänenstruktur von Tiam1
- Abb.2 Übersicht über die Signalwege, die durch Tiam1 und Rac aktiviert werden können
- Abb.3 Tiam1-Expression in der Prostata
- Abb.4 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von etablierten Prognoseparametern und der Tiam1-Expression
- Abb.5 Rac-Expression in der Prostata
- Abb.6 Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit von etablierten Prognoseparametern und der Rac-Expression

### Tabellen:

- Tab.1 TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms
- Tab.2a Prozentsatz positiver Zellen
- Tab.2b Färbeintensität
- Tab.3 Zusammenstellung der Reagenzien
- Tab.4 Zusammenstellung der verwendeten Geräte
- Tab.5 Klinisch-pathologische Merkmale der Tiam1-Überexpression
- Tab.6 Multivariate Analyse der Tiam1-Überexpression
- Tab.7 Klinisch-pathologische Merkmale der Rac-Überexpression
- Tab.8 Multivariate Analyse der Rac-Überexpression

## **1 EINLEITUNG**

Mit heutigen Mitteln und Methoden können früh entdeckte Prostatakarzinome, die progredient wachsen werden, nicht von solchen unterschieden werden, die ruhen. Eine verlässliche Vorhersage bezüglich der weiteren Tumorentwicklung ist auf der Grundlage des Grading und Staging allein nicht machbar. Für die Identifizierung der Patienten, die in hohem Maße einem Progressionsrisiko ausgesetzt sind und somit von einer aggressiven Therapie profitieren würden, bzw. der Patienten mit niedrigem Progressionsrisiko, denen möglicherweise eine radikale Prostatektomie erspart werden kann, sind zusätzliche prognostische Parameter notwendig, die den weiteren Verlauf der Erkrankung frühzeitig und zuverlässig einschätzbar machen.

Die vorliegende Studie untersucht die prognostische Bedeutung der Proteinexpression von Tiam1 und Rac im Prostatakarzinom.

### **1.1 Die Prostata**

Die Prostata gehört neben den Samenblasen und den Cowperschen Drüsen zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes. Mit ihrer Basis liegt sie der Harnblase an und umgibt einen Teil der Urethra. Die Hinterfläche ist dem Rektum zugewandt und von dort aus tastbar. Das ca. 20g schwere Organ besteht aus 30-50 tubuloalveolären Drüsen, die von einem Stroma aus glatter Muskulatur und Bindegewebe mit kollagenen, retikulären und elastischen Fasern umgeben sind. Die 12-20 Ausführungsgänge münden in die Pars prostatica urethrae und geben bei der Ejakulation ein Sekret ab, das die Bewegungsfähigkeit der Spermien beeinflusst und zur Verflüssigung des Ejakulates führt.

Die Vorsteherdrüse ist 3x5cm groß und lässt sich in 4 Zonen gliedern [McNeal 1981]: Die zentrale Zone befindet sich zwischen und um die Ductus ejaculatorii herum und bildet ca. 25% der Drüsenmasse. Die Transitionalzone umgibt die proximale Urethra (ca. 5-10% der Drüsenmasse). Hier entwickelt sich vornehmlich die benigne Prostatahyperplasie. Die periphere Zone umgibt die zentrale und transitionale Zone und bildet ca. 70% der Drüsenmasse. Die Mehrzahl der Prostatakarzinome entsteht hier. Die fibromuskuläre

anteriore Zone bildet die komplette vordere Oberfläche. Umgeben wird die Prostata von einer Kapsel aus komprimiertem fibromuskulärem Stroma z.T. mit quergestreifter Muskulatur.

Histologisch kann man 3 verschiedene Prostataepithel-Zelltypen unterscheiden: Das hochzylindrische sekretorische Epithel ist androgen-abhängig und exprimiert u.a. saure Phosphatase (PAP) und Prostataspezifisches Antigen (PSA). Die Basalzellen bilden androgen-unabhängig verschiedene Zytokeratine. Ein weiterer Zelltyp sind Zellen mit neuroendokriner Differenzierung, die u.a. Serotonin sezernieren.

## 1.2 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom stellt in den USA mit einer geschätzten Anzahl von 230.110 Neuerkrankungen für das Jahr 2004 die häufigste Krebserkrankung des Mannes dar. Die Mortalität liegt mit 10% hinter dem Bronchialkarzinom auf Rang 2 [Cancer statistics 2004]. In Deutschland rechnet man mit ca. 48.500 neuen Fällen und 11.500 Todesfällen pro Jahr [Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI 2006]. Insgesamt geht man heute davon aus, dass bei etwa jedem 3. Mann ein Prostatakarzinom entsteht, etwa jeder 6. Mann am Prostatakarzinom erkrankt und etwa jeder 30. Mann an einem Prostatakarzinom verstirbt [Cancer statistics 2004]. Der Häufigkeitsgipfel liegt jenseits des 70. Lebensjahres; selten werden Prostatakarzinome vor dem 50. Lebensjahr diagnostiziert.

Die Inzidenz weist ethnische und geographische Unterschiede auf: Während bei schwarzen Amerikanern die höchste Inzidenzrate zu verzeichnen ist, kommt das Prostatakarzinom in Japan sehr selten vor. Bemerkenswert ist ein Anstieg der Inzidenz bei Japanern, die in die USA auswandern – ein Hinweis auf Umwelt- und diätische Faktoren [Marks et al. 2004]. So fand sich eine erhöhte Inzidenz des Prostatakarzinoms bei hohem Fettkonsum und faserarmer Nahrung, während Getreide und Gemüse eine protektive Wirkung besitzt. [Schmitz-Drager et al. 2001]. In diesem Zusammenhang wird eine Störung des Östrogen/Androgen-Gleichgewichts zugunsten des Androgens als ursächlich für die Tumorentstehung

diskutiert. Hierfür spricht z.B., dass Männer, die in ihrer Kindheit bereits kastriert wurden, kein Prostatakarzinom entwickeln.

Das sporadisch auftretende Prostatakarzinom stellt mit 74% der Fälle die häufigste Form dar [Hanus et al. 1999]. Eine familiäre Häufung wurde wiederholt beschrieben. Tritt ein Prostatakarzinom in mindestens 3 aufeinander folgenden Generationen oder bei 2 Verwandten 1. Grades vor dem 55. Lebensjahr auf, so kann von einem hereditären Tumor gesprochen werden. Dieser ist in 5% der Fälle zu verzeichnen [Hanus et al. 1999]. Weder der sozioökonomische Status, die sexuelle Aktivität noch die benigne Prostatahyperplasie scheinen eine Rolle hinsichtlich der Ätiologie zu spielen.

Man unterscheidet 4 verschiedene Erscheinungsformen des Prostatakarzinoms: Das manifeste Karzinom wird durch gezielte Diagnostik entdeckt und durch histologische Beurteilung von Biopsatgewebe bestätigt, während das inzidente Karzinom zufällig bei der Aufarbeitung von Prostatagewebe gefunden wird. Das okkulte Karzinom tritt erstmals als Metastase in Erscheinung, wobei Symptome des Primärtumors fehlen. Das latente Karzinom wird erst im Rahmen einer Autopsie gefunden, ohne dass zu Lebzeiten Hinweise darauf bestanden. Die Feststellung eines latenten Karzinoms in bis zu 73% aller Autopsien spricht für die hohe Inzidenz und lange asymptomatische Phase des Prostatakarzinoms.

Klinisch bleibt das Prostatakarzinom lange Zeit symptomlos. Erst im fortgeschrittenen Stadium können durch lokales Wachstum Miktionsstörungen mit Pollakisurie, Hämaturie, Nykturie oder eine erektile Dysfunktion auftreten. Bedingt durch eine Präferenz zur Knochenmetastasierung sind die vorherrschenden klinischen Symptome „Rückenschmerzen“. Im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen sind die digital-rektale Untersuchung sowie die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) zur möglichen Früherkennung eines Prostatakarzinoms sinnvoll. Das PSA ist eine 34kDa schwere Serin-Protease aus der Familie der Kallikreine, die von den Epithelzellen der Prostatadrüsen gebildet wird. Der messbare Serumwert steigt sowohl bei Entzündung des Organs, benigner Hyperplasie, maligner Entartung als auch nach digitaler Untersuchung der Prostata an. Ein erhöhter PSA-Wert ist demnach keinesfalls ein Karzinombeweis, kann jedoch ein Hinweis

auf ein Prostatakarzinom sein. Als Tumormarker wird der PSA-Wert zur späteren Verlaufsbeobachtung bei manifestem Prostatakarzinom eingesetzt. Zur weiteren Diagnostik ist bei suspektem Tastbefund und erhöhtem PSA-Wert die transrektale Endosonographie möglich. Zur endgültigen Diagnosesicherung muss eine bioptische Untersuchung durchgeführt werden, bei der aus definierten Arealen und echoarmen Zonen, in der Regel 8-10 Gewebestanden unter sonographischer Kontrolle zur histologischen Begutachtung entnommen werden.

Bevorzugte Lokalisation des Prostatakarzinoms ist die periphere Zone (80%). In ca. 50% der Fälle besteht bereits primär ein multifokales Tumorwachstum. Aufgrund der Nähe zur Organkapsel kann es schon relativ früh zur Kapselinfiltration, Kapselpenetration und Ausbreitung der Tumorzellen ins periprostatice Gewebe kommen. Die Metastasierung erfolgt lymphogen zunächst in die regionalen Beckenlymphknoten und hämatogen v.a. in Knochen, seltener in Leber und Lunge. Die TNM-Klassifikation (Tabelle 1) dient der Beschreibung der Tumorausdehnung, Festlegung der Therapieauswahl und ist als Prognosekriterium zu werten [UICC 6.Auflage 2002].

Tabelle 1: TNM Klassifizierung des Prostatakarzinoms

<b>TNM Klassifizierung [UICC 6. Auflage 2002]</b>	
<u>Primärtumor T</u>	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
T1	klinisch nicht erfassbarer Tumor (weder tastbar noch bildgebend darstellbar)
T1a	zufälliger histologischer Befund, < 5% des resezierten Gewebes
T1b	zufälliger histologischer Befund, > 5% des resezierten Gewebes
T1c	Diagnose durch Stanzbiopsie
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor in einer Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor auf einen Lappen begrenzt
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Kapsel
T3a	einseitige oder beidseitige extrakapsuläre Ausbreitung
T3b	Tumorinfiltration der Samenblasen
T4	Tumor infiltriert andere Strukturen/Organe als Samenblasen (z.B. Blasenhals, Sphinkter externus, Rektum und/oder Levatormuskel und/oder ist an der Beckenwand fixiert)
<u>regionäre Lymphknoten N</u>	
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastase
<u>Fernmetastasen M</u>	
Mx	das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	nicht regionäre Lymphknotenmetastasen
M1b	Skelettmetastasen
M1c	andere Organe sind befallen

Die Histomorphologie des Prostatakarzinoms ist vielgestaltig. In 95% der Fälle handelt es sich um ein Adenokarzinom, das glanduläre, kribriforme oder solide-trabekuläre Wachstumsmuster aufweisen kann. Sehr viel seltener kommen urotheliale, plattenepitheliale, muzinöse oder Basalzell-Karzinome vor.

Zur Beurteilung der Tumordifferenzierung stehen verschiedene Grading Systeme zur Verfügung. Nach UICC werden die Grade G1-G4 mit absteigender Differenzierung festgelegt [UICC 6. Auflage 2002]. Das allerdings international am häufigsten verwendete Gradingssystem ist das Gleason Grading, das den verschiedenen Wachstumsmustern des Prostatakarzinoms Zahlenwerte von 1-5 zuordnet und einen Gleason Score definiert, der sich aus der Summe der Zahlenwerte des primär vorherrschenden Musters und des am zweithäufigsten vorkommenden Musters errechnet [Gleason 1988]. Sofern nur ein Wachstumsmuster vorliegt, wird der Zahlenwert dieses Musters verdoppelt. Damit reicht der Gleason Score von minimal 2 (=1+1) bis maximal 10 (=5+5), wobei ein Score von 2 einem hoch differenzierten Tumor, ein Score von 10 einem sehr gering differenzierten Tumor entspricht.

Eine Besonderheit bei der Betrachtung des Prostatakarzinoms stellt die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) dar. Unter der PIN versteht man die dysplastische Veränderung des sekretorischen Epithels in der Prostata mit zugunsten des Kerns verschobener Kern-Plasma-Relation und erhaltener Basalzellschicht. Man unterscheidet zwischen einer low-grade und einer high-grade PIN, wobei die high-grade PIN als Vorläufer des klinisch relevanten Prostatakarzinoms angesehen wird [Bostwick and Brawer 1987; Bostwick and Montironi 1995]. Häufigste Lokalisation der PIN ist ebenfalls die periphere Zone.

Die Therapie des Prostatakarzinoms richtet sich nach der Tumorausbreitung und der histologischen Klassifizierung. Bei lokal begrenztem Karzinom, das die Organgrenzen nicht überschritten hat, ist die radikale Prostatektomie mit Entfernung der Samenblasen, einem Teil des Harnblasenhalses und der regionären Lymphknoten Methode der Wahl [Kumar et al. 2004]. Dabei spielt die Begutachtung des chirurgischen Resektionsrandes zur Feststellung

von möglichen Residualtumoren (R0: kein Residualtumor; R1: Residualtumor) eine wichtige Rolle für den weiteren Verlauf der Erkrankung.

Eine weitere Option zur Behandlung des lokal begrenzten Prostatakarzinoms stellt die Strahlentherapie dar, mit der z.T. ähnlich gute therapeutische Erfolge erzielt wurden.

Das besondere Problem beim Prostatakarzinom besteht darin, die Karzinome, die voraussichtlich klinisch relevant werden, in einem noch kurativen Stadium zu erkennen und von solchen zu trennen, die inapparent und für den Patienten bedeutungslos bleiben. Derartige Tumore werden als insignifikante Karzinome bezeichnet, lassen sich aber zur Zeit noch nicht zuverlässig an Stanzbiopsien diagnostizieren.

Bei metastasiertem Prostatakarzinom findet die palliative Hormontherapie wegen des androgenabhängigen Tumorwachstums Anwendung. Die Androgendeprivation kann durch Orchiektomie, Applikation von LHRH-Analoga oder Antiandrogenen erfolgen. Spricht der Tumor nicht auf die Therapie an oder kommt es zu einem Progress der Erkrankung, kann eine Umstellung der Androgendeprivation oder das Absetzen der Hormone versucht werden. Wichtig ist in diesem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung die suffiziente Schmerzbehandlung des Patienten. Bei Skelettmetastasen kommt v.a. die palliative Strahlentherapie zum Einsatz.

### **1.3 Prognosekriterien des Prostatakarzinoms**

Bekannte Prognosefaktoren für das Prostatakarzinom wurden bei der Konsensuskonferenz des American College of Pathology nach ihrer Wichtigkeit in 3 Kategorien eingeteilt [Bostwick et al. 2000]: Erwiesenermaßen prognostisch wichtige und im klinischen Alltag brauchbare Parameter, wie der präoperative PSA-Wert, das Staging nach der TNM-Klassifizierung, das Grading anhand des Gleason Scores und der Status des chirurgische Resektionsrandes wurden der Kategorie 1 zugeordnet. Insbesondere der Gleason Score korreliert dabei als unabhängiger Prognostikator eng mit der tumorspezifischen Überlebenszeit, was v.a. durch Studien an Patienten mit unbehandeltem Prostatakarzinom zu belegen ist [Hanash et al. 1972; Johansson et al. 1992].

Kategorie 2 beinhaltet Faktoren, die sowohl klinisch als auch biologisch gut untersucht sind, deren Bedeutung in statistischen Studien aber noch belegt werden muss. Dazu zählen das Tumolvolumen, der histologische Typ und die DNA-Ploidie. Das Tumolvolumen ist sowohl für die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung und des infiltrativen Wachstums als auch für das Ansprechen einer Therapie von Bedeutung [McNeal et al. 1986; Norton and Simon 1977].

Alle anderen Faktoren, deren prognostische Gültigkeit noch nicht ausreichend bewiesen ist, gehören in die Kategorie 3. Hierbei sind v.a. Perineuralscheideninvasion, Mikrogefäßdichte, nukleärer Rundheitsfaktor, Proliferationsmarker, Onkogene, Tumorsuppressorgene und Apoptoseindex zu nennen. Die molekularen Marker stehen in der Rangfolge bisher also ganz unten. Das könnte sich in den nächsten Jahren jedoch ändern.

### **1.4 Molekularbiologie des Prostatakarzinoms**

Das Prostatakarzinom zeichnet sich v.a. durch Heterogenität und multifokales Wachstum aus. Man findet entartete Drüsen in unmittelbarer Nachbarschaft zu normalem sekretorischen Epithel und die einzelnen Tumorherde in der Prostata können unterschiedliche Wachstumsmuster aufweisen. Damit liegt die Vermutung nahe, dass in verschiedenen Tumorbereichen unterschiedliche genetische Veränderungen vorhanden sind.

Molekulare Untersuchungen haben verschiedene chromosomale Veränderungen in Prostatakarzinomen nachgewiesen. Dabei sind Translokationen, Deletionen, Inversionen und chromosomale Zugewinne der Chromosome 6, 7, 8, 10, 13, 16, 17 sowie Verluste des Y Chromosoms beschrieben.

Die einzelnen chromosomalen Veränderungen treten jedoch mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit auf. Beispielsweise sind Verluste und Zugewinne genetischer Informationen auf Chromosom 8 häufig. Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 8 treten in bis zu 80% der Prostatakarzinome auf. Es wird vermutet, dass sich in dieser Region ein Tumorsuppressorgen befindet, dessen Verlust ein bedeutendes Ereignis in der Tumorentwicklung darstellt [Suzuki et al. 1995].

Tumorsuppressorgene regulieren durch Kontrolle des Zellzyklus Wachstum und Lebensdauer einer Zelle. Zu den wichtigsten Tumorsuppressorgenen gehört p53, dem in mehreren Studien eine Korrelation mit dem Tumorstadium, dem Malignitätsgrad und einer schlechten Prognose nachgewiesen werden konnte [Byrne et al. 1997; Heidenberg et al. 1995]. Andere Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen [McDonnell et al. 1997].

Ein Zugewinn von genetischem Material auf dem langen Arm von Chromosom 8 wurde für das Prostatakarzinom nachgewiesen. Spekuliert wird in diesem Zusammenhang, dass es sich dabei um ein Onkogen handelt [Cher et al. 1995]. Zu den von Onkogenen kodierten Proteinen gehören z.B. Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktoren, Proteinkinasen und Wachstumsfaktorrezeptoren. Kommt es zu einer Aktivierung oder Überexpression dieser Proteine, ist häufig eine unkontrollierte Proliferation die Folge. In diesem Zusammenhang ist als Beispiel für ein Proto-Onkogen, die in dieser Studie untersuchte GTPase Rac zu nennen. So konnte gezeigt werden, dass konstitutiv aktives V12-Rac onkogen transformierend wirkt und dass Wild-Typ-Rac für die Ras-induzierte Transformation von Zellen benötigt wird [Ridley et al. 1992; Westwick et al. 1997].

Einfluss auf den Prozess der Metastasierung des Prostatakarzinoms haben so genannte Metastasensuppressorgene, zu denen beispielsweise E-Cadherin und KAI-1 zählen. Ihre verminderte Expression war in mehreren Untersuchungen mit einer erhöhten Metastasierung assoziiert [Dong et al. 1995; Miyake et al. 1998]. Da es sich um Adhäsionsmoleküle handelt, führt ihr Funktionsverlust vermutlich zu einer erleichterten Lösung von Tumorzellen aus dem Zellverband. Eine verminderte Expression von E-Cadherin wird beim Prostatakarzinom in der Frühphase der Metastasierung beschrieben [Umbas et al. 1994].

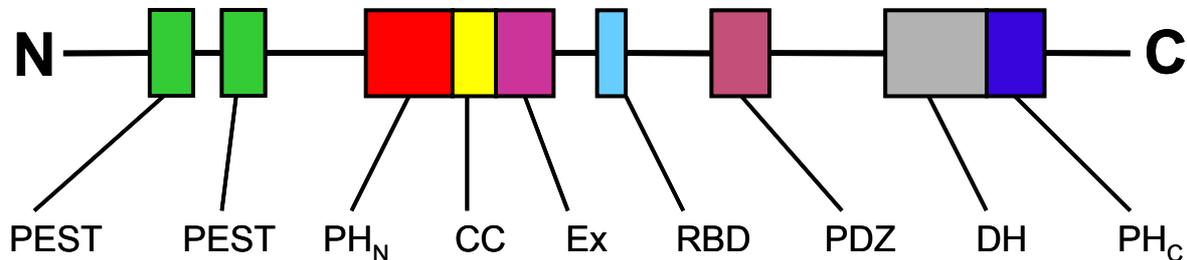
## 1.5 Der Tiam1/ Rac Signalweg

Die Progression von Tumoren und deren Metastasierung erfordert von Tumorzellen die Fähigkeit zur Migration und Invasion [Engers and Gabbert 2000]. Diese Fähigkeit wird zum Teil über den Tiam1/ Rac Signalweg vermittelt [Engers et al. 2001; Habets et al. 1994; Hordijk et al. 1997; Keely et al. 1997; Michiels et al. 1995; Sander et al. 1998].

Im Jahr 1995 konnte das Tiam1 Protein (T-Lymphoma invasion and metastasis) als spezifischer GDS für die Rho-ähnliche GTPase Rac identifiziert werden [Michiels et al. 1995]. Lokalisiert ist das für Tiam1 kodierende Gen auf Chromosom 21 in Position 21q22 [Chen and Antonarakis 1995]. Das Tiam1 Protein besteht aus 1591 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 177 kDa. Exprimiert wird Tiam1 in fast allen menschlichen Geweben, besonders hoch jedoch im Zentralnervensystem und im Hoden. Dabei ist es v.a. im Zytoplasma, teilweise aber auch in der Zellmembran lokalisiert.

Die Aufschlüsselung der Struktur von Tiam1 erbrachte die Identifizierung von mindestens neun verschiedenen Domänen (Abbildung 1), die unterschiedliche Funktionen erfüllen. N-terminal befinden sich zwei PEST-Domänen, die vermutlich Einfluss auf die Stabilität des Moleküls haben. Daneben befindet sich eine N-terminale PH<sub>N</sub>-Domäne (Pleckstrin Homology Domain), eine CC-Domäne (Coiled-Coil Domain) mit zusätzlicher benachbarter Ex-Domäne (Extended Domain), die zusammen sowohl die Interaktion mit Zell-Zell Adhäsionsproteinen, wie CD44, Ankyrin und Spinophilin vermitteln, als auch für die Translokation von Tiam1 aus dem Zytoplasma an die Zellmembran benötigt werden [Buchsbaum et al. 2002; Buchsbaum et al. 2003; Stam et al. 1997]. Weiter findet man eine RBD-Domäne (Ras-Binding Domain), die als Bindungsstelle für das Ras-Onkogen dient [Lambert et al. 2002]. Daneben folgt eine PDZ-Domäne (PSD-95/DlgA/ZO-1 Domain), der bisher keine spezifische Funktion im Tiam1 Protein zugeordnet werden konnte. C-terminal ist eine DH-Domäne (Dbl-Homology Domain) lokalisiert, die als Rac-Bindungsstelle das eigentliche katalytische Zentrum für den Guaninnukleotid-Austausch darstellt [Hoffman and Cerione 2002]. Daneben befindet sich in

direkter Nachbarschaft die C-terminale PH<sub>C</sub>-Domäne (Pleckstrin Homology Domain), die vermutlich eine regulatorische Funktion auf die DH-Domäne ausübt [Crompton et al. 2000].



**Abbildung 1:** Domänenstruktur von Tiam1:

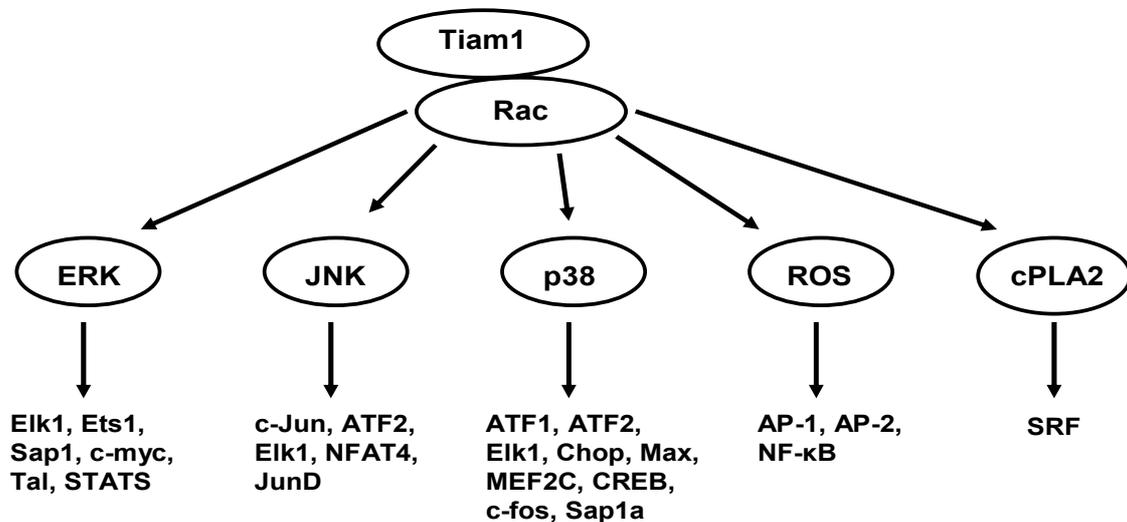
PEST: PEST-Domäne, PH<sub>N</sub>: N-terminale "Pleckstrin Homology"-Domäne, CC: "Coiled Coil"-Region, Ex: "Extended"-Domäne, RBD: "Ras-Binding"-Domäne, PDZ: PSD-95/DlgA/ZO-1-Domäne, DH: "Dbl-Homology"-Domäne, PH<sub>C</sub>: C-terminale "Pleckstrin Homology"-Domäne

Rac gehört zur Familie der Rho-ähnlichen GTPasen, die in einem komplexen Zusammenspiel verschiedenste zelluläre Prozesse reguliert. Die Rho-ähnlichen GTPasen liegen entweder in einem GDP-gebundenem inaktiven Zustand oder in einem GTP-gebundenen aktivierten Zustand vor, wobei der Nukleotidaustausch mit einer Konformationsänderung des Moleküls einhergeht. Reguliert wird der Guaninnukleotid-Austausch durch GDP-Dissoziationsstimulatoren (GDS) und GTPase-Aktivierende Proteine (GAPs), die antagonistische Effekte besitzen: GDS katalysieren die GDP-Abspaltung, so dass GTP binden kann, während die GAPs die GTP-Abspaltung stimulieren.

Von der GTPase Rac sind 3 Isoformen bekannt, die in unterschiedlichem Maße in den verschiedenen Gewebszellen der Organe vorkommen [Wennerberg and Der 2004]: Während Rac1 ubiquitär im Körper vorkommt, ist Rac2 nur in Zellen des hämatopoetischen Systems nachzuweisen. Das zuletzt identifizierte Rac3 ist im Hirngewebe stark exprimiert, kommt aber auch in der Plazenta, Niere, Pankreas und im Herzen vor [Haataja et al. 1997].

Die Stimulation von Rac durch Tiam1 führt zur Aktivierung mehrerer intrazellulärer Signalkaskaden, darunter der p38 Mitogen-Aktiviert Protein Kinase-Signalweg (MAPK), der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase (JNK)-Signalweg und der extracellulär signal-reguliert Kinase-Signalweg (ERK) (Abbildung 2) [Coso et al. 1995; Frost et al. 1996; Zhang et al. 1995].

Diesen Signalwegen ist gemeinsam, dass sie als Transkriptionsregulatoren für Gene dienen, die u. a. den Zell-Zyklus und die Zell-Zell Adhäsion beeinflussen.



**Abbildung 2:** Übersicht über die Signalwege, die durch Tiam1 und Rac aktiviert werden können.

In Zellen verschiedener Tumore konnte dem Tiam1/ Rac Signalweg eine wichtige Bedeutung bei der Migration, Invasion und Metastasierung nachgewiesen werden [Engers et al. 2001; Hordijk et al. 1997; Keely et al. 1997; Michiels et al. 1995; Sander et al. 1998]. Beispielsweise führte in NIH3T3 Zellen die Aktivierung von Rac1 durch konstitutiv aktives C1199-Tiam1 zu einer onkogenen Transformation und der Ausbildung des „Membrane Ruffling“ (Fältelung der Zellmembran) [Van Leeuwen et al. 1995]. In murinen T-Lymphomzelllinien führte die Aktivierung von Rac1 durch Tiam1 zur Entstehung eines invasiven Phänotyps [Michiels et al. 1995].

Rac1 reguliert u.a. das Aktin-Zytoskelett, wodurch der Zell-Zyklus, die Zell-Zell Adhäsion, Migration, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen beeinflusst wird [Ridley et al. 1992]. Darüber hinaus scheint Rac1 eine wichtige Rolle bei der onkogenen Transformation von Zellen zu spielen: Dies zeigt sich u.a. darin, dass die Expression von Rac1 für die Ras- und Src-vermittelte Transformation von NIH3T3 Zellen notwendig ist [Qiu et al. 1995; Servitja et al. 2003]. Auch erwiesen sich im Tiermodell Knock-Out Mäuse für den Rac-Aktivator Tiam1

als resistent gegenüber Ras-induzierten Hauttumoren [Malliri et al. 2002]. Bei der BCR/ ABL-vermittelten Leukämieentstehung konnte Rac1 ebenfalls eine bedeutende Rolle zugeschrieben werden [Skorski et al. 1998].

Rac2 dagegen wird nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert [Didsbury et al. 1989]. In Untersuchungen im Tiermodell wiesen Mäuse mit genetischen Defekten im Rac2-Gen zahlreiche Störungen in der Hämatopoese auf [Carstanjen et al. 2005; Croker et al. 2002a; Croker et al. 2002b; Gu et al. 2002; Gu et al. 2003]. Eine Rac3 Expression in der Prostata und auch im Prostatakarzinom ist bisher nicht beschrieben. Rac3 Knock-out Mäuse zeigen, im Gegensatz zu Rac1 Knock-out Mäusen, die die Embryogenese nicht überleben, keine offensichtlichen Fehlbildungen und sind uneingeschränkt lebensfähig [Corbetta et al. 2005; Sugihara et al. 1998]. Im Mammakarzinom zeigt Rac3 eine Überaktivität und spielt in Ganglioblastom- und Mammakarzinomzellen - ähnlich wie Rac1 - eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellmigration und Invasion [Chan et al. 2005; Mira et al. 2000]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Rac3-Aktivierung ebenfalls zu einer onkogenen Transformation von NIH3T3 Zellen führen kann [Joyce and Cox 2003].

Regulatorisch auf Tiam1 wirkt die Bindung von Lipiden: So führt die Bindung von Ascorbyl Stearat, Phosphatidylinositol-4-Phosphat, Ascorbyl Palmitat, Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat (PIP<sub>2</sub>) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat (PIP<sub>3</sub>) zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität von Tiam1 [Fleming et al. 2000; Crompton et al. 2000]. Ein weiterer, die Aktivität von Tiam1 beeinflussender Faktor, ist das Metastasensuppressorgen nm23H1 [Steeg et al. 1988]. Die Bindung von nm23H1 an die N-terminalen 392 Aminosäuren von Tiam1 vermindert die Aktivierung von Rac und damit die Aktivierung des JNK Signalweges. Sichtbar wird dieser Einfluss in einem verminderten Membrane Ruffling im Zellkulturmodell [Otsuki et al. 2001]. Darüber hinaus konnte für das Kolonkarzinom nachgewiesen werden, dass der Tiam1/ Rac Signalweg durch den Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg stimuliert werden kann [Malliri et al. 2006]. Aktiviert werden kann der Tiam1/ Rac Signalweg auch durch die Bindung des Onkogens Ras an der RBD-Domäne von Tiam1 [Lambert et al. 2002].

## 1.6 Fragestellung

Bisherige Untersuchungen konnten nachweisen, dass der Tiam1/ Rac Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Invasion und Metastasierung maligner Tumore spielt und darüber hinaus auch eine onkogene Potenz besitzt. Trotz dieser biologischen Funktionen von Tiam1 und Rac wurden bislang aber noch keine Untersuchungen zur prognostischen Relevanz von Tiam1 und Rac an humanen Tumoren durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sollten daher am Beispiel des Prostatakarzinoms folgende Fragen untersucht werden:

1. Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Expression von Tiam1 bzw. Rac zwischen Prostatakarzinom, prostatischer intraepithelialer Neoplasie (PIN) und normalem Drüsengewebe der Prostata?
2. Korreliert die Höhe der Expression von Tiam1 und Rac mit wichtigen klinischen oder pathologischen Parametern?
3. Welche Bedeutung besitzen Tiam1 und/oder Rac für die prognostische Beurteilung von Prostatakarzinom-Patienten?

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein Kollektiv von 60 Prostatakarzinom-Patienten mit jeweils R0-resezierten radikalen Prostatektomiepräparaten zusammengestellt. Alle Patienten wurden zwischen 1990 und 2001 in der Urologischen Klinik der Universität Düsseldorf operiert. Das Patientenalter bei Operation betrug zwischen 55 und 79 Jahren (Median: 67 Jahre). Ausgeschlossen von der Studie wurden Patienten, die vor der Operation eine neoadjuvante Chemotherapie erhielten, deren chirurgische Resektionsränder positiv waren (R1 reseziert) und deren PSA-Wert nach Operation über 0,3 ng/ml betrug. Follow-up Daten lagen für 53 der 60 Patienten vor. Die mediane Follow-up Zeit betrug 7,2 Jahre (2-14,4 Jahre).

#### **2.1.1 Histologische Untersuchung**

Die Geweberesektate der 60 Patienten wurden in 4% gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Zur histologischen Beurteilung wurden 4µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbt. Alle Präparate wurden gemeinsam mit Herrn PD Dr. Engers (Institut für Pathologie) hinsichtlich der TNM-Klassifikation, des Gleason Scores, einer Blutgefäßinvasion (BVI), einer Lymphgefäßinvasion (LVI), einer Perineuralscheideninvasion (PNSI) und hinsichtlich des Vorkommens einer high-grade prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (HG-PIN) beurteilt.

### **2.2 Immunhistochemie**

Von jedem Tumor wurden repräsentative Paraffinblöcke für die immunhistochemische Untersuchung ausgewählt und zwar so, dass jedes Gleason Pattern eines Tumors in die Untersuchung einbezogen wurde. Von diesen Paraffinblöcken wurden je zwei 4µm dicke Schnitte angefertigt, auf Histobond Adhäsions-Objektträger aufgezogen und im Brutschrank bei 100°C für 10 min. zur Vermeidung von Luftblasen inkubiert. Danach wurden die Schnitte

bei 60°C für 12 Std. zur besseren Haftung des Gewebes am Objektträger im Brutschrank belassen.

Die Färbung mittels Avidin-Biotin Methode (LAB) wurde unter standardisierten Automatenbedingungen in einem Ventana Benchmark Färbemodul (Ventana Medical Systems, München) mit dem vom Hersteller vorgefertigten Ventana Basic DAB Detection Kit durchgeführt. Dieses beinhaltet einen Inhibitor zur Blockierung der endogenen Peroxidase, den biotinylierten Zweitantikörper, enzymmarkiertes Avidin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Diaminobenzidin (DAB) und Kupfer zur Verstärkung des DAB.

In dem geschlossenen Automaten-System wurden die Schnitte entparaffiniert, es folgte die hitzeinduzierte Epitopfreilegung, der im Gewebe exprimierten Antigene und die Blockierung der endogenen Peroxidase. Pro Schnitt wurde 100µl des Erstantikörpers Tiam1 für 32 min. in einer Verdünnung 1:150 aufgegeben. Die Reaktion wurde durch die anschließende Auftragung von Amplifer A und Amplifer B verstärkt. Der Rac-Antikörper wurde in der gleichen Menge ebenfalls für 32 min. in einer Verdünnung 1:250 auf die Objektträger aufgetragen. Auf die Verstärkung mittels Amplifer wurde bei der Rac Färbung verzichtet. Der biotinylierte Zweitantikörper, das enzymmarkierte Avidin und das DAB inkubierten jeweils 8 min. Die Reaktion des DAB wurde durch das Auftropfen von Kupfer verstärkt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hematoxylin und die Nach-Gegenfärbung mit „Bluing Reagent“. Manuell wurden die Schnitte anschließend unter Leitungswasser gespült, durch die aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, in Xylol inkubiert und eingedeckt. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Färbedurchgang ein repräsentativer Schnitt mitgeführt, der bis auf die Primärantikörperinkubation dieselbe Prozedur durchlief.

### **2.2.1 Das Ventana Benchmark Gerät**

Die Anfärbung wurde unter standardisierten Bedingungen auf dem Ventana Benchmark Gerät durchgeführt, das aus vier Hauptkomponenten aufgebaut ist: Dem Computer als Steuerungseinheit, dem Färbemodul mit Objektträger- und Reagenzkarussell, dem Kompressormodul zum Druckaufbau in den Flüssigkeitsschläuchen und dem Abfallmodul als

Sammeleinheit für die verwendeten Flüssigkeiten. Nach Eingabe des Färbeprotokolls in den Computer wurde das Objektträgerkarussell mit 20 Objektträgern pro Färbedurchgang bestückt, das Reagenzkarussell mit den o.g. Reagenzien befüllt und der Färbevorgang gestartet. Die einzelnen Schritte des Protokolls wurden vollautomatisch von dem Benchmark Gerät ausgeführt. Die Erhitzung der Objektträger in dem Färbemodul verkürzte die Einwirkzeit der einzelnen Reagenzien, sodass ein Färbedurchgang zwei Stunden dauerte.

### **2.2.2 Der Tiam1 Antikörper**

Für die immunhistochemischen Anfärbungen des Tiam1 Antigens wurde ein Antikörper verwendet, der freundlicherweise von Dr. John G. Collard, Division of Cell Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, zur Verfügung gestellt wurde. Die Arbeitsgruppe von Dr. John G. Collard hat mit diesem Antikörper die Expression von Tiam1 mittels Western Blot und Immunhistochemie in Mäusen untersucht [Malliri et al. 2002]. Der polyklonale Antikörper wurde in Kaninchen generiert und ist gegen die DH-Domäne des Tiam1 Polypeptids (Aminosäure 904 bis 1511) gerichtet [Malliri et al. 2002]. Als optimal für die Anfärbung stellte sich eine Verdünnung von 1:150 in Antibody Diluent (Ventana) heraus. Als interne Positivkontrolle diente die Anfärbung von Lymphozyten.

### **2.2.3 Der Rac Antikörper**

Bei dem zur immunhistochemischen Detektion des Rac Antigens verwendeten Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper (Klon 102) der Firma BD Biosciences, der in Mäusen generiert wurde und alle 3 Rac Isoformen erkennt. Für die immunhistochemische Reaktion wurde eine Antikörperverdünnung von 1:250 in Antibody Diluent (Ventana) verwendet. Angefärbte Granulozyten dienten als interne Positivkontrolle.

### 2.3 Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbung

Die Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung der 60 Resektate erfolgte gemeinsam mit Herrn PD Dr. Engers (Institut für Pathologie) ohne Kenntnis der Tumorstadien und Überlebensdaten der Patienten. Die Quantifizierung von Tiam1 und Rac erfolgte nach der etablierten Quantifizierung von Hormonrezeptoren beim Mammakarzinom [Beck et al. 1994]. Dabei wurde zum einen der Prozentsatz immunhistochemisch angefärbter (positiver) Zellen bestimmt und auf eine Skala von 0 bis 4 übertragen (Tabelle 2a). Zum anderen wurde die Färbeintensität der positiven Zellen entsprechend einer Skala von 0 bis 3 eingeordnet (Tabelle 2b).

Tabelle 2a: Prozentsatz positiver Zellen

0	keine positiven Zellen
1	unter 10% positive Zellen
2	10-50% positive Zellen
3	51-80% positive Zellen
4	über 80% positive Zellen

Tabelle 2b: Färbeintensität

0	keine Färbereaktion
1	schwache Färbereaktion
2	mäßige Färbereaktion
3	starke Färbereaktion

Der immunreaktive Score (IRS) ergibt sich dann aus der Multiplikation beider Skalenwerte und reicht somit von 0 bis 12. Für jedes Prostatektomiepräparat wurde der immunreaktive Score des Karzinoms, der HG-PIN Läsion und des benignen sekretorischen Epithels sowohl für Tiam1 als auch für Rac ermittelt. Um auszuschließen, dass unbekannte Unterschiede in der Gewebefixierung möglicherweise die Bestimmung des absoluten Expressionslevels von Tiam1 und Rac beeinflussen, wurden für die statistische Analyse der Daten anstatt der absoluten Expressionslevel von Tiam1 und Rac die Quotienten der jeweiligen Expressionslevel in Tumor und dem korrespondierenden Normalgewebe verwendet.

## 2.4 Reagenzien und Geräte

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenzien und Geräte sind in Tabelle 3 und 4 zusammengestellt.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Reagenzien

<b>Ventana Bezeichnung</b>	<b>Katalog Nr.</b>
EZ Prep Concentrate	950-102
LCS Coverslip	650-010
Cell Conditioning Solution CC1	950-124
Antibody Diluent	251-018
Basic DAB Detection Kit	760-001
Amplifer A, B	760-080
Hematoxylin	760-2021
Bluing Reagent	760-2037

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Mikrotom Typ HM 400	Microm
Brutschrank 100°C	Heraeus
Brutschrank 60°C	Kottermann
Ventana Benchmark Gerät	Ventana Medical Systems, München
Eindeckmaschine	Vogel

### 2.4.1 Statistische Analyse

Für den Vergleich sowohl der Tiam1, als auch der Rac-Expressionen in Normalgewebe, high-grade PIN Läsionen und Tumorgewebe wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Der Fisher`s Exakt Test wurde für die Korrelationsuntersuchung sowohl der Tiam1, als auch der Rac-Expression mit den klinisch-pathologischen Parametern verwendet. Als rezidivfreies Intervall wurde der Zeitraum zwischen radikaler Prostatektomie und dem Nachweis eines

Rezidives definiert. Die Patienten, die bis zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung rezidivfrei waren oder ohne Tumorrezidiv verstarben, wurden für die statistische Analyse zensiert. Die Darstellung des rezidivfreien Überlebens erfolgte in Form von Kaplan-Meier-Kurven. Für die univariate Analyse wurde der Log-Rank-Test verwendet. Die multivariate Analyse erfolgte unter Verwendung eines „Cox Proportional Hazards“-Modells. Als Signifikanzniveau wurde jeweils eine 2-seitige Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen. Sämtliche statistische Analysen erfolgten mit SPSS Statistical Software Version 12.0 (SPSS GmbH, München, Deutschland).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Patientenkollektiv, klinische und pathologische Daten

Die klinische Nachbeobachtung der 53 von 60 Patienten erfolgte über einen Zeitraum von 2-14,4 Jahre (Median 7,2 Jahre) durch ärztliche Mitarbeiter der Urologischen Klinik der Universität Düsseldorf. Als Rezidivkriterien wurden ein PSA-Anstieg auf über 0,3 ng/ml bzw. ein radiologisch oder histologisch gesichertes Lokalrezidiv im kleinen Becken festgelegt. Eine nach gleichen Kriterien festgestellte Raumforderung in anderen Organen oder Lymphknotenmetastasen oberhalb der Bifurkation der A. iliaca communis wurde analog der TNM-Klassifikation als Fernmetastase definiert. Unter Berücksichtigung dieser Parameter entwickelten 17 Patienten (32,1%) ein Rezidiv, wobei lediglich ein Patient tumorbedingt am Prostatakarzinom verstarb. 7 Patienten verstarben an anderen Erkrankungen. Bei den übrigen 36 (67,9%) der 53 Patienten wurde bis zum letzten Follow-up-Termin kein Rezidiv festgestellt.

Der präoperative PSA-Wert reichte von 1,2 – 60,5 ng/ml (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung  $14,4 \pm 12$  ng/ml) und lag bei 37 Patienten (62,7%)  $<15$  ng/ml und bei 22 Patienten (37,3%)  $\geq 15$  ng/ml. Für einen Patienten war der präoperative PSA-Wert nicht eruierbar.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des HE-Schnittmaterials fanden sich unter den 60 Prostatakarzinomen 2 mit dem Gleason Score 5 (3,3%), 9 mit dem Gleason Score 6 (15%), 38 mit dem Gleason Score 7 (63,3%), 4 mit dem Gleason Score 8 (6,7%), 6 mit dem Gleason Score 9 (10%) und 1 Prostatakarzinom mit dem Gleason Score 10 (1,7%). In 55 der 60 Prostataresektate war eine HG-PIN erkennbar. Eine Blutgefäßinvasion (BVI) war in 2 Fällen (3,3%), eine Lymphgefäßinvasion (LVI) in 6 Fällen (10%) und eine Perineuralscheideninvasion (PNI) in 46 Fällen (76,7%) nachweisbar. Nach der TNM-Klassifikation waren 37 Prostatakarzinome (61,7%) organbegrenzt (pT2) und 23 (38,3%) wuchsen organüberschreitend (pT3). Hinsichtlich des Lymphknotenstatus lag in 59 Fällen (96,7%) ein pN0 Status vor, lediglich in einem Fall (1,7%) war eine Lymphknotenmetastase nachweisbar

(pN1). Zum Zeitpunkt der Operation waren bei keinem Patienten Fernmetastasen nachweisbar.

Um sowohl die prognostische Relevanz von Tiam1 und Rac, als auch die Bedeutung der bereits bekannten und etablierten Prognosefaktoren, wie dem pT Stadium, dem präoperativen PSA-Wert und dem Gleason Score im vorliegenden Kollektiv mit Hilfe der Kaplan-Meier-Analyse zu bestimmen, wurden alle Variablen in zwei Kategorien geteilt. So wurde das pT Stadium in die klinisch relevanten Gruppe der organbeschränkten Tumore (pT2) und die der organüberschreitenden Tumore (pT3) unterteilt. Der präoperative PSA-Wert wurde aufgrund der PSA-Werteverteilung in unserem Kollektiv (Mittelwert 14,4) in  $<15$  ng/ml und  $\geq 15$  ng/ml dichotomisiert. Der Gleason Score wurde in die klinisch relevanten Kategorien  $\leq 7$  (82%) und  $> 7$  (18%) eingeteilt.

In einer univariaten Analyse nach Kaplan-Meier zeigten alle bisher genannten etablierten Prognoseparameter im Prostatakarzinom, wie der präoperative PSA-Wert ( $p=0,0235$ ), das Tumorstadium ( $p=0,0021$ ) und der Gleason Score ( $p=0,0012$ ) einen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben, was die Repräsentativität des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektivs unterstreicht.

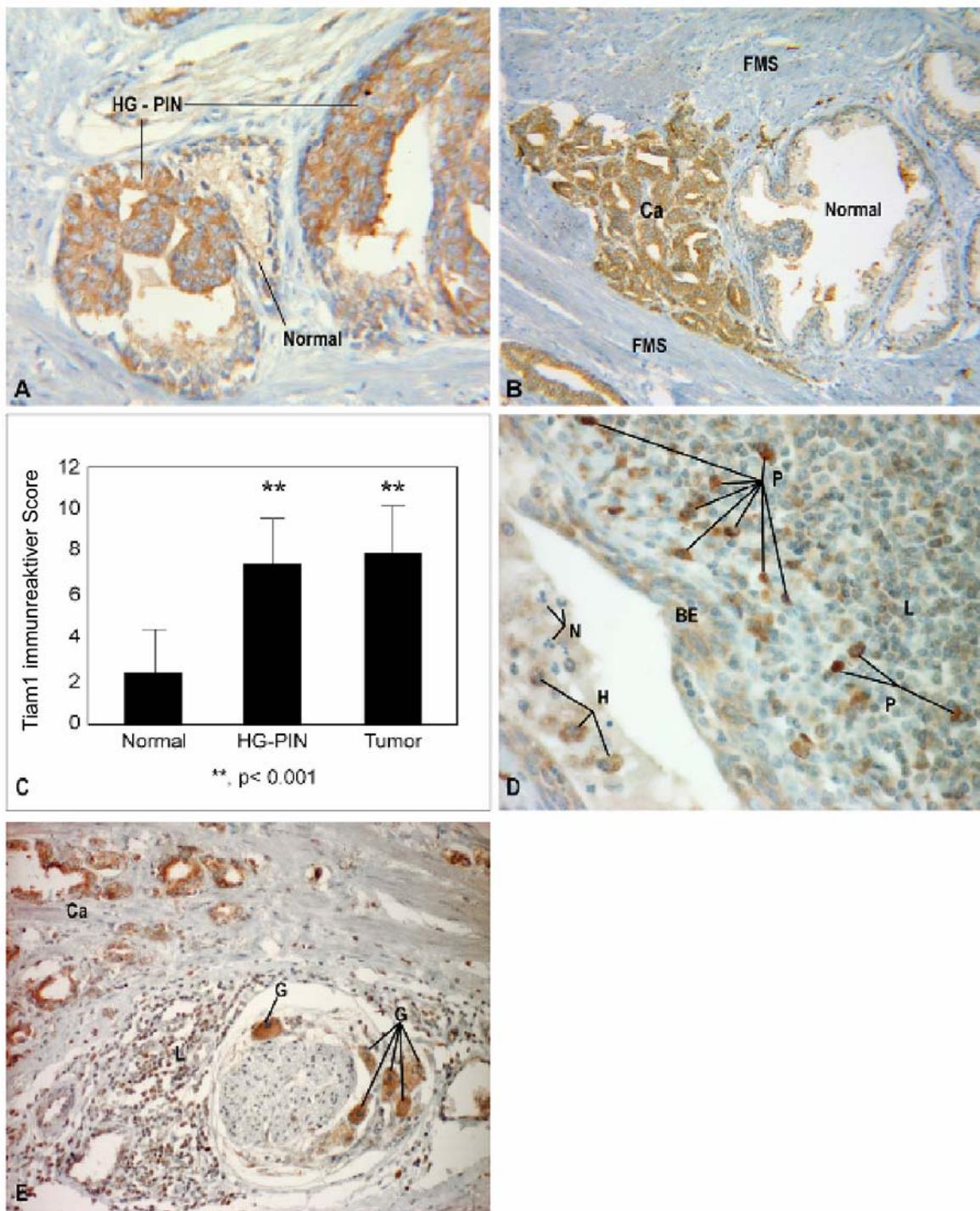
## **3.2 Tiam1-Expression**

### **3.2.1 Expressionsanalyse von Tiam1**

Um die immunhistochemische Färbintensität von Tiam1 im prostatistischen Normalgewebe, in der HG-PIN und im Tumor vergleichen zu können, wurde der jeweilige immunreaktive Score bestimmt. Verglichen mit dem umliegenden benignen sekretorischen Prostataepithel stellte sich dabei die Tiam1-Expression im Tumor in 58 (96,7%) von 60 Fällen ( $p<0,001$ ) und in der HG-PIN Läsion in 54 (98,2%) von 55 Fällen ( $p<0,001$ ) als signifikant stärker heraus (Abbildung 3A-C). Im Gegensatz hierzu fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Tiam1-Expression im Tumor und der HG-PIN.

Zusätzlich zu diesen signifikanten Unterschieden in der Tiam1-Expression zwischen malignen Tumoren bzw. praemalignen Veränderungen und dem normalen prostatichen Epithel, fanden sich auch deutliche Unterschiede in der Tiam1-Expression zwischen normalen nichtepithelialen Zellen wie inflammatorischen Zellen, fibromuskulären Stromazellen und Ganglienzellen. Für diese nichtepithelialen Zellen wurde zwar keine semi-quantitative Expressionsbestimmung durchgeführt, jedoch zeigte sich eine durchweg stärkere Tiam1-Expression in Plasmazellen als in Lymphozyten und Histiocyten (Abbildung 3D). Die neutrophilen Granulozyten hingegen erwiesen sich als negativ (Abbildung 3D). Eine starke Anfärbung konnte ebenfalls in Ganglienzellen nachgewiesen werden (Abbildung 3E), während sich fibromuskuläre Stromazellen nicht anfärbten.

Wie oben beschrieben, wurden die verschiedenen Variablen zur Beurteilung ihrer prognostischen Relevanz in der univariaten Kaplan-Meier Analyse und zur Beurteilung einer Assoziation mit anderen klinisch-pathologischen Parametern dichotomisiert. Für Tiam1 lagen die Expressionswerte im Tumor durchschnittlich um den Faktor 3,75 höher als im Normalgewebe (Abbildung 3C). Für die Beurteilung der prognostischen Relevanz wurde daher das Ausmaß der Tiam1-Überexpression in die beiden Kategorien „geringe Überexpression“ ( $< \text{Faktor } 3,5$ ) und „starke Überexpression“ ( $\geq \text{Faktor } 3,5$ ) unterteilt. Als sog. „Cut-off Level“ wurde der Faktor 3,5 und nicht der Faktor 3,75 gewählt, da 1) 3,5 im Hinblick auf eine potentielle Einführung in die Routine-Pathologie des Prostatakarzinoms einfacher zu handhaben ist als 3,75 und 2) nur ein Patient von dieser Modifikation betroffen war.



**Abbildung 3:** Tiam1-Expression im humanen Prostatakarzinom

**A)** immunhistochemischer Nachweis der Tiam1-Überexpression in der präneoplastischen HG-PIN Läsion im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe (250x Vergrößerung)

**B)** immunhistochemischer Nachweis der Tiam1-Überexpression im Prostatakarzinom (Ca) im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe (N). Negative Tiam1-Expression in fibromuskulärem Stroma (FMS) (100x Vergrößerung)

**C)** Vergleich der Tiam1-Expression in normalem sekretorischem Epithel (n=60), in der HG-PIN Läsion (n=55) und im Prostatakarzinom (n=60). Angaben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

**D)** Unterschiede der Tiam1-Expression in nichtepithelialen Zellen: P=Plasmazellen, H=Histiozyten, L=Lymphozyten, N=neutrophile Granulozyten, BE=basale Endothelzellen (400x Vergrößerung)

**E)** starke Tiam1-Expression in Ganglienzellen (100x Vergrößerung)

Bei der Suche nach einer Assoziation zwischen dem Ausmaß der Tiam1-Überexpression im Prostatakarzinom und wichtigen klinisch-pathologischen Parametern konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Tiam1-Überexpression signifikant mit dem Auftreten eines Rezidivs ( $p=0,016$ ) und einer Lymphgefäßinvasion ( $p=0,031$ ) korrelierte.

Im Gegensatz hierzu fand sich jedoch keine signifikante Korrelation mit dem Alter, dem präoperativen PSA-Wert, der Blutgefäßinvasion, der Perineuralscheideninvasion, dem Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus und dem Gleason Score (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Klinisch-pathologische Charakteristika der Tiam1-Überexpression<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Aufgrund von Rundungen ergaben sich nicht immer exakt 100%.

<sup>b</sup> Fisher's Exakt Test, zweiseitig

<sup>c</sup> Der präoperative PSA-Wert war von 59 der insgesamt 60 Patienten bekannt.

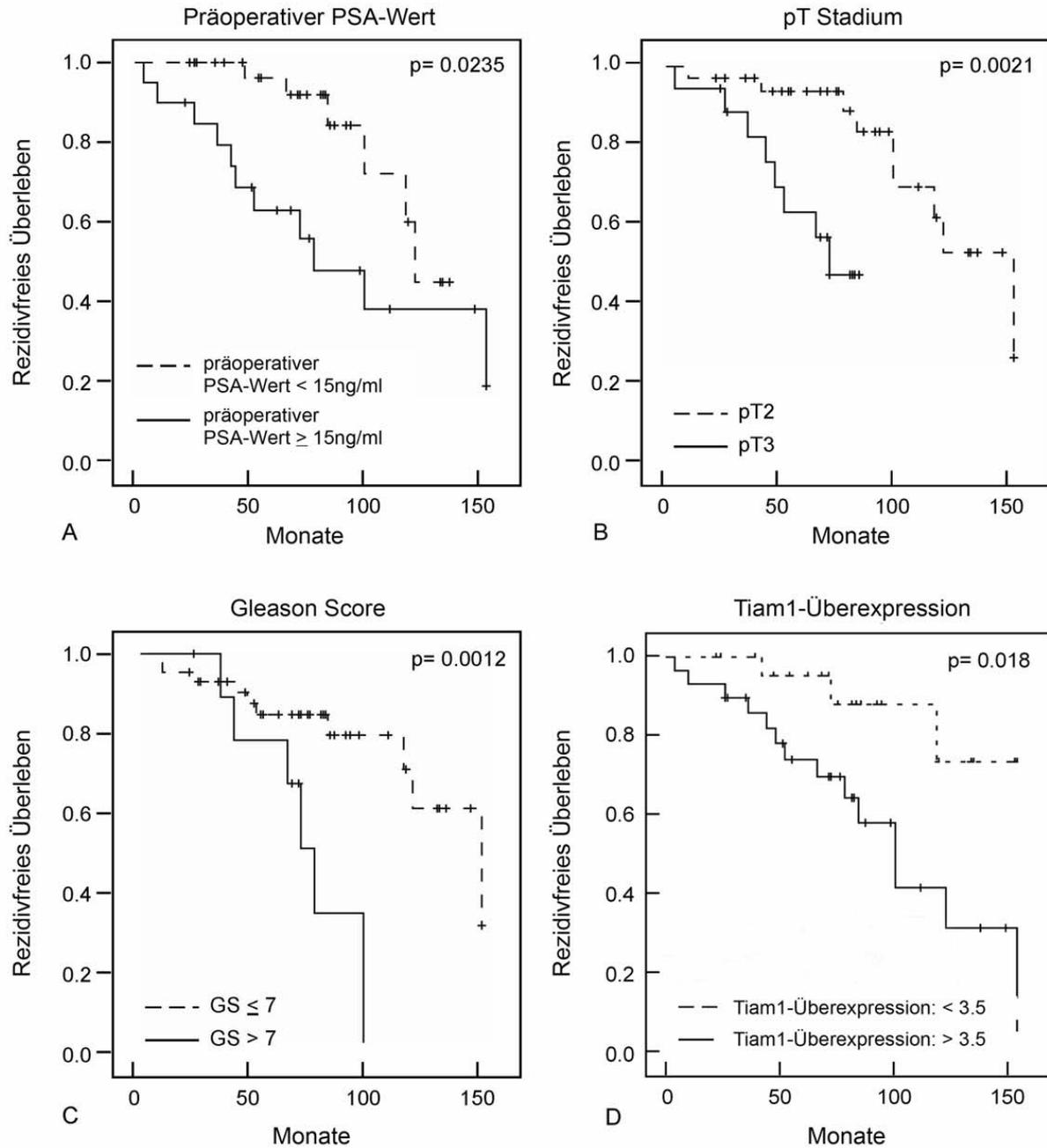
<sup>d</sup> Ein Follow-up lag nur von 53 der 60 Patienten vor.

Faktor	Tiam1 Überexpression		P-Wert <sup>b</sup>
	<3,5 (n=26) Anzahl (%)	≥3,5 (n=34) Anzahl (%)	
Alter in Jahren			
<65	13 (22)	13 (22)	0,435
≥65	13 (22)	21 (35)	
präoperativer PSA <sup>c</sup> in ng/ml			
<15	18 (31)	19 (32)	0,423
≥15	8 (14)	14 (24)	
Rezidiv <sup>d</sup>			
nein	20 (38)	16 (30)	<b>0,016</b>
ja	3 (6)	14 (26)	
LVI			
nein	26 (43)	28 (47)	<b>0,031</b>
ja	0 (0)	6 (10)	
BVI			
nein	25 (41)	33 (55)	1
ja	1 (2)	1 (2)	
PNI			
nein	6 (10)	8 (13)	1
ja	20 (33)	26 (43)	
pT			
pT2	18 (30)	19 (32)	0,422
pT3	8 (13)	15 (25)	
pN			
pN0	26 (43)	33 (55)	1
pN1	0 (0)	1 (2)	
Gleason Score			
2 bis 7	22 (37)	27 (45)	0,742
8 bis 10	4 (7)	7 (12)	

### 3.2.2 Univariate Analyse

In der univariaten Analyse fand sich jeweils eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Ausmaß der Tiam1-Überexpression ( $\geq 3,5$ -fach vs.  $< 3,5$ -fach;  $p=0,0181$ ), des präoperativen PSA-Spiegels ( $\geq 15$  ng/ml vs.  $< 15$  ng/ml;  $p=0,0235$ ), des Tumorstadiums (pT3 vs. pT2;  $p=0,0021$ ) sowie des Gleason Scores ( $> 7$  vs.  $\leq 7$ ;  $p=0,0012$ ) einerseits und einem verkürzten rezidivfreien Überleben der Patienten andererseits (Abbildung 4).

Dabei ergab die Kaplan-Meier-Analyse für Patienten mit starker Tiam1-Überexpression im Tumor eine mittlere Überlebenszeit von 98 Monaten (95% Konfidenz-Intervall [KI]=77-119). Im Gegensatz dazu lag die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit schwacher Tiam1-Überexpression bei 136 Monaten (95% KI=118-154).



**Abbildung 4:** Rezidivfreies Überleben von 53 Patienten in der Kaplan-Meier-Analyse und dem Log-Rank-Test

**A)** präoperativer PSA-Wert

**B)** pT Stadium

**C)** Gleason Score

**D)** Ausmaß der Tiam1-Überexpression im Prostatakarzinom im Vergleich zum korrespondierenden Epithel

### 3.2.3 Multivariate Analyse

Um zu untersuchen, welche der in der univariaten Analyse identifizierten Prognoseparameter tatsächlich unabhängig voneinander sind und sich somit in ihrer prognostischen Aussagekraft ergänzen, wurde eine multivariate Analyse nach dem „Cox Proportional Hazard“-Modell durchgeführt. Neben den bereits etablierten Prognoseparametern Tumorstadium (pT3 vs. pT2;  $p=0,003$ ), Gleason Score ( $>7$  vs.  $\leq 7$ ;  $p=0,035$ ) und präoperativer PSA-Wert ( $\geq 15$  ng/ml vs.  $< 15$  ng/ml;  $p=0,029$ ) erwies sich dabei auch das Ausmaß der Tiam1-Überexpression ( $\geq 3,5$ -fach vs.  $< 3,5$ -fach) als unabhängiger prognostischer Parameter (relatives Risiko [RR]=3,90, 95% Konfidenz-Intervall [KI]=1,09-14,01; 2-seitiger  $\chi^2$   $p=0,037$ ) (Tabelle 6), der das Auftreten von Rezidiven signifikant vorhersagte.

**Tabelle 6:** Multivariate Analyse der Tiam1-Überexpression mit dem Auftreten von Rezidiven bei Prostatakarzinom-Patienten nach der „Cox Proportional Hazard“-Methode.

Variable	P-Wert	RR (95% CI)
Tiam1 Überexpression ( $\geq 3,5$ vs $< 3,5$ )	0,037	3,90 (1,09-14,01)
pT (pT3 vs pT2)	0,003	8,93 (2,06-38,46)
Gleason Score (8-10 vs 2-7)	0,035	3,14 (1,08-9,10)
präoperativer PSA ( $\geq 15$ vs $< 15$ )	0,029	3,41 (1,13-10,27)

### 3.3 Rac-Expression

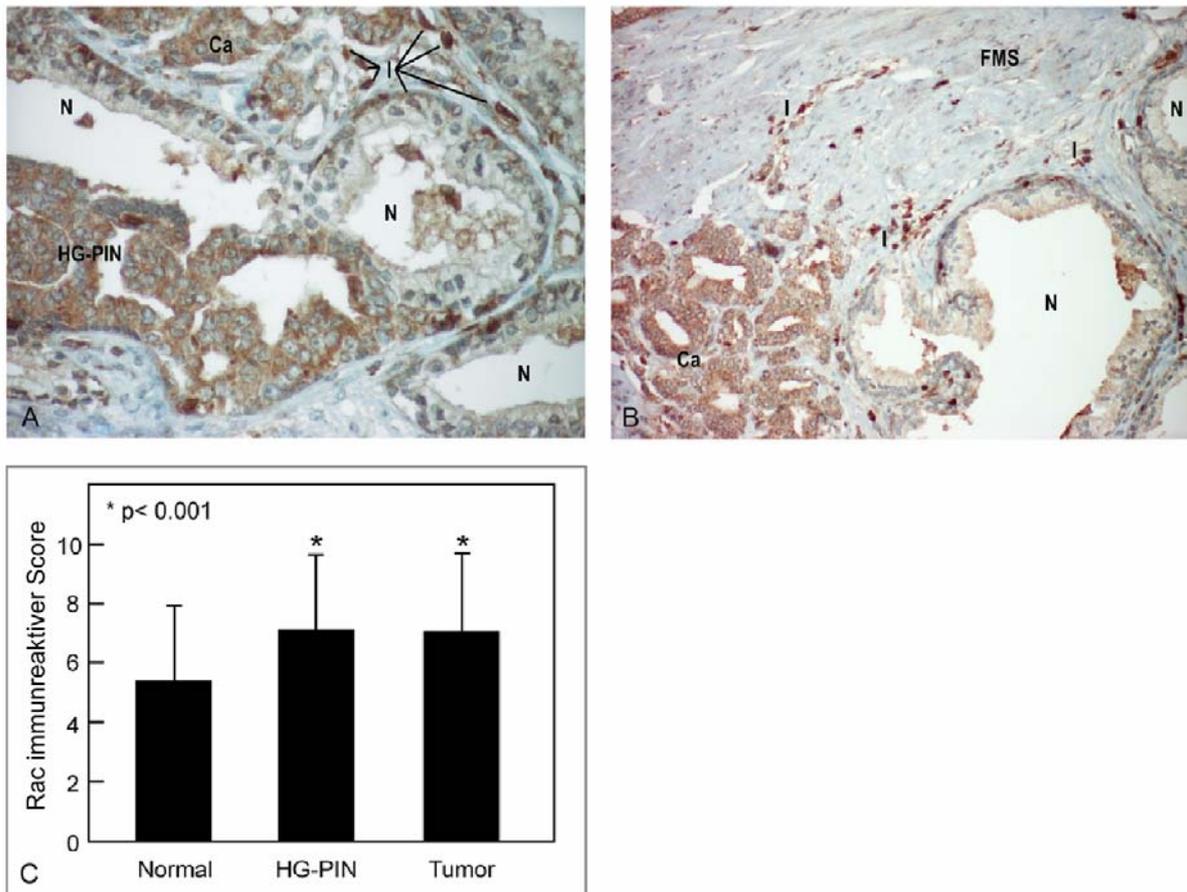
#### 3.3.1 Expressionsanalyse von Rac

Eine Rac Anfärbung zeigte sich in normalem sekretorischen Epithel, der HG-PIN Läsion, im Tumor und in inflammatorischen Zellen (Abbildung 5A, B). Fibromuskuläre Stromazellen färbten sich hingegen nicht an (Abbildung 5B). Interessanterweise war die Rac-Expression im normalen sekretorischen Epithel, der HG-PIN Läsion und in Entzündungszellen auf das Zytoplasma beschränkt. Im Tumorgewebe fand sich jedoch in 7 Fällen (11,7%) auch eine deutliche nukleäre Positivität, die zumindest in einem kleinen Teil der Tumorzellen nachweisbar war. Allerdings ist die Bedeutung dieser nukleären Rac-Expression unklar, da bislang kein Zusammenhang mit wichtigen klinisch-pathologischen Daten oder dem rezidivfreien Überleben erkennbar war.

Während sich in Plasmazellen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Histiozyten eine konstant starke Rac-Expression zeigte (Abbildung 5A, B), war die Rac-Expression im benignen sekretorischen Epithel, den HG-PIN Läsionen und den Tumoren hingegen deutlich variabel. So fand sich in der semiquantitativen Beurteilung der Rac-Expression eine signifikant stärkere Expression im Tumorgewebe als im normalen sekretorischen Epithel ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 5C). Dabei zeigten 30 der 60 Karzinome (50%) eine höhere, 27 Karzinome (45%) eine gleichwertige und 3 Karzinome (5%) eine niedrigere Rac-Expression als das korrespondierende normale sekretorische Epithel.

In den HG-PIN Läsionen konnte, verglichen mit normalem sekretorischen Epithel, ebenfalls eine signifikant erhöhte Rac-Expression beobachtet werden ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 5C). 27 der insgesamt 53 HG-PIN Läsionen (50,9%) wiesen im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe eine höhere, 22 HG-PIN Läsionen (41,5%) eine gleichstarke und 4 HG-PIN Läsionen eine geringere Rac-Expression auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Rac-Expression im Tumor und in der HG-PIN Läsion lag nicht vor. Um potentielle Assoziationen zwischen der Rac-Expression und verschiedenen klinisch-pathologisch

relevanten Faktoren untersuchen zu können, wurden die Tumoren in zwei Kategorien eingeteilt: 1) die Tumore, die eine höhere Rac-Expression aufwiesen als das korrespondierende Normalgewebe (d.h. Tumore mit einem IRS > 1) und 2) die Tumore, bei denen das nicht der Fall war (d.h. Tumore mit einem IRS ≤ 1).



**Abbildung 5:** Rac-Expression im humanen Prostatakarzinom

**A)** Immunhistochemischer Nachweis der Rac-Überexpression in der präneoplastischen HG-PIN Läsion und im Prostatakarzinom (Ca) jeweils im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe (N) (250x Vergrößerung)

**B)** Unterschiede der Rac-Expression im Prostatakarzinom, im Normalgewebe, in fibromuskulären Stromazellen (FMS) und in inflammatorischen Zellen (I) (100x Vergrößerung)

**C)** Vergleich der Rac-Expression in normalem sekretorisches Epithel (n=60), in der HG-PIN Läsion (n=55) und im Prostatakarzinom (n=60). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Somit zeigten 34 Tumore eine Überexpression von Rac (56,7%), während 26 Tumore keine Überexpression von Rac (43,3%) aufwiesen. Bei der statistischen Analyse zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Überexpression von Rac einerseits und dem Auftreten eines Rezidives ( $p=0,041$ ) bzw. dem Nachweis einer Perineuralscheideninvasion (PNI)

( $p=0,005$ ) andererseits. Im Gegensatz dazu fanden sich jedoch keine signifikanten Korrelationen zwischen der Überexpression von Rac und anderen klinisch-pathologischen Faktoren wie dem Alter, dem präoperativen PSA-Wert, der Blutgefäßinvasion (BVI), der Lymphgefäßinvasion (LVI), dem Tumorstadium, dem Lymphknotenstatus und dem Gleason Score (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Klinisch-pathologische Charakteristika der Rac-Überexpression<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Aufgrund von Rundungen ergaben sich nicht immer exakt 100%.

<sup>b</sup> Fisher's Exakt Test, zweiseitig

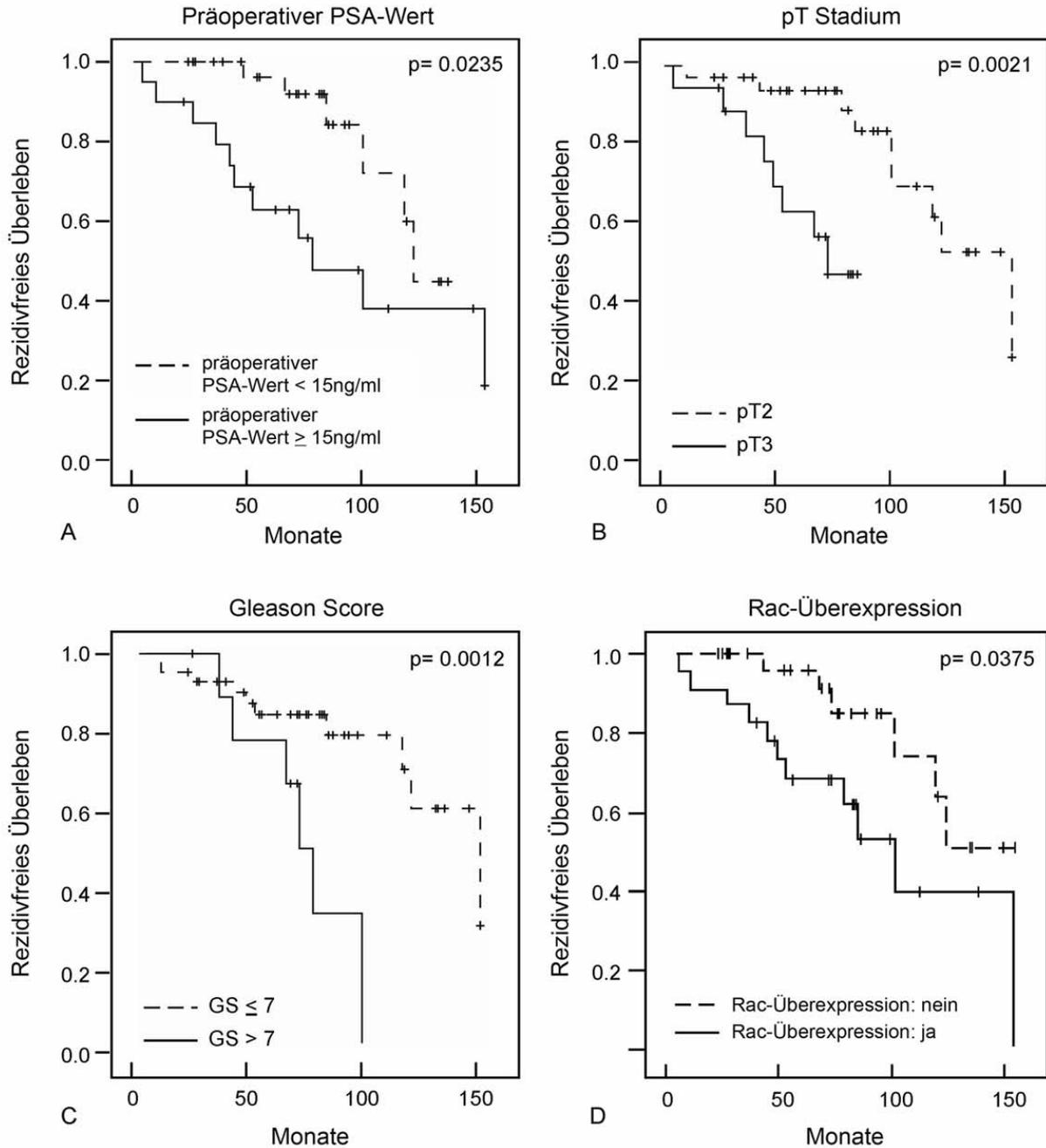
<sup>c</sup> Der präoperative PSA-Wert war von 59 der insgesamt 60 Patienten bekannt.

<sup>d</sup> Ein Follow-up lag nur von 53 der 60 Patienten vor.

Faktor	Rac Überexpression		P-Wert <sup>b</sup>
	nein (n=26) Anzahl (%)	ja (n=34) Anzahl (%)	
Alter in Jahren			
<65	12 (20)	14 (23)	0,603
≥65	19 (32)	15 (25)	
präoperativer PSA <sup>c</sup> in ng/ml			
<15	21 (36)	16 (27)	0,432
≥15	10 (17)	12 (20)	
Rezidiv <sup>d</sup>			
nein	24 (45)	12 (23)	<b>0,041</b>
ja	6 (11)	11 (21)	
LVI			
nein	28 (47)	26 (43)	1
ja	3 (5)	3 (5)	
BVI			
nein	29 (48)	29 (48)	0,492
ja	2 (3)	0 (0)	
PNI			
nein	12 (20)	2 (3)	<b>0,005</b>
ja	19 (32)	27 (45)	
pT			
pT2	22 (37)	15 (25)	0,184
pT3	9 (15)	14 (23)	
pN			
pN0	31 (52)	28 (47)	0,483
pN1	0 (0)	1 (2)	
Gleason Score			
2 bis 7	24 (40)	25 (42)	0,509
8 bis 10	7 (12)	4 (7)	

### **3.3.2 Univariate Analyse**

Die univariate Analyse zeigte jeweils eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Rac-Überexpression ( $>1$  vs.  $\leq 1$ ;  $p=0,0375$ ), dem präoperativen PSA-Spiegel ( $\geq 15$  ng/ml vs.  $< 15$  ng/ml;  $p=0,0235$ ), dem Tumorstadium (pT3 vs. pT2;  $p=0,0021$ ) und dem Gleason Score ( $>7$  vs.  $\leq 7$ ;  $p=0,0012$ ) einerseits, mit einem verminderten rezidivfreien Überleben der Patienten andererseits (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Rezidivfreies Überleben von 53 Patienten in der Kaplan-Meier-Analyse und dem Log-Rank-Test

**A)** präoperativer PSA-Wert

**B)** pT Stadium

**C)** Gleason Score

**D)** Ausmaß der Rac-Überexpression im Prostatakarzinom im Vergleich zum korrespondierenden Epithel

### 3.3.3 Multivariate Analyse

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von Rac im Prostatakarzinom tatsächlich ein unabhängiger Prognoseparameter ist, wurde eine multivariate Analyse nach dem „Cox Proportional Hazard“-Modell durchgeführt. Dabei erwies sich neben den etablierten Prognoseparametern Tumorstadium, präoperativer PSA-Wert und Gleason Score auch die Überexpression von Rac als unabhängiger Prognoseparameter, der mit einem früheren Auftreten von Rezidiven einhergeht (relatives Risiko [RR]=3,27, 95% Konfidenz-Intervall [CI]=1,09-9,83; 2-seitiger  $\chi^2$  p=0,035) (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Multivariate Analyse der Rac-Überexpression mit dem Auftreten von Rezidiven bei Prostatakarzinom-Patienten nach der „Cox Proportional Hazard“-Methode.

<b>Variable</b>	<b>P-Wert</b>	<b>RR (95% CI)</b>
Rac Überexpression (>1 vs. <1)	0,035	3,27 (1,09-9,83)
pT (pT3 vs pT2)	0,007	6,42 (1,66-24,76)
Gleason Score (8-10 vs 2-7)	0,009	4,71 (1,47-15,14)
präoperativer PSA ( $\geq 15$ vs $< 15$ )	0,026	3,38 (1,16-9,88)

## 4 DISKUSSION

Der Tiam1/ Rac Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der onkogenen Transformation von Zellen sowie bei der Regulation von Tumorinvasion und Metastasierung [Engers et al. 2001; Hordijk et al. 1997; Keely et al. 1997; Michiels et al. 1995; Sander et al. 1998]. Dennoch ist bislang völlig unklar, ob der Expression von Tiam1 und Rac auch eine prognostische Bedeutung in humanen Tumoren zukommt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher am Beispiel des Prostatakarzinoms erstmals die prognostische Relevanz der Expression von Tiam1 und Rac in humanem Tumorgewebe untersucht. Sowohl für Tiam1 als auch für Rac fand sich eine jeweils statistisch signifikant stärkere Proteinexpression im Tumorgewebe und der präkanzerösen HG-PIN Läsion als im normalen sekretorischen Epithel. Darüber hinaus ging die Überexpression von Rac bzw. eine starke Überexpression von Tiam1 ( $\geq 3,5$ -fach) in der univariaten Analyse mit einem signifikant verkürzten rezidivfreien Überleben der Patienten einher. Diese prognostische Relevanz hatte jeweils auch in einer multivariaten Analyse bestand, in der mehrere etablierte Prognoseparameter des Prostatakarzinoms eingeschlossen wurden. Somit erwiesen sich sowohl die Überexpression von Rac als auch eine starke Überexpression von Tiam1 im humanen Prostatakarzinom als neue unabhängige Prädiktoren eines postoperativen Tumorrezidivs.

Das Kollektiv der vorliegenden Studie ist beschränkt auf 60 Prostatakarzinom-Patienten, wobei für 53 Patienten eine geeignete postoperative Nachbeobachtung vorlag. Trotz der relativ begrenzten Fallzahl liegt ein Vorteil dieses Kollektivs insbesondere darin, dass ausschließlich R0-resezierte Prostatakarzinomfälle in diese Studie eingeschlossen wurden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass nachfolgend aufgetretene Rezidive tatsächlich Ausdruck einer gesteigerten Tumoraggressivität im Sinne einer Metastasierung sind und nicht bloß das Ergebnis einer Proliferation lokal verbliebener Tumorzellen bei unvollständig reseziertem Primärtumor. Darüber hinaus ist das vorliegende Patientenkollektiv auch repräsentativ, da alle bislang gut etablierten Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms wie der präoperative PSA-Wert, das pT-Stadium und der Gleason Score auch in diesem

Patientenkollektiv eine signifikante prognostische Relevanz besitzen und das Auftreten von Rezidiven signifikant vorhersagen. Dennoch muß die in der vorliegenden Studie erstmals nachgewiesene prognostische Relevanz der Überexpression von Rac bzw. einer starken Überexpression von Tiam1 im Prostatakarzinom an noch größeren Fallzahlen validiert werden. Außerdem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die prognostische Relevanz der Überexpression von Rac bzw. der starken Überexpression von Tiam1 nur an radikalen Prostatektomiepräparaten untersucht. Sollten diese Marker in Zukunft jedoch als Entscheidungshilfen für die präoperative Therapieplanung herangezogen werden, muß ihr prädiktiver Wert zuvor auch an Biopsiematerial verifiziert werden.

Interessanterweise fand sich eine signifikant stärkere Expression von Tiam1 und Rac nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch in der präkanzerösen HG-PIN Läsion. Dies deutet darauf hin, dass die Hochregulation von Tiam1 und Rac bereits in einem frühen Stadium der Prostatakarzinomenstehung auftritt. Obwohl die molekularen Mechanismen dieser Hochregulation von Tiam1 und Rac in HG-PIN Läsionen und Prostatakarzinomen bislang nicht geklärt sind, gibt es doch Hinweise darauf, dass die Hochregulation von Tiam1 zumindest teilweise das Ergebnis eines aktivierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs sein könnte. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Kolonkarzinoms [Oving and Clevers 2002]. Darüber hinaus wurde dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in mehreren Untersuchungen auch eine funktionelle Bedeutung bei der Entstehung PIN-ähnlicher proliferativer Läsionen in der Prostata sowie bei der Progression des Prostatakarzinoms zugeschrieben [Mimeault and Batra 2006; Yardy and Brewster 2005]. Interessanterweise konnte nun unlängst gezeigt werden, dass die Expression von Tiam1 durch Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs gesteigert wird und Tiam1 in Dünn- und Dickdarmtumoren im Vergleich zum Normalgewebe hochreguliert ist [Malliri et al. 2006]. Außerdem wurden in derselben Arbeit Tiam1-exprimierende und Tiam1-defiziente Mäuse mit jeweils multipler intestinaler Neoplasie (sog. Min-Mäuse, entsprechend der beim Menschen bekannten familiären Adenomatosis Polyposis Coli) hinsichtlich der Entstehung und

Proliferation intestinaler Polypen verglichen. Dabei fand sich, dass der Verlust von Tiam1 zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl und der Größe intestinaler Polypen führte [Malliri et al. 2006]. Aufgrund dieser Ergebnisse und des bekannten onkogenen/ transformierenden Potentials des Tiam1/ Rac Signalwegs kann man mutmaßen, dass eine Interaktion des Wnt/ $\beta$ -Catenin- und Tiam1/ Rac Signalwegs eine wichtige Rolle bei der Entstehung und/ oder Progression des Prostatakarzinoms spielt, obwohl die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bislang nicht geklärt sind. Es ist bereits bekannt, dass Tiam1 und Rac verschiedene wichtige Signalwege aktivieren, wie den p38 MAPK-Signalweg, den JNK-Signalweg und den ERK-Signalweg. Diese Signalwege sind alle in der Lage, die Transkription von Genen zu beeinflussen. Daher ist durchaus denkbar, dass die gesteigerte Expression von Tiam1 und/oder Rac im Prostatakarzinom die Expression bestimmter Onkogene induziert und/oder die Expression bestimmter Tumorsuppressorgene inhibiert, was dann sekundär zur onkogenen Transformation, gesteigerten Zellproliferation und/oder Tumorprogression führt.

Von Rac existieren bislang drei bekannte Isoformen: Rac1, Rac2 und Rac3 [Wennerberg and Der 2004]. Dabei werden nur Rac1 und Rac3 von epithelialen Zellen exprimiert, während Rac2 bekanntermaßen nur in hämatopoetischen Zellen vorkommt [Didsbury et al. 1989]. Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete monoklonale Rac-spezifische Antikörper detektiert beide Isoformen (Rac1 und Rac3), die von epithelialen Zellen exprimiert werden können (Engers et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Somit ist zur Zeit noch unklar, ob Rac1 oder Rac3 oder beide Isoformen im Prostatakarzinom überexprimiert sind. Da nach unseren Erkenntnissen aufgrund der hohen Sequenzhomologie der verschiedenen Rac-Isoformen aber alle bislang verfügbaren Rac-Antikörper eine gewisse Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Isoformen aufweisen, und zwar auch dann, wenn die Bezeichnung der Antikörper durch die Anbieter manchmal anderes suggeriert, ist diese Frage zur Zeit auf Proteineebene nicht zu klären. Auch Western Blot-Analysen würden hierbei nicht weiterhelfen, da sich die verschiedenen Rac-Isoformen im Molekulargewicht

nicht voneinander unterscheiden. Unlängst durchgeführte Untersuchungen auf RNA-Ebene mittels Isoform-spezifischer Real-Time-PCR deuten allerdings darauf hin, dass die Überexpression von Rac im Prostatakarzinom offenbar primär auf einer Hochregulation von Rac3 beruht (Engers et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Hochregulation von Rac1 konnte dabei zwar auch beobachtet werden, diese war aber insgesamt deutlich seltener nachweisbar und fiel zudem meist wesentlich schwächer aus als die von Rac3.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie mit einer Nachbeobachtungszeit von bis zu 14,4 Jahren, dass sowohl die Überexpression von Rac als auch eine starke Überexpression von Tiam1 im Prostatakarzinom mit einem aggressiven Tumorverhalten assoziiert sind und in Ergänzung zu den bislang etablierten Prognoseparametern neue, unabhängige prognostische Marker für ein verkürztes rezidivfreies Überleben darstellen. Daher wird es interessant sein, den prädiktiven Wert dieser Marker sowohl in Biopsiematerial als auch in anderen Tumoren zu untersuchen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl die Rho-ähnliche GTPase **Rac**, als auch ihr spezifischer Aktivator **Tiam1** spielen eine entscheidende Rolle bei der onkogenen Transformation von Zellen, sowie der Regulation von Tumorinvasion und Metastasierung. Bisher wurde die prognostische Bedeutung der Expression von Tiam1 und Rac in humanen Karzinomen jedoch noch nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie wurde die Expression von Tiam1 und Rac in normalem sekretorischen Prostataepithel, präneoplastischen high-grade PIN Läsionen und Prostatakarzinomen von 60 R0-resezierten Prostatektomiepräparaten mittels semiquantitativer Immunhistochemie bestimmt.

Dabei zeigte sich jeweils eine signifikant stärkere Expression von Rac und Tiam1 in den HG-PIN Läsionen (jeweils  $p < 0,001$ ) und Prostatakarzinomen (jeweils  $p < 0,001$ ), verglichen mit dem jeweils korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel. Außerdem fand sich eine positive Korrelation zwischen einer starken Tiam1-Überexpression (d.h.  $\geq 3,5$ -fach) und dem Auftreten von Rezidiven ( $p = 0,016$ ) bzw. dem Auftreten einer Lymphgefäßinvasion ( $p = 0,031$ ). Die Überexpression von Rac im Prostatakarzinom war positiv korreliert mit dem Auftreten von Rezidiven ( $p = 0,041$ ) bzw. dem Auftreten einer Perineuralscheideninvasion ( $p = 0,005$ ). In den univariaten Analysen gingen der präoperative PSA-Wert ( $p = 0,046$ ), das Tumorstadium ( $p = 0,002$ ), der Gleason Score ( $p < 0,001$ ), eine starke Tiam1-Überexpression ( $p = 0,011$ ) sowie eine Überexpression von Rac ( $p = 0,038$ ) jeweils mit einem signifikant verringerten rezidivfreien Überleben einher. In der multivariaten Analyse stellten sich sowohl die Überexpression von Rac, als auch eine starke Überexpression von Tiam1 als neue und von den etablierten Parametern unabhängige prognostische Faktoren heraus. (Tiam1: relatives Risiko [RR]=3,90, 95% Konfidenz-Intervall [KI]=1,09-14,01; 2-seitiger  $\chi^2$   $p = 0,037$ ; Rac: [RR]=3,27, 95%, [KI]=1,09-9,83; 2-seitiger  $\chi^2$   $p = 0,035$ ).

Die vorliegende Arbeit zeigt (i), dass eine erhöhte Expression von Tiam1 und Rac ein frühes Ereignis bei der Prostatakarzinomentstehung darstellt und dass (ii) sowohl die Überexpression von Rac als auch eine starke Überexpression von Tiam1 im Vergleich zu

normalem sekretorischen Epithel jeweils neue und unabhängige Prognosefaktoren für das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinom-Patienten sind.

## 6 LITERATUR

Beck T, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Pollow K and Knapstein P G (1994) Immunohistochemical detection of hormone receptors in breast carcinomas (ER-ICA, PgR-ICA): prognostic usefulness and comparison with the biochemical radioactive-ligand-binding assay (DCC). *Gynecol. Oncol.* 53, 220-227

Bostwick D G and Brawer M K (1987) Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 59, 788-794

Bostwick D G, Grignon D J, Hammond M E, Amin M B, Cohen M, Crawford D, Gospodarowicz M, Kaplan R S, Miller D S, Montironi R, Pajak T F, Pollack A, Srigley J R and Yarbro J W (2000) Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol. Lab Med.* 124, 995-1000

Bostwick D G and Montironi R (1995) Prostatic intraepithelial neoplasia and the origins of prostatic carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 191, 828-832

Buchsbaum R J, Connolly B A and Feig L A (2002) Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol. Cell Biol.* 22, 4073-4085

Buchsbaum R J, Connolly B A and Feig L A (2003) Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin. *J. Biol. Chem.* 278, 18833-18841

Byrne R L, Horne C H, Robinson M C, Autzen P, Apakama I, Bishop R I, Neal D E and Hamdy F C (1997) The expression of waf-1, p53 and bcl-2 in prostatic adenocarcinoma. *Br. J. Urol.* 79, 190-195

Cancer statistics (2004) Jemal A; Tiwari R C; Murray T; Ghafoor A; Samuels A; Ward E; Feuer E J; Thun M J. *CA Cancer J. Clin.* 54, 8-29

Carstanjen D, Yamauchi A, Koornneef A, Zang H, Filippi M D, Harris C, Towe J, Atkinson S, Zheng Y, Dinauer M C and Williams D A (2005) Rac2 regulates neutrophil chemotaxis, superoxide production, and myeloid colony formation through multiple distinct effector pathways. *J. Immunol.* 174, 4613-4620

Chan A Y, Coniglio S J, Chuang Y Y, Michaelson D, Knaus U G, Philips M R and Symons M (2005) Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* 24, 7821-7829

Chen H and Antonarakis S E (1995) Localization of a human homolog of the mouse Tiam-1 gene to chromosome 21q22.1. *Genomics* 30, 123-127

Cher M L, Ito T, Weidner N, Carroll P R and Jensen R H (1995) Mapping of regions of physical deletion on chromosome 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J. Urol.* 153, 249-254

Corbetta S, Gualdoni S, Albertinazzi C, Paris S, Croci L, Consalez G G and de C, I (2005) Generation and characterization of Rac3 knockout mice. *Mol. Cell Biol.* 25, 5763-5776

Coso O A, Chiariello M, Yu J C, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T and Gutkind J S (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146

Croker B A, Handman E, Hayball J D, Baldwin T M, Voigt V, Cluse L A, Yang F C, Williams D A and Roberts A W (2002a) Rac2-deficient mice display perturbed T-cell distribution and chemotaxis, but only minor abnormalities in T(H)1 responses. *Immunol. Cell Biol.* 80, 231-240

Croker B A, Tarlinton D M, Cluse L A, Tuxen A J, Light A, Yang F C, Williams D A and Roberts A W (2002b) The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes. *J. Immunol.* 168, 3376-3386

Crompton A M, Foley L H, Wood A, Roscoe W, Stokoe D, McCormick F, Symons M and Bollag G (2000) Regulation of Tiam1 nucleotide exchange activity by pleckstrin domain binding ligands. *J. Biol. Chem.* 275, 25751-25759

Didsbury J, Weber R F, Bokoch G M, Evans T and Snyderman R (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* 264, 16378-16382

Dong J T, Lamb P W, Rinker-Schaeffer C W, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs J T and Barrett J C (1995) KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 268, 884-886

Engers R and Gabbert H E (2000) Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126, 682-692

Engers R, Springer E, Michiels F, Collard J G and Gabbert H E (2001) Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J. Biol. Chem.* 276, 41889-41897

Frost J A, Xu S, Hutchison M R, Marcus S and Cobb M H (1996) Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol. Cell Biol.* 16, 3707-3713

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI S 2 (2006) Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.

Gleason D F (1988) Histologic grade, clinical stage, and patient age in prostate cancer. *NCI. Monogr* 15-18

Gu Y, Byrne M C, Paranaivitana N C, Aronow B, Siefiring J E, D'Souza M, Horton H F, Quilliam L A and Williams D A (2002) Rac2, a hematopoiesis-specific Rho GTPase, specifically regulates mast cell protease gene expression in bone marrow-derived mast cells. *Mol. Cell Biol.* 22, 7645-7657

Gu Y, Filippi M D, Cancelas J A, Siefiring J E, Williams E P, Jasti A C, Harris C E, Lee A W, Prabhakar R, Atkinson S J, Kwiatkowski D J and Williams D A (2003) Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 302, 445-449

- Haataja L, Groffen J and Heisterkamp N (1997) Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J. Biol. Chem.* 272, 20384-20388
- Habets G G, Scholtes E H, Zuydgeest D, van der Kammen R A, Stam J C, Berns A and Collard J G (1994) Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 77, 537-549
- Hanash K A, Utz D C, Cook E N, Taylor W F and Titus J L (1972) Carcinoma of the prostate: a 15-year followup. *J. Urol.* 107, 450-453
- Hanus M C, Zagars G K and Pollack A (1999) Familial prostate cancer: outcome following radiation therapy with or without adjuvant androgen ablation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 43, 379-383
- Heidenberg H B, Sesterhenn I A, Gaddipati J P, Weghorst C M, Buzard G S, Moul J W and Srivastava S (1995) Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer. *J. Urol.* 154, 414-421
- Hoffman G R and Cerione R A (2002) Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett.* 513, 85-91
- Hordijk P L, ten Klooster J P, van der Kammen R A, Michiels F, Oomen L C and Collard J G (1997) Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 278, 1464-1466
- Johansson J E, Adami H O, Andersson S O, Bergstrom R, Holmberg L and Krusemo U B (1992) High 10-year survival rate in patients with early, untreated prostatic cancer. *JAMA* 267, 2191-2196
- Joyce P L and Cox A D (2003) Rac1 and Rac3 are targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling. *Cancer Res.* 63, 7959-7967
- Keely P J, Westwick J K, Whitehead I P, Der C J and Parise L V (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390, 632-636
- Kumar V, Toussi H, Marr C, Hough C and Javle P (2004) The benefits of radical prostatectomy beyond cancer control in symptomatic men with prostate cancer. *BJU. Int.* 93, 507-509
- Lambert J M, Lambert Q T, Reuther G W, Malliri A, Siderovski D P, Sondek J, Collard J G and Der C J (2002) Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat. Cell Biol.* 4, 621-625
- Malliri A, Rygiel T P, van der Kammen R A, Song J Y, Engers R, Hurlstone A F, Clevers H and Collard J G (2006) The rac activator Tiam1 is a Wnt-responsive gene that modifies intestinal tumor development. *J. Biol. Chem.* 281, 543-548
- Malliri A, van der Kammen R A, Clark K, van d, V, Michiels F and Collard J G (2002) Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 417, 867-871

Marks L S, Kojima M, Demarzo A, Heber D, Bostwick D G, Qian J, Dorey F J, Veltri R W, Mohler J L and Partin A W (2004) Prostate cancer in native Japanese and Japanese-American men: effects of dietary differences on prostatic tissue. *Urology* 64, 765-771

McDonnell T J, Navone N M, Troncoso P, Pisters L L, Conti C, von Eschenbach A C, Brisbay S and Logothetis C J (1997) Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *J. Urol.* 157, 569-574

McNeal J E (1981) The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 2, 35-49

McNeal J E, Bostwick D G, Kindrachuk R A, Redwine E A, Freiha F S and Stamey T A (1986) Patterns of progression in prostate cancer. *Lancet* 1, 60-63

Michiels F, Habets G G, Stam J C, van der Kammen R A and Collard J G (1995) A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* 375, 338-340

Mimeault M and Batra S K (2006) Recent advances on multiple tumorigenic cascades involved in prostatic cancer progression and targeting therapies. *Carcinogenesis* 27, 1-22

Mira J P, Benard V, Groffen J, Sanders L C and Knaus U G (2000) Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 185-189

Miyake H, Hara I, Okamoto I, Gohji K, Yamanaka K, Arakawa S, Saya H and Kamidono S (1998) Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates human prostate cancer development. *J. Urol.* 160, 1562-1566

Norton L and Simon R (1977) Tumor size, sensitivity to therapy, and design of treatment schedules. *Cancer Treat. Rep.* 61, 1307-1317

Otsuki Y, Tanaka M, Yoshii S, Kawazoe N, Nakaya K and Sugimura H (2001) Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 4385-4390

Oving I M and Clevers H C (2002) Molecular causes of colon cancer. *Eur. J. Clin. Invest* 32, 448-457

Qiu R G, Chen J, Kirn D, McCormick F and Symons M (1995) An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374, 457-459

Ridley A J, Paterson H F, Johnston C L, Diekmann D and Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410

Sander E E, van Delft S, ten Klooster J P, Reid T, van der Kammen R A, Michiels F and Collard J G (1998) Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell Biol.* 143, 1385-1398

Schmitz-Drager B J, Eichholzer M, Beiche B and Ebert T (2001) Nutrition and prostate cancer. *Urol. Int.* 67, 1-11

Servitja J M, Marinissen M J, Sodhi A, Bustelo X R and Gutkind J S (2003) Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J. Biol. Chem.* 278, 34339-34346

Skorski T, Wlodarski P, Daheron L, Salomoni P, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Wasik M and Calabretta B (1998) BCR/ABL-mediated leukemogenesis requires the activity of the small GTP-binding protein Rac. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 11858-11862

Stam J C, Sander E E, Michiels F, Van Leeuwen F N, Kain H E, van der Kammen R A and Collard J G (1997) Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. *J. Biol. Chem.* 272, 28447-28454

Steege P S, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson U P, Talmadge J E, Liotta L A and Sobel M E (1988) Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 200-204

Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, Sakagami H, Kondo H, Nozawa S, Aiba A and Katsuki M (1998) Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17, 3427-3433

Suzuki H, Emi M, Komiya A, Fujiwara Y, Yatani R, Nakamura Y and Shimazaki J (1995) Localization of a tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. *Genes Chromosomes. Cancer* 13, 168-174

UICC 6.Auflage (2002) TNM Classification of Malignant Tumors, sixth edition (2002). *Cancer* 80, 1803-1804

Umbas R, Isaacs W B, Bringuier P P, Schaafsma H E, Karthaus H F, Oosterhof G O, Debruyne F M and Schalken J A (1994) Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res.* 54, 3929-3933

Van Leeuwen F N, van der Kammen R A, Habets G G and Collard J G (1995) Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells. *Oncogene* 11, 2215-2221

Wennerberg K and Der C J (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.* 117, 1301-1312

Westwick J K, Lambert Q T, Clark G J, Symons M, Van Aelst L, Pestell R G and Der C J (1997) Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol. Cell Biol.* 17, 1324-1335

Yardy G W and Brewster S F (2005) Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic. Dis.* 8, 119-126

Zhang S, Han J, Sells M A, Chernoff J, Knaus U G, Ulevitch R J and Bokoch G M (1995) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem.* 270, 23934-23936

## 7 VERÖFFENTLICHUNGEN

Sarbia M, Bitzer M, Siegel D, Ross D, Schulz WA, Zotz RB, Kiel S, Geddert H, Kandemir Y, Walter A, Willers R, Gabbert HE (2003) Association between NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase1 (NQO1) inactivating C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *International Journal of Cancer*: 107, 381-386

Engers R, Mueller M, Walter A, Collard JG, Willers R, Gabbert HE (2006) Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *British Journal of Cancer* (in Revision).

Engers R, Ziegler S, Mueller M, Walter A, Collins C, Willers R, Gabbert HE (2006) Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas. *The Journal of Pathology* (eingereicht).

## **8 DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. R. Engers für die Überlassung des interessanten Themas und seine bereitwillige Unterstützung zu allen Zeiten dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H.E. Gabbert danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Labors des Instituts für Pathologie.

Auch bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Müller für die Bereitstellung der klinischen Daten, sowie bei Herrn Dr. R. Willers für die statistische Validierung der Daten.

Bei Herrn Dr. J.G. Collard, Division of Cell Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, möchte ich mich für die Bereitstellung des Tiam1 Antikörpers bedanken.

Frau S. Schneeloch und Frau C. Feldhoff möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung während des praktischen Teils der Arbeit danken.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. C. Kramer für seine unermüdliche Motivation, stetige Hilfsbereitschaft und seinen ansteckenden Optimismus besonders während des schriftlichen Teils der Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter und meinem Vater für ihre vielfältige Unterstützung danken.

## 9 LEBENS LAUF

Alexandra Walter  
geboren am 23.09.1976 in Düsseldorf

### Schule

08/ 1983 – 07/ 1987 kath. Grundschule am Paulusplatz, Düsseldorf  
08/ 1987 – 06/ 1996 städt. Goethegymnasium, Düsseldorf  
06/ 1996 Abitur

### Medizinstudium

04/ 1997 – 11/ 2004 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
03/ 2000 ärztliche Vorprüfung  
03/ 2001 1. Staatsexamen  
08/ 2003 2. Staatsexamen  
11/ 2004 3. Staatsexamen  
12/ 2004 Approbation als Ärztin

### Facharztausbildung

03/ 2005 – 10/ 2006 Ärztin in Weiterbildung im Fach Mikrobiologie im Labor Dr. Stein  
und Kollegen, Mönchengladbach  
seit 11/ 2006 Ärztin in Weiterbildung im Fach Mikrobiologie am Max von Pettenkofer  
Institut, LMU München

# Expression und prognostische Relevanz von Tiam1 und Rac im humanen Prostatakarzinom: Eine quantitative immunhistochemische Untersuchung

*Alexandra Walter*

Sowohl die Rho-ähnliche GTPase **Rac**, als auch ihr spezifischer Aktivator **Tiam1** spielen eine entscheidende Rolle bei der onkogenen Transformation von Zellen, sowie der Regulation von Tumorinvasion und Metastasierung. Bisher wurde die prognostische Bedeutung der Expression von Tiam1 und Rac in humanen Karzinomen jedoch noch nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie wurde die Expression von Tiam1 und Rac in normalem sekretorischen Prostataepithel, präneoplastischen high-grade PIN Läsionen und Prostatakarzinomen von 60 R0-resezierten Prostatektomiepräparaten mittels semiquantitativer Immunhistochemie bestimmt.

Dabei zeigte sich jeweils eine signifikant stärkere Expression von Rac und Tiam1 in den HG-PIN Läsionen (jeweils  $p < 0,001$ ) und Prostatakarzinomen (jeweils  $p < 0,001$ ), verglichen mit dem jeweils korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel. Außerdem fand sich eine positive Korrelation zwischen einer starken Tiam1-Überexpression (d.h.  $\geq 3,5$  fach) und dem Auftreten von Rezidiven ( $p = 0,016$ ) bzw. dem Auftreten einer Lymphgefäßinvasion ( $p = 0,031$ ). Die Überexpression von Rac im Prostatakarzinom war positiv korreliert mit dem Auftreten von Rezidiven ( $p = 0,041$ ) bzw. dem Auftreten einer Perineuralscheideninvasion ( $p = 0,005$ ). In den univariaten Analysen gingen der präoperative PSA-Wert ( $p = 0,046$ ), das Tumorstadium ( $p = 0,002$ ), der Gleason Score ( $p < 0,001$ ), eine starke Tiam1-Überexpression ( $p = 0,011$ ) sowie eine Überexpression von Rac ( $p = 0,038$ ) jeweils mit einem signifikant verringerten rezidivfreien Überleben einher. In der multivariaten Analyse stellten sich sowohl die Überexpression von Rac, als auch eine starke Überexpression von Tiam1 als neue und von den etablierten Parametern unabhängige prognostische Faktoren heraus. (Tiam1: relatives Risiko [RR]=3,90, 95% Konfidenz-Intervall [KI]=1,09-14,01; 2-seitiger  $\chi^2$   $p = 0,037$ ; Rac: [RR]=3,27, 95%, [KI]=1,09-9,83; 2-seitiger  $\chi^2$   $p = 0,035$ ).

Die vorliegende Arbeit zeigt (i), dass eine erhöhte Expression von Tiam1 und Rac ein frühes Ereignis bei der Prostatakarzinomentstehung darstellt und dass (ii) sowohl die Überexpression von Rac als auch eine starke Überexpression von Tiam1 im Vergleich zu normalem sekretorischen Epithel jeweils neue und unabhängige Prognosefaktoren für das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinom-Patienten sind.