Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Nuklearmedizin
Prof. Dr. Reske

Radiofettsäuren zum Targeting des Fettsäure-Synthesekomplexes beim Prostatakarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Isabel Graul

Schleiz

2011

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Reske
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Machulla
Tag der Promotion:	19.10.2012

Abkürzungsverzeichnis **V**
1. Einleitung **1**
1.1. Prostata- Das Organ 2
1.2. Klinik 2
1.3. Pathogenese 3
1.4. Diagnostik 4
1.4.1. Prostata Spezifisches Antigen 5
1.4.2. Digital- rektale Untersuchung 5
1.4.3. Prostata- Stanzbiopsie 6
1.4.4. Cholin-PET/CT 7
1.4.5. Acetat –PET/CT 8
1.4.6. MRT 9
1.5. Therapie 11
1.6. Fettsäuremetabolismus 11
1.6.1. Fettsäurebiosynthese 11
1.6.2. β-Oxidation 13
1.6.3. Regulation von Synthese und Abbau von Fettsäuren 14
1.6.4. Fettsäuresynthese 15
1.6.5. Fettsäuresynthase (FAS) im PCa 16
1.6.6. Inhibitoren der FAS 19
1.7. Zielsetzung 21
2. Materialien und Methoden **22**
2.1. Material 22
2.1.1. Chemikalien 22
2.1.2. Lösungen und Puffer 24
2.1.3. Kulturmedien 25
2.1.4. Zelllinien 25
2.1.5. Enzyme und Antikörper 26
2.1.6. Instrumente 26
2.2. Zellbiologische Methoden 27
2.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen 27
2.2.2. Umsetzen der Zelllinien 27
2.2.3. Bestimmung der Zellzahl 30
2.2.4. Zelluläre Aufnahme 30

2.2.5. Lipidextraktion aus Zellen nach Folch 30
2.2.6. Dünnschichtchromatographie 31
2.2.7. Zelllysate 32
2.3. Molekularbiologische Methoden 33
2.3.1. Western Blot 33
2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung 34
2.3.3. Isolierung der Gesamt-RNA 34
2.3.4. Reverse Transkription (RT) 35
2.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR) 35
2.3.6. Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren 36
2.3.7. Immunhistochemie an Patientenbiopsien 37
3. Ergebnisse 38
3.1. Zelluläre Aufnahme von ^{14}C- Palmitinsäure 38
3.2. Zelluläre Aufnahme von ^{14}C- Myrestinsäure 42
3.3. Zelluläre Aufnahme von 3H-Acetat 44
3.4. Zelluläre Aufnahme ^{11}C-Cholin 45
3.5. Lipidextraktion 46
3.6. Western Blot 48
3.7. Immunfluoreszenzmikroskopie 50
3.8. PCR Analyse 53
3.9. Immunhistologie der Patientenbiopsien 54
4. Diskussion 56
4.1. Zelluläre Aufnahme 57
4.2 Lokalisation der aufgenommenen Fettsäuren 61
4.3. FAS Expression in Prostatazellen 61
4.4. Prozess der FAS Expression auf genetischer Ebene 63
4.5. FAS Expression in Geweben 65
5. Zusammenfassung 66
6. Literaturverzeichnis 68
7. Danksagung 74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACLY	ATP Citratlyase
AMACR	Alpha-methylacyl-CoA Racemase
AMP	Adenosinmonophosphat
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BPE	bovine pituitary extract
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BRCA	Brustkrebsgen
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Carnitin-Acyltransferase
CoA	Coenzym A
CPT	Carnitin- Palmitoyltransferase
DAB	3,3 Diaminobezidin
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	digital-rektale Untersuchung
ECL	enhanced Chemoiluminescence
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
ER	Östrogenrezeptor
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“
ETF	Elektronen übertragendes Flavoprotein
F-FDG	radioaktiv fluormarkierte Fluordesoxyglukose
FAD/$FADH_2$	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAS	Fettsäuresynthase
FATP	Fettsäurentransportprotein
FFA	Fettsäure freies Albumin

FKS/FBS	fetales Kälberserum
FS	Fettsäure
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase
GF	Wachstumsfaktor
GFR	Rezeptor des Wachstumsfaktors
GLUT	Glukosetransporter
GOLPH	Golgi-Phosphoprotein
GS	Gleason Score
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIH	Hypoxie-induced factor
HRP	Meerettich- Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
ITS	Insulin + Transferrin + Sodiumselenit
i.v.	intravenös
K-SFM	Keratinozytenserum freies Medium
LCAS	Long chain acyl- CoA synthase
MAPK	„mitogen-aktivated proteinkinase“
MAT	Malonyl- /Acetyltransferase
mRNA	messenger- Ribonukleinsäure
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD^+/NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
$NADP^+$/NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NFκB	nukleärer Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B- Zellen
P13K-Akt	serine threonine kinase of phosphatidylinositol 3 kinase
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIN	prostatische intraepitheliale Neoplasie
PFA	Perfluoralkoxylalkan

PPAR	Peroxisomen proliferations-aktivierender Rezeptor
PSA	Prostata spezifisches Antigen
PTEN	“phosphatase and tensin homoloque”
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PR	Progesteronrezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SH	Steroidhormone
SH-Gruppe	Sulfonylhydroxylgruppe
SR	Steroidrezeptor
SREBP-1c	“Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c”
TCA	Tricarbonsäurezyklus, Zitratzyklus
TRUS	transrektaler Ultraschall
USP2a	ubiquitinspezifische Protease

1. Einleitung

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung des Mannes. Durch die sensitiveren diagnostischen Möglichkeiten und das steigende durchschnittliche Lebensalter der Männer nahmen in den letzten Jahren die festgestellten Karzinome der Prostata stetig zu. In Deutschland stellt das PCa nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste maligne Todesursache dar *(Abb.1).* [1,2,3]

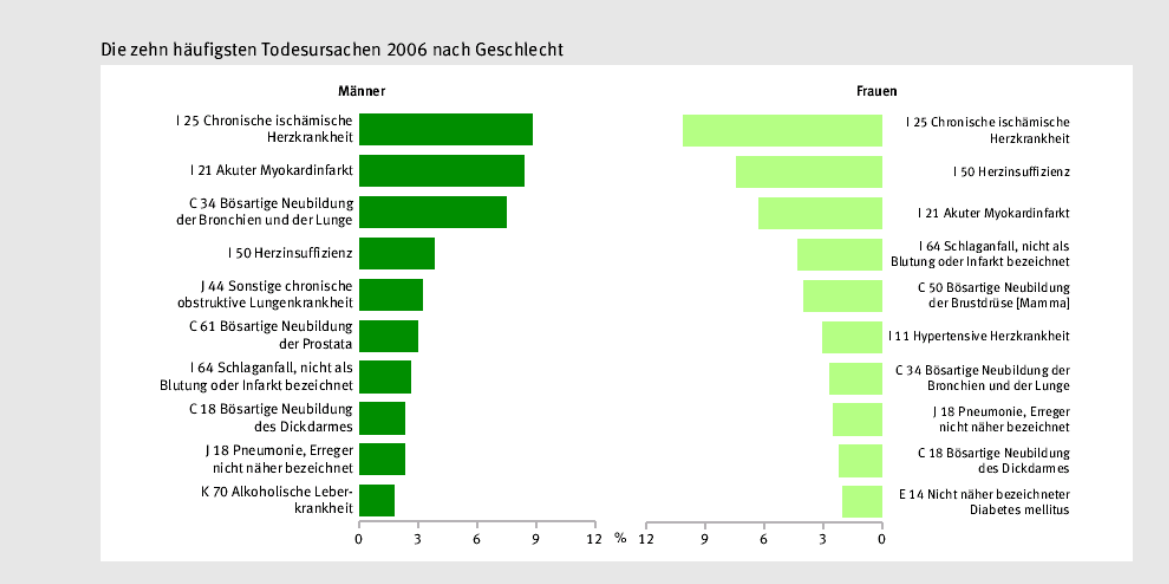


Abb.1 Todesursachen 2006 nach Geschlecht unterteilt[2]

Hauptrisikofaktor für das Prostatakarzinom ist das Alter. In einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung wird dem Krankheitsbild Prostatakarzinom in naher Zukunft eine noch größere Bedeutung zugeschrieben werden.[4]

Neben dem Alter scheinen auch genetische Faktoren sowie Umwelteinflüsse eine Rolle zu spielen, insbesondere Ernährungsgewohnheiten.[5]

1.1. Prostata- Das Organ

Die Prostata ist ein ca. 30 g schweres Organ und besteht aus 30 – 50 Drüsenläppchen. Die Ausführungsgänge der Drüsen enden in der Harnröhre. Die Drüse liegt unterhalb der Harnblase und umfasst den Anfangsteil der Harnröhre.
Das gesunde Drüsenepithel besteht aus luminalen sekretorischen Zellen, die auf der Basalmembran aufliegen, und wenigen neuroendokrinen Zellen. Die luminalen Zellen zeichnen sich durch die Expression von Prostata spezifischem Antigen (PSA) und Androgenrezeptoren aus. Die intakte Basalmembran exprimiert Zytokeratin. Die Prostata weist eine zonale Gliederung in zentrale Zone, periphere Zone und Transitionalzone auf *(Abb.2).* Die häufigsten Veränderungen der Prostata sind die Prostatitis, die benigne Prostatahyperplasie (BPH) und das Prostatakarzinom.[6]

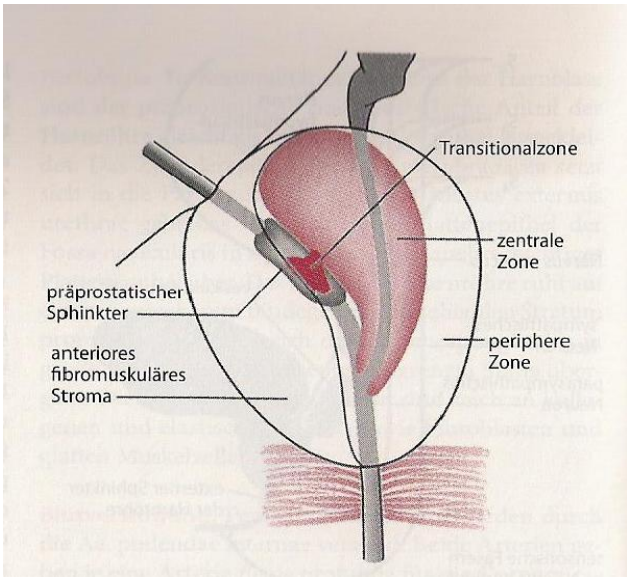


Abb. 2 *Einteilung der Prostata nach McNeal in zentrale Zone, Transitionalzone und periphere Zone*[7]

1.2. Klinik

Die meisten Prostatakarzinome sind asymptomatisch, vor allem in den frühen Stadien. Etwa 10% der Karzinome werden bei histologischen Untersuchungen nach Biopsie einer BPH entdeckt. Da die meisten Prostatakarzinome in peripheren Regionen beginnen, werden sie häufig bei der Routinediagnostik der digital-

rektalen Untersuchung (DRU) gefunden. Bei der DRU ist eine Prostata mit Karzinom hart und knotig palpabel.[8]

Bei fortgeschrittenen Tumoren können Symptome, wie lokales Druckgefühl oder Obstruktion der harnabführenden Wege, auftreten.

Bei sehr aggressiven Tumoren kann die Erstmanifestation der Symptome auch durch Metastasen erfolgen. Das Prostatakarzinom metastasiert häufig in das Skelett, hier treten entweder osteolytische oder für das PCa sehr typisch osteoblastische Veränderungen auf.[9,10]

1.3. Pathogenese

In Autopsiestudien wurde bereits bei 80% der Männer im Alter von 40 Jahren eine BPH festgestellt. Diese tritt meist in der zentralen Zone der Prostata auf, dies erklärt die gängige Symptomatik. Durch die Einengung des Harnleiters kommt es zu Störungen der Blasenentleerung. Diese Symptome können mit einem α-Blocker gelindert werden, da sich die glatten Muskelzellen zwischen den Drüsenazini durch die Hemmung der á- Adrenorezeptoren relaxieren.

Die BPH grenzt sich gegen die Formen des PCas ab, sie ist keine Vorstufe eines Karzinoms, kann aber aufgrund der Größenzunahme an Gewebe ähnliche klinische Beschwerden verursachen.

Dagegen zählt die prostatische intraepitheliale Neoplasie (PIN) zu den Vorläufern eines Karzinoms, diese Vorstufe ist noch auf das sekretorische Epithel der vorbestehenden Drüsenazini beschränkt. Latente maligne Veränderungen treten bei Männern zwischen 40 und 50 Jahren zu 1/3 und über 60 Jährigen zu 2/3 in Autopsiestudien auf. Klinisch tritt das Karzinom deutlich seltener in Erscheinung.[11]

Siebenundneunzig Prozent der PCas sind Adenokarzinome. Ihre Entstehung aus entarteten Drüsen ist androgenabhängig. Vornehmlich wachsen die Karzinome in der peripheren Zone. Bei infiltrativen Wachstum greift das PCa auf umliegende Strukturen, wie Samenblasen, Harnblase, Beckenboden oder Rektum über.

Obwohl die Ursache des PCa ungeklärt ist, gibt es doch eine Reihe von Einflussfaktoren, wie zum Beispiel genetische Faktoren, Umwelteinflüsse oder Hormone, die an der Pathogenese einen Anteil haben.[12]

Es besteht eine höhere Inzidenz ein PCa zu entwickeln bei Verwandten ersten Grades. Weiterhin zeigt sich das PCa bei Amerikanern afrikanischer Herkunft

deutlich häufiger als bei Europäern oder Asiaten. Dank intensiver Forschung sind mittlerweile einige Gene bekannt, welche die Vererbung des PCas begünstigen, insbesondere einige auf Chromosom 1. Die insgesamt 4 wichtigsten Loci sind 1q24(HPC1- heriditary prostata cancer1), 1q42 (PCaP- PCA predisposing), 1p36 (CABP- carcinom brain- prostate) und auf dem X- Chromosom fanden sich ebenfalls Hinweise für ein Suszeptibilitätsgen Xp27-28.[13]

Für die deutlich häufigeren sporadischen Fälle wurde eine Hypermethylation der Glutathion-S-Transferase p1 gefunden, einem genomischen Beschützer auf Chromosom 11 oder Telomerschäden.[14,15]

Auch Umwelteinflüsse können hier eine große Rolle spielen. So häufen sich die Fälle von PCa insbesondere in Bereichen mit hoher Industriedichte und bestimmten geographischen Regionen, wie zum Beispiel Skandinavien. Ein weiterer Risikofaktor ist die Ernährung mit vielen tierischen Fetten.[16]

Das PCa entwickelt sich nicht bei Männern, die vor der Pubertät kastriert wurden, dies lässt die deutliche Rolle der Androgene erkennen. Die meisten Karzinome der Prostata lassen sich durch eine Orchiektomie oder dem Zuführen von Östrogen hemmen.[17]

1.4. Diagnostik

Zu den etablierten diagnostischen Methoden gehören die Messung des Prostata Spezifischen Antigen (PSA)- Wertes, die digital- rektale Untersuchung (DRU) gegebenenfalls mit transrektalem Ultraschall (TRUS), und bei Verdacht eine Cholin- Possitronen- Emissions- Tomographie (PET) oder Acetat-PET, sowie die Prostatastanzbiopsien mit histologischer Auswertung. Weiterhin sind Maßnahmen, wie MRT bei unklarer Infiltration umliegender Strukturen oder Szintigraphie zur Abklärung von möglichem Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen indiziert. Auch die Magnet Resonanz –Spektroskopie (MRS) steht zur Verfügung, hier liegen aber noch keine zuverlässigen Untersuchungsergebnisse vor. Weitere Marker und Methoden sind in der Entwicklung.[18]

1.4.1. Prostata Spezifisches Antigen

PSA ist ein proteolytisches Enzym, das in normalen, sowie veränderten Prostataepithelzellen exprimiert wird. Es wird in hohen Konzentrationen in luminalen Zellen prostatischer Azini gebildet und dann in das Sperma abgegeben, wo es der Verbesserung der Motilität der Spermien dient.
Die PSA- Wert- Bestimmung wird Männern im Alter über 50 Jahren jährlich empfohlen, bei familiärer Belastung bereits ab 45 Jahren. Werte unter 4 ng/ml werden als normal angesehen, bei Werten bis 10 ng/ml liegt eine Grauzone mit starken Differenzierungsschwierigkeiten. Der positive Vorhersagewert bei einem PSA-Wert über dem Grenzwert von 4 ng/ml liegt unter 20%. In Kombination mit der digital- rektalen Untersuchung steigt der Vorhersagewert auf circa 50%.[8] Der PSA Wert sagt nichts über die Aggressivität einer Tumorerkrankung aus. Eine Prostatitis, Harnverhalt, benigne Prostatahyperplasie, zeitnahe Ejakulation oder sogar sportliche Aktivität, wie Reiten oder Fahrradfahren können zu einem erhöhten PSA-Spiegel im Serum führen.[19]
Auch in der Tumornachsorge kommt dem PSA- Wert eine Bedeutung zu, so besteht bei einer PSA-Verdopplung in einem Zeitraum von 10 Jahren ein erhöhtes Mortalitätsrisiko.[20,21]

1.4.2. Die digital- rektale Untersuchung

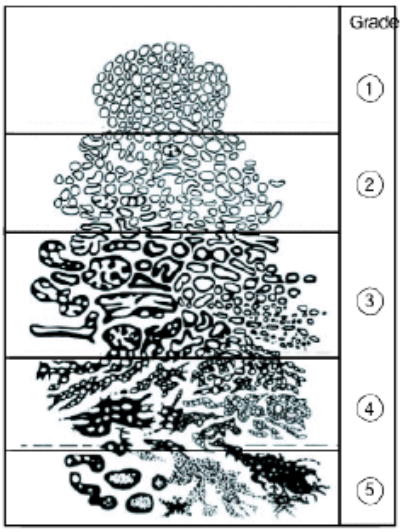
Die DRU eignet sich zur Untersuchung der Oberflächenbeschaffenheit der Prostata, hierbei sind vor allem Verhärtungen oder Asymmetrien von pathologischem Wert. Der untersuchte Teil der Prostata Richtung Rektum ist die häufigste Lokalisation des Prostatakarzinoms, weshalb der DRU eine große Bedeutung zukommt. Bei routinemäßig durchgeführten digital-rektalen Untersuchungen im Rahmen der körperlichen Untersuchung können entscheidende Zufallsbefunde, z.B. der Verdacht auf ein Rektumkarzinom erhoben werden. Sie hängt allerdings stark vom jeweiligen Untersucher und dessen Erfahrungen ab. Bei auffälligem Tastbefund oder erhöhtem PSA-Wert erfolgt heute standardmäßig zum genauen Ausmessen der Prostata und für die Dokumentation einer Veränderung der transrektale Ultraschall (TRUS), ebenfalls

können mit dieser Methode Inhomogenitäten festgestellt werden. In diesem Falle wäre der nächste Schritt die histologische Sicherung von Gewebe mittels Biopsie.[22]

1.4.3. Prostata- Stanzbiopsie

Mit Hilfe der Prostatastanzbiopsie kann ein Prostatakarzinom nicht nur bewiesen, sondern auch dank eines einheitlichen Scoresystems dem Gleason Score vergleichbar eingeteilt werden *(Abb. 3)*. Hierfür werden aus den Außenbereichen der Prostata mehrere Proben entnommen und histologisch begutachtet. Zum Vermeiden einer der häufigsten Komplikationen, einem Infekt, wird die Biopsie nur unter Antibiotikaprophylaxe durchgeführt. Zunächst werden die angefertigten Schnitte einer konventionellen Analyse der morphologischen Strukturen unterzogen. Neben dieser gibt es neue Marker zur Identifikation von Karzinomzellen. Neben Basalzellmarkern (Zytokeratinen und p63) sowie α-Methylazyl-CoA-Razemase (AMACR) können auch Fettsäuresynthase (FAS) oder Golgi-Phosphoprotein 2 (GOLPH2) diagnostisch nützlich sein. Das Züricher Schema zur Diagnostik des Prostatakarzinoms basiert zunächst auf einer konventionellen Analyse der morphologischen Strukturen, gefolgt von einer Kombination aus p63-, AMACR-, FASN- und GOLPH2-Immunreaktion.[23,24]

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



Histologische Grade nach Gleason (Gleason, Mellinger, 1974)

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

Abb. 3 *Gleason Score Einteilung zur Beurteilung der histologischen Grade nach Gleason; Dabei wird der sogenannte Entdifferenzierungsgrad (d.h. die Abweichung von normalem Gewebe) der häufigsten und der zweithäufigsten Zellpopulation des Tumors bewertet. Dabei werden jeweils Werte von 1 bis 5 vergeben. Je höher der Wert, desto höher ist der Grad der Entdifferenzierung. Die Angabe erfolgt immer nach dem Muster: Gleason Wert 1 + Wert 2 = Summe beider Werte. Die Bewertung erfolgt mikroskopisch anhand von Material einer Prostata-Stanzbiopsie oder einer bereits operativ entfernten Prostata. Die Einteilung umfasst fünf Grade, wobei Grad 1 die am besten differenzierten Tumoren beschreibt und Grad 5 die am schlechtesten differenzierten Tumoren, deren Wachstumsmuster fast jede Ähnlichkeit mit normalem Prostatagewebe verloren haben. Die Grade 2 bis 4 liegen dazwischen.*[25]

1.4.4. Cholin-PET/CT

^{11}C-Cholin ist ein radioaktiv markiertes Cholinderivat, welches als chemisch unverändertes Substrat den Cholinstoffwechsel markiert. Ein Drittel der Phospholipide zellulärer Membranlipide besteht aus Phophatidylcholin. Dementsprechend wird ^{11}C-Cholin nach i.v.- Injektion sehr schnell durch Cholintransporter aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum transportiert, dort durch die zytosolische Cholinkinase phosphoryliert und nach enzymatischer Aktivierung mit Diacylglycerinen zu Phosphatidylcholin verestert. Im PCa ist Cholinkinase als Schlüsselenzym des Cholinstoffwechsels ebenso wie Phospholipase C und D aufreguliert. Hieraus resultiert eine deutlich erhöhte Cholinaufnahme in PCa- Zellen.[44] Organe mit einer hohen Cholinaufnahme sind

die Leber, Nieren und Pankreas und zum Teil das Interstitium. In der Primärdiagnostik des PCas ist die Aufnahme von ^{11}C- Cholin deutlich vermehrt, die Aufnahme in maligne im Gegensatz zu benignen Geweben ist signifikant höher. Auch Tumore mit einem Durchmesser kleiner als 0,5 cm zeigten eine deutliche Signalanhebung. Eine signifikante Abgrenzung von der chronischen Prostatitis, sowie zur benignen Prostatahyperplasie ist mit dieser Technik möglich. Vergrößerte Lymphknoten bei BPH mit lokaler Prostatitis kann eine hohe ^{11}C-Cholinaufnahme zeigen, hier ist das MRT mit Kontrastmittel zur Differenzierung der Lokalisation eines PCas in der peripheren oder zentralen Zone hilfreich. Die akute Prostatitis zeigt eine hohe Cholinaufnahme, diese ist meist symmetrisch in beiden Lappen, eine Diffenzierung mit dem ^{11}C-Cholin-PET ist anhand der Signalstärke nicht möglich.[77,78]

Lymphknotenmetastasen zeigen einen höheren 11C-Cholinaufnahme und können so mit dem ^{11}C-Cholin-PET gut diagnostiziert werden. Die Unterscheidung zu infektionsbedingten Lymphknotenvergrößerungen kann schwierig werden, allerdings zeigen unspezifische entzündungsbedingte Lymphknoten meist eine geringe Anreicherung. Lymphknotenvergößerungen aufgrund einer Sarkoidose oder anderer maligner Erkrankungen zeigen eine hohe ^{11}C-Cholinaufnahme und können allein mit dem ^{11}C-Cholin-PET nicht differenziert werden.

Mikrometastasen können mit der heutigen Technik von keiner Bildgebung, das ^{11}C-Cholin-PET eingeschlossen, suffizient erkannt werden.

Lokalrezidive zeigen in den meisten Fällen eine PSA-abhängige erhöhte Aufnahme von ^{11}C-Cholin. Bei Patientin mit PSA < 1,0 ng/ml ist die Detektionsrate 50- 66%, bei einem PSA < 0,5 ng/ml sollte die Entscheidung zum ^{11}C-Cholin-PET individuell erfolgen, gegebenenfalls mit zusätzlichem Kontrastmittel- MRT.

Trotz aller Schwierigkeiten besitzt die Tumordiagnostik des PCas mittels ^{11}C-Cholin eine Sensitivität von 81% und Spezifität von 87% und ist somit aktuell das beste diagnostische Instrument im Hinblick auf die Diagnose PCa. Heute wird hauptsächlich ^{8}F-Cholin aufgrund besserer Verfügbarkeit verwendet.[28]

1.4.5. Acetat –PET/CT

Als weiterer möglicher Tracer in der urologischen Onkologie wurde auch ^{11}C-Acetat etabliert.[67] Acetat ist ein Produkt der β-Oxidation und biologische Vorstufe

von Aminosäuren und Sterol. Acetat wird in Tumorzellen als Substrat für die Fettsäurebiosynthese durch die Fettsäuresynthase (FAS) verwendet. Hier dient Acetat als Vorläufer für Acetyl-Coenzym A, welches durch die Acetyl-CoA-Carboxylase zu Malonyl-CoA umgewandelt wird. Somit kann Acetat als Vorläufer der Cholersterolsynthese bezeichnet werden. Die hohe Expression von FAS und die stark erhöhte Fettsäurebiosynthese in der Prostata zeigen sich im Umbau von ^{11}C-Acetat. Dies erklärt den vermutlich zugrunde liegende Mechanismus für die hohe Aufnahme des Substrats Acetat. Untergeordnete Rolle für die Acetataufnahme in Tumorzellen spielt vermutlich der Zitratzyklus (TCA).[9,21] Acetat kann als Acetyl- CoA die Ausgangssubstanz für den Zitratzyklus und somit die Produktion von ATP darstellen *(Abb. 4).*

Bei einem Vergleich von ^{11}C-Acetat und ^{11}C-Cholin PET zur Darstellung des Prostatakarzinoms zeigte sich eine höhere ^{11}C-Cholin- Aufnahme in Leber und Nierenparenchym. Die Aufnahmeaktivitäten im Tumorbereich zeigten individuell starke Abweichungen.[38] Beide Tracer stellten sich gleich stark im Nachweis von Skelettläsionen, Lymphknotenmetastasen und Primärtumoren dar. Die Aufnahme beider Radiotracer beim Prostatakarzinom und seinen Metastasen ist nahezu identisch, keiner zeigte sich dem Anderen gegenüber klar überlegen. Derzeit können beide Radiotracer die Therapieplanung durch den Nachweis von Lokalrezidiven, Lymphknoten- oder Skelettmetastasen beeinflussen.[19]

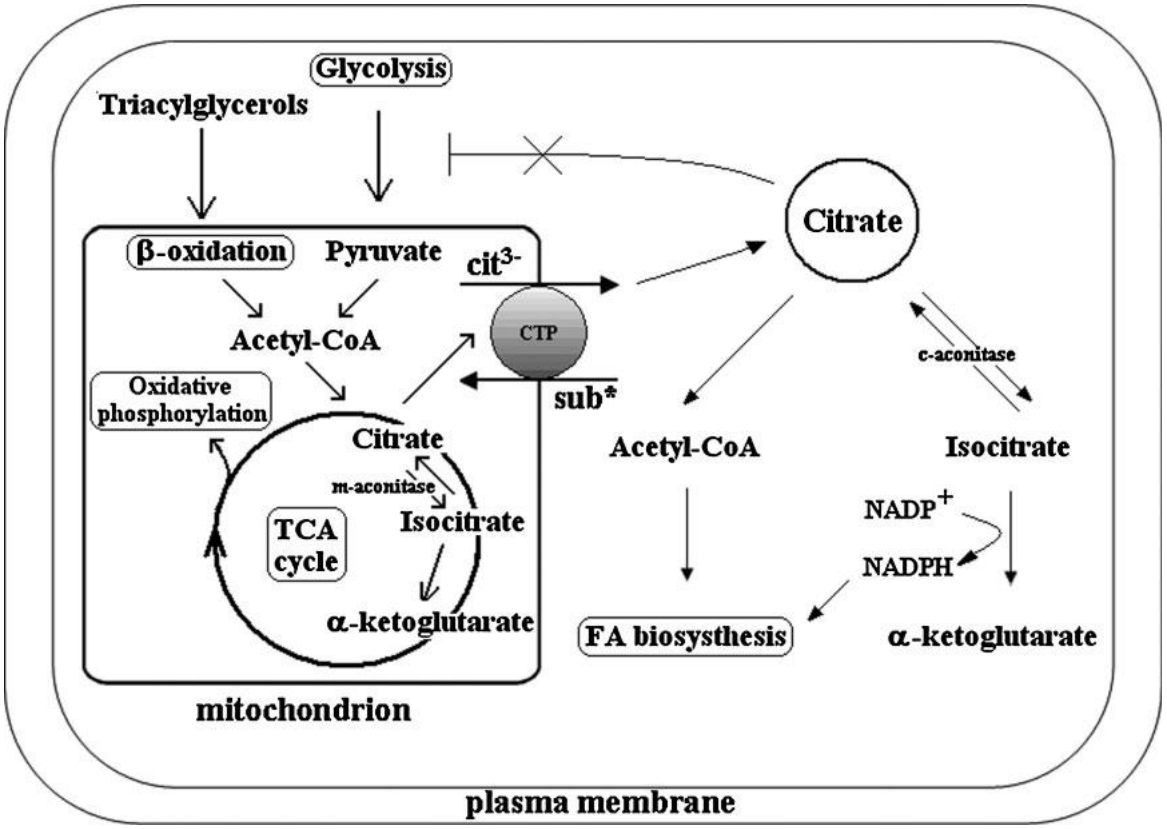


Abb 4. : *Schematische Darstellung einer Zelle mit den verschiedenen Komponenten des Citratzyklus (TCA). Der Citratzyklus interagiert mit der mitochondrialen Membran. Zum Transport des Citrats aus dem Mitochondrium ins Plasma dient das Citrattransportprotein (CTP). Das Citrat kann wie aus der Abbildung ersichtlich in verschiedenen metabolischen Wegen weiterbenutzt werden. Die kreuzende Linie gibt den inhibitorischen Effekt des Citrats auf die Glykolyse wieder. FA= Fettsäuren*[65]

1.4.6. MRT

Mit einer endorektal platzierten Spule in einer Ganzkörper- MRT kann die Lokalisation eines Primärtumors im Becken ebenfalls dargestellt werden. Mit dieser Technik lassen sich die anatomischen Gegebenheiten, die zonalen Schichten der Prostata, gut abgrenzen. Insbesondere die Infiltration der Kapsel, Samenblasen oder des neurovaskulären Bündels lassen sich gut beurteilen. Das MRT mit Kontrastmittel kann hilfreich zur Therapieplanung und Entscheidung über das operative Vorgehen sein. Der Lymphknotenstatus ist hier allerdings nur suboptimal zu beurteilen.[12,34]

1.5. Therapie

Bei sehr kleinen Tumoren mit prognostisch günstigem feingeweblichem Aufbau ohne Überschreitung der Organgrenze ist eine abwartende Haltung möglich („wait-and-see“). Bei lokal begrenzten Tumoren mit niedrig- gradigem Gleason-Score bleibt die Mortalitätsrate nach 15 Jahren immer noch konstant, weshalb in diesem Fall oft zum Abwarten geraten wird.[38]

Für die effektive Behandlung des Prostatakarzinoms stehen mehrere Verfahren zur Verfügung:

- Operation (radikale Prostataektomie = komplette Entfernung der Prostata) - Seed-Implantation (minimal-invasive Einbringung von radioaktiven ^{125}Jod Strahlern in die Prostata)
- Bestrahlung von außen (externe Radiotherapie)
- Hormontherapie
- Chemotherapie[10]

Die Prognose beim Prostatakarzinom ist multifaktoriell bedingt, sie hängt natürlich von der Konstitution des Patienten, von dem feingeweblichen Aufbau und der Ausbreitung des Tumors ab.

Die 5-Jahresüberlebensrate liegt ungefähr bei 74-80%, wenn der Tumor auf die Prostata begrenzt ist, und bei 40%, wenn er bereits gestreut hat.[21,4]

1.6. Fettsäuremetabolismus

Vor der Aufnahme in die Zellen müssen die extrazellulär vorliegenden Triacylglycerine durch die Lipoproteinlipase zu Fettsäuren und Glycerin gespalten werden. Das Enzym befindet sich auf der Außenseite der Membranoberfläche, quantitativ am häufigsten an den Epithelzellen der Kapillaren. In der extrazellulären Flüssigkeit liegen die Fettsäuren meist als Komplex mit Albumin vor. Zur Passage der Membran gibt es mehrere Mechanismen, neben der einfachen Diffusion stellen spezifische Carrier, die FATP-Proteine einen Transportmechanismus dar.[39] Diese Carrierfamilie umfasst 6 verschiedene Formen und ist ähnlich den Glucosetransportern gewebespezifisch verteilt.[40] Besonders hohe Mengen an Fettsäuren werden von den Adipozyten

aufgenommen, um diese als Triglyceride zu speichern. Die gespeicherten Triglyceride können in Mangelzeiten durch die hormonsensitive Lipase zu Fettsäuren und Glycerin gespalten werden, dies bezeichnet man als Lipolyse. Insbesondere das Herz, aber auch Skelettmuskel und andere Organe außer dem Gehirn können Fettsäuren zur Deckung ihres Energiebedarfs verstoffwechseln.[41]

1.6.1. Fettsäurebiosynthese

Bei Mangel an Fettsäuren im Körper, zum Beispiel Fasten oder Hunger schaltet der Körper auf den Verdau von Fettsäuren um. Diese werden durch Lipolyse von Triglyceriden aus den Adipozyten zur Verfügung gestellt. Der Körper kann auch bei länger bestehender Nahrungsknappheit auf eine Fettsäurebiosynthese zurückgreifen.

Die Fettsäurebiosynthese findet in Abhängigkeit von CO_2 im Zytosol statt. Für die Kondensation der Acetylreste an der wachsenden Fettsäurekette wird Malonyl-CoA verwendet. Die Carboxylierungsreaktion von Acetyl–CoA zu Malonyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) biotinabhängig und unter Verbrauch von einem ATP katalysiert. Dieses Enzym ist das Schrittmacherenzym der gesamten Fettsäuresynthese. Zur Synthese von 1 mol Palmitat, dem hauptsächlichen Endprodukt dieser Reaktion, werden 7 mol Malonyl-CoA gebraucht. Die zur Fettsäuresynthese aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA notwendigen Reaktionen werden durch den dimeren Multienzymkomplex der Fettsäuresynthase (FAS) katalysiert *(Abb.5)*.[42]

Ein Acetylrest des Startermoleküls Acetyl-CoA bindet an die zentrale Sulfhydrylgruppe, dieser wird dann auf die periphere Sufhydrylgruppe übertragen. Die frei gewordene zentrale SH-Gruppe übernimmt einen Malonylrest vom Malonyl-CoA, dies wird durch die Malonyl-/ Acetyltransferase Domäne MAT katalysiert. Eine weitere Domäne, die Ketoacyl-Synthase Domäne katalysiert die Kondensation des Acetyl- mit dem Malonylrest, wobei unter Decarboxylierung an der zentralen SH-Gruppe ein Acetacetylrest entsteht. Weiterhin bleibt dieser Rest als Thioester an dieser Stelle gebunden. Die nachfolgende Reduktion ist eine $NADPH/H^+$ abhängige Reaktion zum D-β-Hydroxybutyrylrest, dieser Schritt erfolgt durch die β-Ketoacylenzym-Reduktase Domäne. Durch die Dehydratase Domäne wird ein Δ^2- Enoylrest erzeugt. Die zweite Reduktion, ebenfalls NADPH/H+

abhängig wandelt dies in einen gesättigten Acylrest um. Anschließend wir der Acylrest von der zentralen auf die periphere SH- Gruppe übertragen und der nächste Zyklus beginnt.[43,44]

Die Ausgangsstoffe für die Biosynthese von Fettsäuren entstammen hauptsächlich aus dem Glucosestoffwechsel, der Glycolyse. $NADPH/H^+$ entsteht bei dem oxidativen Abbau von Glucose über den Hexosemonophosphatweg. Da beide Reaktionen im Zytosol ablaufen, müssen für die Bereitstellung von $NADPH/H^+$ hier keine Permeabilitätshürden überwunden werden. Das ebenfalls im Zytosol befindliche Malatenzym decarboxyliert Malat zu Pyruvat. Da das extramitochondriale Malat aus Oxalacetat stammt, gibt dieses Zusammenspiel eine Wasserstoffübertragung von $NADPH/H^+$ auf $NADP^+$.

Die Kohlenstoffquelle für die Biosynthese entsteht durch Decarboxylierung von Pyruvat mittels Pyruvatdehydrogenase, dieses Enzym befindet sich allerdings intramitochondrial. Um Acetyl-CoA aus dem Mitochondrium wieder in das Zytosol zu transportieren muss der Umweg einer Reaktion mit Oxalacetat zu Citrat durch die Citratsynthase gegangen werden *(Abb.4).*[35]

Im Zytosol wird dann Citrat durch die ATP-Citratlyase wieder in Acetyl-CoA und Oxalacetat umgewandelt.[45]

1.6.2. β-Oxidation

Bei bestehendem Überangebot an Fettsäuren, zum Beispiel bei übermäßiger Ernährung kann der Körper diese Fettsäuren einlagern in Form von Triglyceriden in den Adipozyten für Mangelzeiten oder sie verbrauchen. In Nahrungsmangelzeiten werden die Triglyceride wieder aus den Adipozyten aktiviert und ebenfalls zur Energiegewinnung genutzt. Die Verstoffwechselung von Fettsäuren findet über den Weg der β-Oxidation statt.

Fettsäuren, entstanden durch Biosynthese oder durch Nahrungsaufnahme, liegen meist im Zytosol vor. Die β-Oxidation, sowie die hierfür benötigten Enzyme sind im Mitochondrium lokalisiert. Um diesen Umstand zu überwinden gibt es ein Transportsystem, die Carnitin-Acyltranferase 1 (CAT1). Der Thioester wird an L-Carnitin gekoppelt zum Acyl- Carnitin und CoA, dieses Acyl-Carnitin kann über den Transporter Carnitin-Acylcarnitin-Translokase die mitochondriale Innenmembran passieren. Auf der Innenseite findet der umgekehrte Vorgang statt,

der Fettsäurerest des Acyl-Carnitins wird durch die Carnitin-Acyltransferase 2 auf Coenzym A übertragen, wobei Acyl-CoA und freies Carnitin entstehen.
Der Abbau von Fettsäuren erfolgt meist durch Kondensation bzw. Abspaltung von Bruchstücken aus zwei C-Atomen. Die Enzyme der β-Oxidation befinden sich in der mitochondrialen Matrix nahe den Enzymen für die Atmungskette. Um die reaktionsträgen Moleküle zu aktivieren, werden sie in einer ATP-abhängigen Reaktion mittels Acyl-CoA-Synthase zu Acyl-CoA umgewandelt. Durch die Acyl-CoA Dehydrogenase wird Acyl-CoA dehydriert, der entstehende Wasserstoff wird auf FAD übertragen. Über die Zwischenstufe eines Elektronen übertragenden Flavoproteins (ETF) gelangt dieses Endprodukt direkt gebunden an Ubichinon zur Atmungskette. Nach einigen weiteren Reaktionen entsteht als Ergebnis der Reaktion ein um 2 C-Atome verkürzter Acyl-CoA Rest und ein Acetyl-CoA.[46]

1.6.3. Regulation von Synthese und Abbau von Fettsäuren

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der β-Oxidation ist die Bildung von Acylcarnitin aus Acyl-CoA und Carnitin, mittels CAT 1. Dieser Schritt wird durch Malonyl-CoA, langkettige Fettsäuren und Schilddrüsenhormone reguliert.
Malonyl-CoA inhibiert die CAT 1, da erhöhte Malonyl-CoA Konzentrationen bei gesteigerter Fettsäuresynthese auftreten. Es wäre energetisch ineffizient gerade neu synthetisierte Fettsäuren sofort der β- Oxidation zuzuführen. Langkettige Fettsäuren steigern die Expression der CAT 1 über die Aktivierung des Transkriptionsfaktor Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ). Dies ist ein allosterischer Effekt, da langkettige Fettsäuren Ausgangsstoffe der β-Oxidation darstellen und ein Überangebot an diesen als Feedbackmechanismus die β-Oxidation ankurbelt.
Auch Schilddrüsenhormone induzieren eine erhöhte Expression, dies dient dem gesteigerten Energiebedarf bei erhöhter Schilddrüsenfunktion.[47]

Die Fettsäurebiosynthese wird auf mehreren Stufen reguliert, zum einen durch die Pyruvatdehydrogenase und zum anderen durch die ACC und die FAS.
Bei fettarmer Ernährung findet in erhöhtem Maße eine Fettsäurebiosynthese aus Glucose statt. Hierfür muss das aus der Glycolyse entstandene Pyruvat durch die Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA dehydrierend decarboxyliert werden. Insulin

spielt hier eine entscheidende Rolle, es beschleunigt den Glucosetransport in die Fettzellen und erhöht dadurch das Angebot an Pyruvat als Substrat für die Pyruvatdehydrogenase. Weiterhin wird die inaktive Form der Pyruvatdehydrogenase in die aktivierte Form unter Insulineinfluss umgewandelt. Im Hungerzustand oder bei Insulinmangel findet eine erhöhte Lipolyse mittels β-Oxidation statt und dadurch eine Erhöhung des intramitochondrialen Quotienten Acetyl-CoA/CoA-SH sowie NADH/NAD+. Änderungen dieser Quotienten führen zu einer Hemmung der Pyruvatdehydrogenase.[48]

Die ACC ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Fettsäurebiosynthese. Insbesondere Citrat fördert die Umwandlung der inaktiven Form der ACC in die Aktive. Acyl-CoA als Endprodukt der Biosynthese ist ein allosterischer Inhibitor der ACC. Ebenfalls die Adenosinmonophosphat (AMP)-abhängige Proteinkinase kann die ACC phosphorysieren und sie somit inaktivieren. Dadurch wird verhindert, dass bei zellulärem Energiemangel, dieser führt zur Akkumulation von AMP, Fettsäuren synthetisiert werden. Glucose und Insulin als Zeichen von ausreichend Energie induzieren die ACC, hingegen Acyl-CoA als Zeichen eines Überangebots an synthetisierten Fettsäuren reprimiert die ACC.[42]

1.6.4. Fettsäuresynthese

Die meisten Zellen von normal proliferierenden Geweben nutzen im Blut bereitgestellte Fettsäuren für ihre Synthesezwecke. FAS liegt meist in sehr niedrigen Konzentrationen vor, die höchsten Mengen befinden sich in der Leber und im Fettgewebe. Die Zellen verwenden das Enzym FAS um Kohlenhydrate in Fettsäuren zu verwandeln und sie als Triglyceride zu speichern. Diese können im Bedarfsfall zur Energiebereitstellung mittels Betaoxidation verbraucht werden. Die de novo Fettsäuresynthese ist vor allem in der Embryogenese verbreitet und zur Surfactantherstellung in fetalen Lungen.[49] Bei Erwachsenen ist das Enzym FAS vorwiegend in hormonsensitiven Zellen, wie Endometrium oder Milchdrüsengewebe während der Laktation exprimiert, unter der Regulation von Östrogen und Progesteron.[50,18]

Die de novo Fettsäuresynthese ist von den Ernährungsbedingungen abhängig, insbesondere gefördert durch eine kohlenhydratreiche Ernährung. Vermindert wird

die Synthese durch kleine Mengen von Fettsäuren in der Nahrung oder durch Fasten *(Abb. 5).*[51,52]

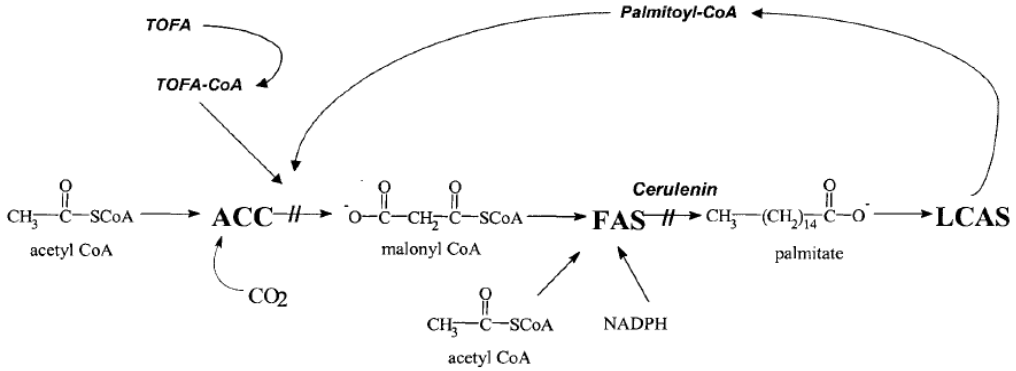


Abb.: 5 *Schematische Darstellung des Fettsäuresynthesewegs, mit den Enzymen für die Hemmung der Acetyl- CoA Carboxylase (ACC)- TOFA und der Fettsäuresynthase (FAS)- Cerulenin (Abkömmling C75).Das Endprodukt der Fettsäuresynthese Palmitat wird über die Long chain acyl- CoA synthase (LCAS) zu Palmitoyl- CoA verlängert und inhibiert ebnefalls die ACC.*[53]

1.6.5. Fettsäuresynthase (FAS) im PCa

Die FAS ist ein multifunktionales Homodimer von 250-270 kD Größe.[54] Sie liegt im Zytosol vor und dient der de novo Synthese von langkettigen Fettsäuren, mit dem Hauptziel der Synthese von Palmitinsäure. Das Enzym verwendet Acetyl-CoA und Malonyl-CoA unter Reduktion von NADPH.

Bereits Otto Warburg postulierte, beschrieben als der Warburg Effekt[55], Zellen benutzen selbst bei ausreichendem Angebot an Sauerstoff die Glykolyse und Laktat- Fermentation zur Energieerzeugung und nicht die Pyruvatverstoffwechslung im Zitratzyklus.

Beim PCa ist ebenfalls dieser Weg der Energiegewinnung beschrieben.[56]

Während der normalen Proliferation von Prostatazellen ist die FAS Expression und Aktivität niedrig und unterliegt den ernährungsbedingten Signalen.

Karzinomatös mutierte Zellen proliferieren oft ungehemmt. Erreichen die proliferierenden Zellen ihr Limit für die Diffusion werden sie hypoxisch, eine ausreichende Angiogenese findet nicht statt, um das Defizit an Sauerstoff und Nährstoffen auszugleichen. Bereits bei in situ Karzinomen entwickelt sich ein hypoxisches Umfeld. Die hypoxischen Bedingungen mit ausgeprägter Laktatproduktion durch Glykolyse bedingen eine Hemmung der Atmungskette, dies führt zu niedrigerem Vorhandensein von Oxidationsenergie.[56,57,58]

Die Zellen können entweder der Apoptose unterliegen oder sich anpassen und durch anaerobe Glykolyse Energie gewinnen, wodurch sie überleben können. In diesem Stadium nehmen Zellen auch einen lipolytischen Phänotyp an, um Oxidationsenergie zu erzeugen.[59] Das Endprodukt der Glykolyse, das Pyruvat, kann gleich der Fettsäuresynthese als Ausgangssubstrat dienen. Dies ermöglicht der FAS Komplex. Als Konsequenz dieser ausgedehnten Glykolyse wird die Umgebung der Zellen azidotisch. Da die vermehrte Expression der FAS eine Resistenz gegen säureinduzierte Apoptose bietet, wird die FAS-Expression gesteigert. Während der weiteren Tumorentwicklung nehmen die Mutationen im Genom zu. Die Aktivierung von Regulationskaskaden zur Steigerung der FAS als Antwort auf frühe krebsinduzierte Veränderungen resultieren in einer Überexpression und Hyperaktivität der FAS. Dies bietet dem Tumor einen Proliferationsvorteil, indem die hypoxischen und azidotischen Bedingungen überwunden werden können.[57,58,60] Zellpopulationen mit diesem Evolutionsprogramm haben einen großen Wachstumsvorteil und können eher metastasieren. *(Abb. 6)*[56]

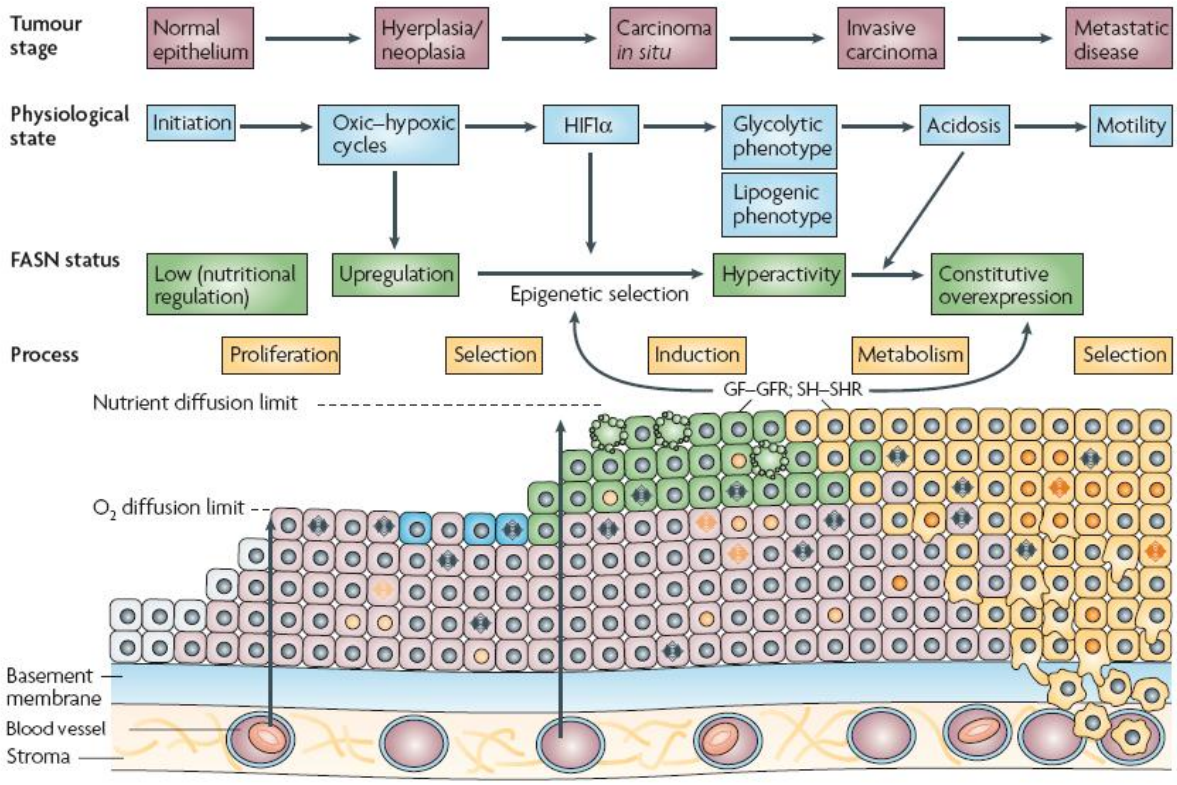


Abb 6 Der lipogenische Phänotyp und Zellumgebungsreaktionen bei der Karzinogenese. Normale (grau) Epithelzellen werden hyperproliferativ (pink) nach der Induktion der Proliferation. In diesem Stadium bleibt die Fettsäuresynthese (FAS) Expression und Aktivität niedrig, den allosterischen nutritiven Signalen folgend. Sobald die Zellen die Proliferationsgrenze für die Sauerstoffdiffusion erreichen, werden hypoxisch (blau), dies führt entweder direkt zum Zelltod oder über Adaption zu glykolytischem Phänotyp (grün), welcher das Überleben ermöglicht. Im Stadium des glykolytischen Stoffwechsels adaptiert sich die Zelle ebenfalls an den lipogenischen Phänotyp aufgrund des größeren Bedürfnisses nach Oxidationsenergie. Der Fettsäurebiosyntheseweg über FAS stellt Reduktionsäquvalente, wie z.B. NADPH bereit. Als Nebeneffekt der gesteigerten Glykolyse wird die Umgebung azid. Hieraus resultieren weitere DNA- Schäden (orangene Kerne). Die weitere Steigerung des FAS- Stoffwechselwegs führt zur verstärkten Expression und Aktivität der FAS. (GF- growth factor, GFR- growth factor receptor, SH- steroidhormone, SHR- steroidhormonereceptor, HIF1α- Hypoxia- induced factor 1α)[56]

Die Fettsäuresynthase wird durch zahlreiche Faktoren reguliert, z.B. Insulin ist zusammen mit Glucose ein starker Induktor der FAS. Hierbei ist das Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c (SREBP-1c) beteiligt. Dies erklärt die starke Zunahme der Fettsäurebiosynthese bei kohlenhydratreicher Ernährung. Hingegen Hormone, wie zum Beispiel Katecholamine oder Glucagon, die zur Steigerung der cAMP führen, reprimieren die Expression von FAS. Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind ebenfalls starke allosterische Repressoren. Die Aktivität von FAS wird weiterhin induziert durch Androgene, Insulin-like growth factor und Trijodthyronine.[61]

Interessanterweise gehen Zellen durch Hemmung des FAS- Gens durch RNA interference-mediated silencing oder chemische Inhibitoren in die Apoptose und können durch überphysiologische Mengen an Fettsäuren, wie Ölsäure oder Palmitinsäure davor geschützt werden. Diese Beobachtung legt nahe, dass Tumorzellen von erhöhten FAS Konzentrationen abhängig sind in Bezug auf Überleben und Proliferation.[62,59]

Ein Beispiel für einen chemischen Inhibitor der FAS ist C75, ein Derivat von Cerulin. Auch eine Hemmung der ACC ist möglich mittels TOFA. [63]

Die Inhibierung der Regulation durch exogene Fette und körpereigene Hormone muss zur Steigerung der Fettsäuresynthase und der anderen ebenfalls für diesen Weg benötigten Enzyme erfolgen.

FAS ist schon in intraepithelialen Neoplasien überexprimiert, verglichen mit normalem Gewebe. Hieraus lässt sich schließen, dass FAS bereits in sehr frühen Phasen der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielt. Somit ist Steigerung der FAS-Expression ein Mediator für die biologische Aggressivität. Ein Viertel der menschlichen Prostatakarzinome geht mit Veränderungen des FAS Gens einher.[64]

1.6.5. Inhibitoren der FAS

Der Inhibitor Cerulenin ist ein natürlich vorkommendes Antibiotikum aus dem Pilz Cephalosporium ceruleans und ein Breitspektrumhemmer der FAS. Cerulenin induziert Apoptose in Krebszellen ohne die normalen Zellen zu schädigen. Die Einnahme von Cerulenin führt zu drastischer Gewichtsabnahme über die Hemmung von Neurotransmittern im Hypothalamus, bis hin zur Anorexie, diese ist Leptin unabhängig.[52] Cerulenin hat 2 entscheidende Nachteile, es ist nicht wasserlöslich und hat eine hochreaktive Epoxid- Gruppe, welche die Proteinacylation hemmt.[65]

Als neues Derivat ohne oben beschriebene Nachteile wurde C75 (α-methylene-γ-butyrolactone) entwickelt, mit Strukturähnlichkeit zu den eigentlichen Substraten der FAS, wie Malonyl- CoA, Acetyl- CoA und NADPH. C75 bindet an die β-Ketoacylsynthase, diese ist Teil der FAS und fusioniert Acetyl- CoA und Malonyl-CoA. C75 inaktiviert, im Gegensatz zu Cerulenin, zusätzlich die Enoylreduktase und Thioesterase. Die induzierte Anorexie wird durch die Malonyl-CoA Hypothese

erklärt. Dieser Hypothese zu folge ist die vermehrte Ansammlung von Malonyl-CoA im Hypothalamus für die Anorexie ausschlaggebend. Die Akkumulation von Malonyl- CoA wird von Neuronen, welche die Nahrungsaufnahme regulieren, registriert und führt zur Anorexie. Doch der Gewichtsverlust entsteht nicht nur aufgrund der reduzierten Nahrungsaufnahme, weiterhin stimuliert C75 die Carnitin- Palmitoyltransferase 1 (CPT1) und steigert die Verbrennung von weißem Fettgewebe.[66]

TOFA (5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid) hemmt die Fettsäuresynthese kompetitiv durch Inhibition der ACC, dem Enzym welches die Synthese des Malonyl-CoA antreibt. Bei Anwendung in der Zellkultur ist im Gegensatz zur Anwendung von C75 keine Zytotoxität beschrieben. Die Zugabe von TOFA zur Zellkultur vor Inkubation mit C75 führt zur Negierung der Zytotoxität des C75, hier entsteht im Tiermodell keine Anorexie.
Dies beruht darauf, dass hier Malonyl-CoA nicht produziert wird und somit auch keine Akkumulation des Malonyl-CoA durch C75 hervorgerufen wird.
Ein weiterer Faktor für die zytotoxische Wirkung des C75 liegt in der Aktivierung der CTP1 an der äußeren Mitochondrienmembran und die Zellen unterliegen der Apoptose während der S-Phase des Zellzyklus. Eine vorherige Inkubation mit TOFA verhindert diese Apoptose.[67,68]

1.7. Zielsetzung

Die diagnostischen Möglichkeiten zur Detektion des Prostatakarzinoms sind vielfältig und mit einer hohen Sensitivität und Spezifität zufriedenstellend. Doch es gibt einige Lücken, so z.B. die Unterscheidung zur BPH oder Prostatitiden. Weiterhin erlauben die Techniken keine Detektion einer PIN oder eines PCas mit niedrigem Gleason Score. Da auch klinische Beschwerden erst ab einer deutlichen Größenzunahme eintreten, werden viele PCas erst in späteren Stadien entdeckt. Da die Therapie bei frühzeitigem Beginn durchaus vielversprechend ist, wäre dies Ziel weiterer Forschung. Prostatakarzinomzellen stellen ihren Stoffwechsel sehr früh in der Entwicklung des Karzinoms auf eine gesteigerte Fettsäurebiosynthese um. Die Überexpression von FAS, dem Hauptenzym der Fettsäure de novo Synthese ist bereits in der PIN deutlich gesteigert. Radioaktiv markierte Fettsäuren wurden in Hinblick auf ihre Verstoffwechslung in den verschiedenen malignen und benignen Zellen untersucht. Zum Nachweis des Einbaus der Fettsäuren z.B. in Membranen wurden die Zelllinien des PCas, eine benigne Zelllinie aus der Prostata, eine Zelllinie verwendet, welche aus der benignen Prostatahyperplasie gewonnen wurden, sowie primäre Prostataepithelzellen. Für eventuell anschließende Mausversuche und auch die Vergleichbarkeit der zellulären Verhaltensweise zwischen humanen und murinen Zelllinien, wurde noch eine weitere, murine Zelllinie TRAMP bei den Versuchen mitgeführt. Es wurden die Grundlagen der Fettsäurebiosynthese im Prostatakarzinom, insbesondere die FAS als vielversprechendes Ziel dieser Versuche, untersucht.

Mit Blick auf die Zukunft sollen diese Grundlagen zu einer neuen diagnostischen Methode zur Detektion des Prostatakarzinoms mit besseren Möglickeiten der Unterscheidung zu den benignen Formen der Prostataveränderung führen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Adenin	Sigma
Agarose	Lonza
Biotin	Sigma
Bradfordlösung	Thermo Scientific
C75	Sigma
Chloroform	Merck
DAB	Sigma
DMSO	Sigma
DNA-Marker	Fermentas
Dual Color Proteinmarker	Biorad
EDTA	Roth
Eosin	Roth
Ethanol	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma
FFA	Sigma
FKS	biochrom
GAPDH	Ambion
Glutamin	biochrom
Glyceringelantine	Merck
Hämalaun	Roth
HCL	Merck
Hepes-buffer	Lonza
Höchst 33342	Invitrogen
Insulin	Sigma
Kieselgelplatten MTPLC 40 W	Merck
Kodak NTB	Sigma
Laemli- Puffer	Biorad

H_2O_2	J.T.Baker
Isotypkontrolle	dianova
Mercaptomethanol	Sigma
Merrettich-Peroxidase	Dako
Methanol	Sigma
Milchpulver	Roth
Myrestinsäure [^{14}C]	Hartmann Alalytic
NaCl	AppliChem
NaOH	Merck
NEA	biochrom
nuklease-free water	Ambion
Palmitinsäure [^{14}C]	Hartmann Alalytic
PBS	biochrom
PenStrep	Gibco
PFA	Roth
RIPA	Mbiotech
Sodiumpyruvat	biochrom
TBS	biorad
Testosteron	Sigma
Trijodthyronin	Sigma
TRIReagent®	Sigma
Tris	USB
Tris/Glycerine/SDS Buffer	Biorad
TritonX	Sigma
Transferin	Sigma
Trypanblau	Fluka
Trypsin	biochrom
Tween20	Sigma
Ultima gold	Perkin Elmer
Xylol	prolabo
Zitronensäure	Roth

2.1.2. Lösungen und Puffer

Blockierungs- Puffer	5 % Milchpulver (10 g/ 200 ml) 0,1 % Tween20 in TBS
Blotting- Puffer	100 ml 10 x Puffer (Biorad, TRIS/Glycin) 200 ml Methanol 700 ml aqua dest.
Elektrophorese Puffer	TRIS/Glycin/SDS (Biorad) 1:10 mit aqua dest. verdünnt
Lysispuffer (RIPA Puffer)	50 mM TRIS-HCL pH 7,4 300 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP- 40 1 mM PMSF Inhibitor-Cocktail
PFA	4 %, 4 g/100 ml PBS
TBE (1- fach)	10,8 g (89 mM) TRIS Base 5,5 g (89 mM) Borsäure 0,7 g (2 mM) EDTA auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen
TBS (10-fach)	24,23 g Trizma HCL 80,06g NaCl In 800 ml dest. Wasser pH mit HCL auf 7,6 einstellen und auf 1l mit dest. Wasser auffüllen

TBST	100 ml TBS 10 x 900 ml ultra pure water 1 ml Tween20

2.1.3. Kulturmedien

K-SFM	Lonza
RPMI 1640	biochrom
T-Medium	Lonza
Ham´s	biochrom

2.1.4. Zelllinien

In den Versuchen kamen als maligne Zelllinien LNCaP aus Lymphknotenmetastasen des PCas, (androgenabhängig), LNCaP-C4-2 als Subzelllinie von LNCaP (androgenunabhängig) und mit deutlich höherem Malignitätsgrad, DU145 aus Dura mater Metastasen und PC3 aus Knochenmetastasen des PCas (androgenabhängig) zur Verwendung. Alle malignen Zelllinien sind immortalisiert. Als benigne Kontrolle dienten immortalisierte RWPE Zellen aus der normalen Prostata, immortalisierte BPH-1 Zellen aus der benignen Prostatahyperplasie und primäre Prostataepithelzellen (nicht immortalisiert). Dies stellte ein adäquates in vitro- Modell dar. Zusätzlich wurde eine murine Zelllinie TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma oft the Mouse Prostate) mitgeführt, um Diskrepanzen zwischen murinen und humanen Versuchen in vitro aufweisen zu können.[69]

Tabelle 1: verwendete Zelllinien

Name	Morphologie	Ursprung
LnCaP	adhärent	DMSZ
LnCaP-C4-2	adhärent	ViroMed
PC3	adhärent	DMSZ
DU 145	adhärent	DMSZ
RWPE	adhärent	Lonza
BPH- 1	adhärent	Lonza
PrEc	adhärent	Lonza
TRAMP	adhärent	generiert bei uns

2.1.5. Enzyme und Antikörper

Rabbit polyclonal to FAS	cell signalling
Cy 3 goat anti-rabbit	dianova
GAPDH	ambion
Isotypkontrolle	dianova
RETROscript® KIT	Ambion
SuperTaq™ DNA Polymerase	Ambion
Ziege anti-mouse IgG	dianova

2.1.6. Instrumente

Biofuge fresco	Heraeus
Criterion Cell	biorad
Cobra II Auto- Gamma	Perkin Elmer
Gyro Rocker SSL3	Stuart
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Sub cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems	Biorad
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad

Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer
UV-Transilluminator	Biostep, Jahnsdorf

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren wurden die Zellen sedimentiert und in 1 ml eiskaltem FKS/ 10 % Dimethylsufoxyd (DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort in gekühlte Kryokonservierungsgefäße (1,8 ml) überführt und auf Trockeneis heruntergekühlt, die Proben wurden dann bei -80 °C gelagert. Durch die Lagerung auf Trockeneis wurde eine schonende Abkühlung von 1 °C/ min gewährleistet.
Um kryokonservierte Zellen in Kultur aufzunehmen, wurden die Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in FKS aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert, der DMSO- enthaltende Überstand wurde vollständig entfernt, bevor die Zellen in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in Kultur genommen wurden.

2.2.2. Umsetzen der Zelllinien

Die Zelllinien LNCaP, LNCaP-C4-2, PC3, DU145, TRAMP, BPH-1 wurden zweimalig die Woche mit 10 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin abgelöst und in 10 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Hiernach wurde in einem bestimmten Verhältnis die Zelllinie gesplittet und in neue 75 cm^2 Kulturflaschen überführt *(Tabelle 2).*
Die Zelllinie PrEc wurde in 10 ml Hepes Buffer gewaschen mit 2 ml Typsin/EDTA abgelöst und erneut in 10ml Hepes Buffer aufgenommen. Hiernach folgte die Zentrifugation bei 500 rpm, 5 min, 4 °C, der Überstand wurde verworfen und das Pellet 1:2 gesplittet auf 2 neue Kulturflachen überführt und in Medium aufgenommen. Die RWPE Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin abgelöst und dann in 10 ml PBS mit 2% FKS resuspendiert, zur Inaktivierung des Trypsins. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 500 rpm, 10 min, 4 °C, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 24 ml

Keratinozytenserum mit 10% FKS aufgenommen und gut resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf 2 neue Kulturflaschen aufgeteilt.

Tabelle 2: *Umsetzbedingungen der Zelllinien und PrEc (FBS- fetal bovine serum, P/S- 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, IST- 5µg/ml Insulin + 5µg/ml Transferrin + 5ng/ml Sodiumselenit,K-SFM- Keratinocyte-serum free medium, BPE- bovine pituitary extract, EGF- epidermal growth factor, Glu/NEAA/So L-Glutamat, Nicht-essentielle Aminosäuren, Natrium-Pyruvat)*

Zelllinie	Ablösen der Zellen	Medium	Splittverhältnis
LNCaP	2 ml Trypsin, 2 min	90% (v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) FBS, P/S 1% (v/v) Glu/NEA/So	1:3 – 1:4
DU 145	2 ml Trypsin, 2 min	90% (v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) FBS, P/S Glu/NEA/So	1:4 – 1:8
PC3	2 ml Trypsin, 2 min	45% (v/v) Ham's F12, 45% (v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) FBS, P/S 1% (v/v) Glu/NEA/So	1:3 – 1:4
LNCaP-C4-2	2 ml Trypsin, 2 min	80% (v/v) T-medium, 20% (v/v) FBS, P/S	1:4 – 1:6
TRAMP	2 ml Trypsin, 10 min	90% (v/v) DMEM, 10% (v/v) FBS, 10^{-8} mol/l Testosteron, P/S	1:2
RWPE	2 ml Trypsin, 5 min	K-SFM (50 mg/ml BPE, 5 ng/ml EGF zugegeben), P/S	1:2
BPH-1	2 ml Trypsin, 10 min	80% (v/v) RPMI 1640, 20% (v/v) FBS, P/S, 1% (v/v) Glu/NEA/So, ITS,	1:3
PrEc	2 ml Trypsin, 10 min, 10 ml Hepes-Buffer	KFM (BPE, Hydrocortisone, EGF, Epinephrine, Transferrin, Insulin, Retinoic Acid, Triiodothyronine, GA-1000 zugegeben)	1:2

2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Abtrypsinierte Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 90 µl Trypanblau gemischt, um beim Zählen der Zellen in der Neubauer- Zählkammer tote Zellen ausschließen zu können. Die lebenden Zellen in allen 4 Großquadranten wurden gezählt und die mittlere Zellzahl bestimmt. Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurde folgende Formel angewandt: mittlere Zellzahl x Verdünnungsfaktor x 10^4.

2.2.4. Zelluläre Aufnahme

Die zelluläre Aufnahme von Radiofettsäuren diente dem Nachweis der Akkumulation der entsprechenden Fettsäure in die Zellen. Analoge Versuche wurden unter der Hemmung der FAS durch den Inhibitor C75 durchgeführt.
Pro Ansatz wurden die Zellen 2x 10^5 Zellen pro Ansatz 24 Stunden vor dem Versuchsbeginn ausplattiert. Eine Stunde vor Zugabe der radioaktiv markierten Fettsäure wurden die Zellen in fettfreies Albumin-haltiges Medium aufgenommen (3 µg pro well). Für die Inhibitionsstudie wurden die Zellen mit C75 (5 ng pro well) für 18 Stunden vor Zugabe mit 20 kBq ^{14}C- Palmitinsäure, ^{14}C Myrestinsäure, ^{3}H-Acetat oder ^{11}C-Cholin pro Ansatz inkubiert. Die aufgenommene Aktivität wurde mittels GammaCounter nach zwei und vierundzwanzig Stunden gemessen. Für die Gesamtaktivitätsbilanz wurde das Medium, beide Waschschritte mit PBS, sowie das Zelllysat in 1 ml 1 M NaOH und ein weiterer Waschritt gemessen.
Alle Messdaten wurden auf die Zugabeaktivität bezogen und in % ID pro ausplattierte Zellzahl dargestellt.
Die Experimente zu den Aufnahmeversuchen wurden dreimalig durchgeführt.
Die statistische Auswertung erfolgte mit Exel. Die Mittelwerte (Σ) und die Standardabweichung (σ) wurden ermittelt. Hiernach wurden die malignen mit den benignen Zelllinien auf signifikante Unterschiede mittels t-Test untersucht. Es wurde von unabhängigen, normalverteilten Zelllinien ausgegangen und ein 2seitiger Test durchgeführt. Die Nullhypothese, es gibt keinen Unterschied zwischen den Zelllinien wurde bei einem p-Wert (p) unter 0,05 abgelehnt.

2.2.5. Lipidextraktion aus Zellen nach Folch

Die Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn ausplattiert, dann mit 20 kBq ^{14}C- Palmitinsäure versetzt. Nach jeweils 2 und 24 Stunden wurden die Zellen abtrypsiniert und für 10 min bei 4 °C und 1500 rpm zentrifugiert. Danach erfolgten 2 Waschschritte mit PBS. Hiernach wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen, mit 4 ml Methanol und 2 ml Chloroform vermischt. Ein weiteres Mal wurde 5 min zentrifugiert bei 4000 rpm und 4 °C. Der hierbei entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 50 mM Zitronensäure, 2 ml destilliertem Wasser und 1 ml Chloroform aufgenommen. Hierbei entstanden 2 Phasen. Durch 20 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und Raumtemperatur bildeten sich 3 Phasen aus. Die oberste Phase wurde verworfen, diese enthielt die Nicht-Lipidbestandteile in einem hydrophilen Methanol/Wassergemisch. Nach zweimaligem Vorspülen der Pipette mit Chloroform wurde durch die mittlere Phase hindurch die untere Phase in ein neues Röhrchen überführt. Die Interphase enthielt Zellbestandteile. Die untere Phase enthielt das Chloroform/Lipidgemisch. Die Probe wurde unter strömendem Argon für 4 Stunden evaporiert. Anschließend wurde der Rückstand mit 50 µl Methanol/ Chloroform 1:2 gelöst. Das Zellpellet wurde in 1 ml AD aufgenommen und mit einem Handhomogenisator homogenisiert. Davon wurden 100 µl abgenommen und für Szintilatormessung mit 900 µl PBS und 10 ml Szintilatorpuffer gemischt. Dem restlichen Homogenat wurden 3 ml $CHCL_3$ und MeOH im Verhältnis 1:2 zugegeben, weiterhin noch 1 ml $CHCL_3$ und 1 ml AD. Infolge einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur und 1500 rpm entstanden 2 Phasen. Die untere Phase wurde abgezogen und hiervon wieder 100 µl für die Szintilatormessung abgenommen. Der Rest der unteren Phase wurde unter Argon evaporiert. Aus der oberen Phase wurden ebenfalls 100 µl abgenommen und der Szintilatormessung zugeführt. Den unter Argon evaporierten Proben wurde jeweils 500 µl Chloroform zugegeben und gevortext. Diese Proben wurden der Dünnschichtchromatographie zugeführt.

2.2.6. Dünnschichtchromatographie

Die evaporierten Proben wurden tropfenweise auf der Startlinie der Kieselgelplatten MTPLC- Platten 40 W (Merck) aufgetragen. Nach dem Trocknen

der Proben auf der Platte wurden diese in eine Chromatographie- Kammer gestellt, die etwas Laufmittel enthält. Angesogen von den Kapillarkräften wanderte das Laufmittel auf der Platte hoch. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Probesubstanzen wurde von ihrer Verteilung zwischen stationärer Phase (hydrophilem Kieselgel) und mobiler Phase (hydrophobem Laufmittel) bestimmt. Für die Seperation der Lipidfraktionen wurden verschiedene Laufmittel verwendet, ein polares und ein unpolares, um polare und unpolare Fraktionen auftrennen zu können. Bei dem unpolarem Laufmittel entstand eine Phospholipidfraktion, das Laufmittel bestand aus Chloroform 100 ml und Methanol 50 ml, Essigsäure 16 ml und 0,9 % NaCl 4 ml. Das polare Laufmittel trennte die Lipide in Palmitat, Triglyceride, Cholesterin und Palmitinsäure, hierfür wurde Petroleumether 15 ml und Aceton 1 ml verwendet.

2.2.7. Zelllysate

Für die Herstellung der Zelllysate wurden die Zellen abtrypsiniert und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Pellet mit kaltem PBS gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in RIPA-Puffer (pro 75 cm^2 Flasche 1 ml) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender 20 min langer Zentrifugation bei 13000 rpm und 10 min bei 4 °C wurde der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.
Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 µl der Probe mit 90 µl Lysisbuffer und 3 ml Bradfordlösung gut vermischt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert.
Der Assay nutzt eine erstmals von Bradford et al. beschriebene Methode, die auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine basiert. Das Bradfordreagenz befindet sich vor der Reaktion mit Proteinen in der protonierten, roten kationisierten Form, bei Bindung von Protein wird die blaue anionische Form stabilisiert, welche dann photometrisch detektiert werden kann.[70]
Hiernach erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration am Tri-Carb 2800 TR (Perkin Elmer).

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Western Blot

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamide-Gelelektrophorese) ist eine überwiegend analytisch genutzte Methode zur massenabhängigen Auftrennung von Proteinen [71]. Dabei wandern SDS-beladene, weitgehend entfaltete Proteine durch ein Polyacrylamidgel, angetrieben durch ein angelegtes elektrisches Feld. Die gleichmäßige Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS, welches als Mizelle um das Protein die Ladungen abschirmt, ermöglicht eine massenabhängige Auftrennung der Proteine. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C zur Denaturierung inkubiert, hiernach erfolgte die sofortige Kühlung 1 min im Eis. Die SDS-PAGE bestand aus einem Trenngel. Ein kommerzieller, vorgefärbter Größenstandard (Dual Color Proteinmarker, biorad) wurde mitgeführt. Die Taschen wurden pro Lane mit 50 µg Protein bestückt. Die Probe wurde vor Beladen der Tasche mit Ladepuffer 1:1 gemischt und 5 % Mercaptoethanol zugefügt. An das Gel im Criterion Cell (biorad) wurde ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 60 V für 20 min angelegt. Danach wurde für weitere 2 h mit 80 V aufgetrennt. Nach Entnahme des Gels würde dieses in Blottingpuffer überführt.

Weiter wurden die Proteine von dem Gel durch einen Elektronentransfer mittels eines Semi-Dry-Blotters auf eine Polyvenylidenfluorid (PVDF)- Membran übertragen und immobilisiert. Für den Transfer wurden Filterpapiere, Gel und Membran in einem Blot „Sandwich“ angeordnet: auf die Anode der Apparatur wurden zunächst 2 in Blottingpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, es folgt die Membran, die zunächst in Methanol aktiviert und anschließend in Blottingpuffer äquilibiliert wurde, das Gel und weitere 2 mit Blottingpuffer getränkte Filterpapiere. Nach Anbringen der Kathode erfolgte der Transfer mit 120 mA für 95 min. Anschließend wurde die PVDF- Membran in TBST mit 5 % Milchpulver für eine Stunde blockiert. Nach 3 Waschschritten mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Kreisschüttler. Ungebundener, überschüssiger Primärantikörper wurde durch Waschschritte mit TBST entfernt. Zur Visualisierung der Primärantikörper- Bindung diente ein Meerrettich-Peroxidase (HRP)- markierter Sekundärantikörper. Der Nachweis, der

gebundenen Sekundärantikörper erfolgte durch Chemolumineszenz mit Hilfe des ECL Substrats (Enhanced Chemiluminescence) nach den Angaben des Herstellers, wobei das Signal mit einem lichtempfindlichen Film detektiert wurde. Als interne Kontrolle wurde das house keeping protein GAPDH, mitgeführt.

2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung

Die intrazellulären Färbungen wurden unter Verwendung von FAS spezifischen Primärantikörpern und darauf folgend Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen direkt auf Deckgläschen mit 2x 10^5 Zellen/ Analyse einen Tag vor der Färbung ausplattiert. Als erstes werden die Zellen mit 4 % PFA für 15 min auf Eis fixiert. Nach einem Waschschritt mit kaltem PBS wurden die Zellen zur Permeabilisation mit Methanol bei – 20 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 5 % Ziegenserum für 60 min bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Rabbit polyklonal to FAS, 200 µl pro well, Verdünnung 1:50 in PBS) über Nacht bei 4 °C.
Nach weiteren 3 Waschschritten mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (Cy3 labeled goat anti rabbit, 200 µl pro well) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach weiteren 3 Waschschritten mit eiskaltem PBS wurden die Zellen einer Höchst Kernfärbung unterzogen.
Die mikroskopische Analyse wurde am Axiovert 200 M Mikroskop und mittels AxioVision Rel. 4.7 Software durchgeführt.

2.3.3. Isolierung der Gesamt-RNA

Für die RNA-Extraktion wurden ungefähr 5 x 10^6 Zellen in 1 ml TriPure® Isolation Reagent aufgenommen und nach den Angaben des Herstellers behandelt. Die isolierte RNA wurde in Diethylpyrocarbonate (DEPC) –behandeltem RNase-freiem H_2O aufgenommen und die Reinheit der RNA wurde durch die spektrophotometrische Bestimmung des Verhältnisses von OD_{260nm}/ OD_{280nm} untersucht. Mögliche genomische DNA-Kontaminationen wurden mittels DNase I (MBI Fermentas) nach Originalprotokoll des Herstellers entfernt. Die RNA wurde

entweder direkt für die Umschreibung eingesetzt oder langfristig bei -80 ºC gelagert.

2.3.4. Reverse Transkription (RT)

Zur Denaturierung wurden 2 µg der Gesamt-RNA mit 2 µl Oligo(dT) (Ambion), nach Auffüllen mit nuklease-freiem Wasser auf 12 µl, für 3 min bei 85 ºC erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben auf Eis gestellt. Für die reverse Transkription wurden den Proben 2 µl 10x Puffer, 4 µl dNTP mix, 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl MMLV-RT zugeführt. Nach sorgfältigem vortexen wurden die Proben kurz zentifugiert und für 1 h bei 44 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der RT wurden die Proben für 10 min bei 92 °C erhitzt und anschließend der Polymerasekettenreaktion zugeführt. Als negative Kontrolle wurde unbehandelte RNA verwendet und nach oben aufgeführtem Protokoll mitgeführt. Zur positiven Kontrolle wurden Control PCR Primers (RETROscript® Kit) verwendet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Kontrollprimer

forward primer	5`-TTCCGCAAGTTCACCTACC
reverse primer	5`-CGGGCCGGCCATGCTTTACG

2.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction-PCR) erlaubt die selektive Amplifikation von bestimmten DNA-Regionen unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden, die am 5`- bzw. 3`-Ende des gewünschten DNA-Stücks binden. Für die Reaktion wurde das Enzym SuperTaq™ DNA Polymerase benutzt. Die PCR wurde in 25 µl Ansätzen mit je 25 pmol Oligonukleotidprimern, 1 mM dNTP, 1x Reaktionspuffer und Taq Polymerase in 200 µl Reaktionsgefäßen in dem Gyro Rocker SSL3 (Stuart) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Primer (eurofins); hFAS for und hFAS rev für humane Zelllinien, mFAS for und mFAS rev für die murine Zelllinie.

Bezeichnung	**Sequenz 5`→ 3`**	**PCR-Laufbedingungen**
hFAS for	CTGAGCATGCTGAACGACAT	30 Zyklen: 94 °C→30 sek, 72 °C→ 1 min, 72 °C→5 min
hFAS rev	TGTCATCAAAGGTGCTCTCG	30 Zyklen: 94 °C→30 sek, 72 °C→ 1 min, 72 °C→5 min
mFAS for	CTTAGAGGCAGTGCAGGACC	30 Zyklen: 94 °C→30 sek, 72 °C→ 1 min, 72 °C→5 min
mFAS rev	GGAGCGCAGGATAGACTCAC	30 Zyklen: 94 °C→30 sek, 72 °C→ 1 min, 72 °C→5 min

2.3.6. Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihres Molekulargewichtes unterschiedlich schnell in einem horizontalen Agarosegel, an das ein Spannungsfeld angelegt wurde. Somit konnten unterschiedlich lange DNA Fragmente elektrophoretisch getrennt werden. Je nach Länge der zu trennenden Produkte wurde die Agarose (Lonza) in einer Konzentration von 0,8 – 1,5% (w/v) in 0,5 x TBE- Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen mit 2 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt, um die DNA Fragmente im Gel detektieren zu können. Die so behandelte Agarose wurde in die Gelträger-Apparaturen gegossen. Die Proben und der Molekulargewichtsmarker (100 bp, bzw. 1 kb DNA-Leiter; Invitrogen) wurden mit 1/6 des Gesamtprobenvolumens 6 x Gelladepuffers versetzt. Das mit den Proben beladene Gel wurde in die mit 0,5 x TBE- Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Biorad) überführt und die Elektrophorese für 0,5 h bis 1,5 h bei einer maximalen

Spannung von 7 V/cm Elektrodendistanz durchgeführt. Für die Gelauswertung wurde ein UV-Transilluminator (Biostep, Jahnsdorf) verwendet.

2.3.7. Immunhistochemie an Patientenbiopsien

Die Schnitte der Patientenbiopsien wurden freundlicherweise aus der Pathologie zur Verfügung gestellt.

Die Patientenbiopsie-Gewebepräparate wurden im Xylolbad 4 malig für 5 min inkubiert. Weiter wurden die Proben in absteigender Alkoholreihe (Ethanol) mit 100 %, 95 %, 70 % und 50 % für jeweils 5 min entparafiniert. Die Proben wurden dann in eine PBS Küvette gestellt. Anschließend erfolgte die Demaskierung der Antigene durch Erhitzung im Citratpuffer (pH 6,0) für 10 min bei 95- 99 °C. Danach wurden die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden mit einem Fettstift umrandet und 3- malig mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Präparate wurden dann für 10 min in 3 % Wasserstoffperoxid inkubiert. Das Wasserstoffperoxid dient der Merrettichperoxidase als Substrat, die freiwerdenen Protonen oxidieren das farblose Chromogen zu seinen farbigen Endprodukten. Hiernach erfolgt wiederum 2 x Waschen mit destilliertem Wasser. Nach den Waschschritten wurde mit TBST weitere 3 x gewaschen. Die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Ziegenserum blockiert und danach über Nacht mit anti- FAS (cell signaling), 1:50 verdünnt, bei 4 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte erneutes Waschen mit TBST, 3 mal 5 min, mit anschließender Inkubation mit dem sekundären anti- rabbit DAKO EN VISION Peroxidase Antikörper für 30 min in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden wieder in PBS gestellt und dieses noch einmal gewechselt bevor die Gegenfärbung mit DAB für 10 min erfolgte. Die Reaktion wurde mit destilliertem Wasser gestoppt. Mit Hämalaun wurde für 5 min die Gewebeprobe gegengefärbt. Danach wurde mit Leitungswasser für 10 min gebläut. Der einzelne Schnitt wurde anschließend mit Glyceringelatine eingedeckelt.

3. Ergebnisse

3.1. Zelluläre Aufnahme von ^{14}C- Palmitinsäure

Palmitinsäure, Hauptprodukt der Fettsäurebiosynthese, wurde radioaktiv markiert und den ausplattierten Zellen zugeführt. Die Aufnahme der Palmitinsäure in die verschiedenen Zellen wurde mittels GammaCounter untersucht. PCa-Zellen können selbst durch Fettsäurebiosynthese über das Enzym FAS Palmitinsäure herstellen.[52]

Nach dem Zuführen der radioaktiv markierten Palmitinsäure wurde das Aufnahmeverhalten der Fettsäure in malignen und benignen Zelllinien, sowie PrEc nach 2 und 24 h untersucht.

Ein analoger Versuch wurde mit Zuführen des direkten Inhibitors der FAS, C75, ausgeführt, die Zellen waren durch Zugabe von C75 nicht mehr in der Lage Palmitinsäure selbst herzustellen.[65]

Zur effizienten Hemmung der FAS wurde C75 18 Stunden vor Versuchsbeginn aufgetragen. Die Auswertung der Aufnahme der Radiofettsäure ^{14}C- Palmitinsäure erfolgte analog dem Versuch ohne Hemmung der FAS, nach 2 und 24 h *(Abb.7, 8).*

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Exel Statistikprogramm, bestimmt wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der p-Wert mittels t-test. Bei dem Vergleich der malignen mit den benignen Zelllinien und PrEc im t-test wurde die Nullhypothese „es gibt keinen Unterschied“ untersucht. Hierbei wurden die Zelllinien und PrEc als unabhängige Variablen betrachtet.

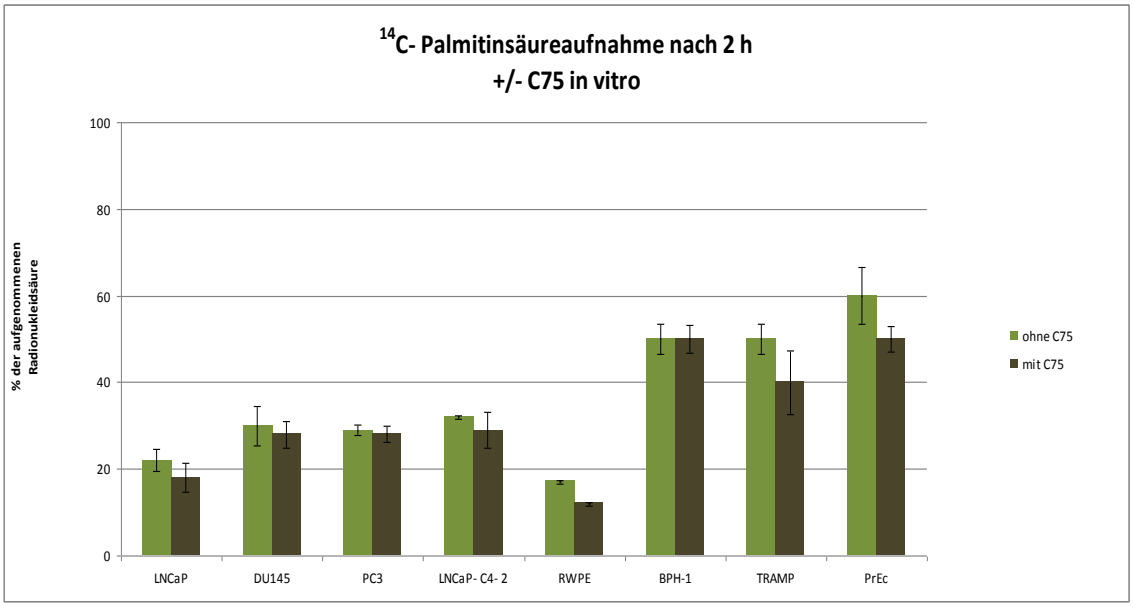


Abb. 7 Zelluntersuchung in vitro auf Aufnahme von radioaktiv markierter Palmitinsäure nach 2 h mit und ohne vorherige Inhibition der Fettsäuresynthese durch C75. Die Menge der aufgenommenen Aktivität/ Zellzahl wurde in Prozent zur mitbestimmten Zugabeaktivität bestimmt. Die Messung erfolgte am GammaCounter. Die prozentualen Werte wurden über drei Versuche gemittelt.

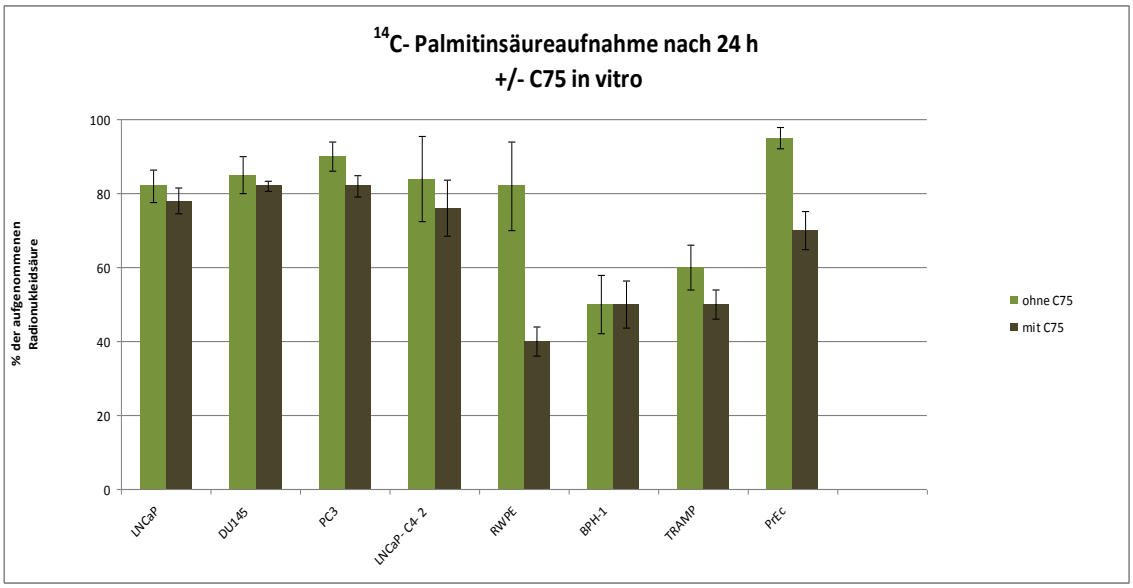


Abb.8 Die Aufnahme der radioaktiv markierten Palmitinsäure nach 24 Stunden mit und ohne Hemmung der Fettsäuresynthese durch Zugabe von C75. Gemessen wurde die Aufnahme der Aktivität/ Zellzahlt in Prozent der Zugabeaktivität am GammaCounter. Die prozentualen Werte wurden über drei Versuche gemittelt.

Der t-test wurde als Vergleich der malignen Zelllinien mit den benignen auf Unterschiede in der Aufnahme der radioaktiv markierten Palmitinsäure durchgeführt. LNCaP nahm signifikant mehr Palmitinsäure auf im Vergleich zur

immortalisierten benignen Zelllinie RWPE (p= 0,045), ebenso wie zu BPH-1 (p= 0,0003) und zu den nicht immortalisierten PrEc (p= 0,0006). Die restlichen malignen Zelllinien verhielt sich in den signifikanten Unterschieden zu den benignen Zellen gleichgerichtet, DU145 zu RWPE (p= 0,01), BPH-1 (p= 0,001), PrEc (p= 0,0006), PC3 zu RWPE (p= 0,0002), BPH-1 (p= 0,0004), PrEc (p= 0,001), LNCaP-C4-2 zu RWPE (p=0,00002), BPH-1 (p= 0,0005), PrEc (p= 0,001). Die murine Zelllinie TRAMP zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme im Vergleich zu den malignen Zelllinien LNCaP (p= 0,0002), DU145 (p= 0,001), PC3 (p= 0,0003), LNCaP-C4-2 (p= 0,0003), zu RWPE (p= 0,00007) zeigten sie einen signifikant höhere Aufnahme, der Unterschied zu BPH-1 (p= 0,97) und PrEc (p= 0,22) war nicht signifikant.

Bei dem gleichen Versuchsaufbau mit Hemmung der FAS durch C75 zeigte sich nach 2 Stunden bei allen Zelllinien und PrEc eine geringere Aufnahme der Aktivität. Auch hier war eine vermehrte Aufnahme der markierten Palmitinsäure in die malignen Zellen nachweisbar LNCaP 18%, DU145 28%, PC3 28%, LNCaP-C4-2 29%, die benignen Zelllinien RWPE zeigten 12% Aufnahme, BPH-1 50%, die PrEc nahmen 50% auf. Die Unterschiede zwischen den malignen Zelllinien und den benignen Zelllinien und PrEc mit vorheriger Ausschaltung der Fettsäurebiosynthese zeigte gleichgerichtete Signifikanzen (LNCaP zu RWPE p= 0,04, BPH-1 p= 0,0001, PrEc p= 0,0001; DU145 zu RWPE p= 0,0008, BPH-1 p= 0,0004, PrEc p= 0,0003; PC3 zu RWPE p= 0,00009, BPH-1 p= 0,0004, PrEc p= 0,0003; LNCaP-C4-2 zu RWPE p= 0,002, BPH-1 p= 0,002, PrEc p= 0,002).

Die malignen Zelllinien LNCaP nahmen signifikant mehr Palmitinsäure auf im Vergleich zu RWPE (p= 0,04), BPH-1 (p= 0,0001) und PrEc (p= 0,0001), bei DU145 zu RWPE (p= 0,0008), BPH-1 (p= 0,0004) und PrEc (p= 0,0003), bei PC3 zu RWPE (p= 0,00009), BPH-1 (p= 0,0004) und PrEc (p= 0,0003), bei LNCaP-C4-2 zu RWPE (p= 0,002), zu BPH-1 (p= 0,002) und PrEc (p= 0,002).

Die murine Zelllinie TRAMP nahm 40% der zugeführten Palmitinsäure auf, es bestanden signifikanten Unterschiede in der vermehrten Aufnahme im Vergleich zu den humanen malignen Zelllinien LNCaP (p= 0,0004), DU145 (p= 0,002), PC3

(p= 0,002), LNCaP-C4-2 (p= 0,009) und zu den benignen Zelllinien RWPE (p= 0,00007), BPH-1 (p=0,03) und PrEc (p= 0,03).

Nach 24 Stunden lag die Aufnahme der Palmitinsäure in den malignen Zelllinien, LnCaP, DU145, PC3, LNCaP-C4-2 um 85%, in der benignen Zelllinie RWPE und PrEc zeigen sich ähnliche Werte, BPH-1 lag mit 50 % deutlich unterhalb dieser Aufnahmen. Die murine Zelllinie TRAMP nahm 60% der zugegebenen Palmitinsäure nach 24 h auf.

Im Vergleich der malignen Zelllinie zu der Benignen RWPE zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Aufnahmeaktivität zu LNCaP (p= 0,76), DU145 (p= 0,84), PC3 (p= 0,68), LNCaP-C4-2 (p= 0,91). Die malignen Zelllinien verglichen mit der BPH-1 Zelllinie zeigten eine signifikante Mehraufnahme, LNCaP (p= 0,05), DU145 (p= 0,004), PC3 (p= 0,003), LNCaP-C4-2 (p= 0,02). PrEc nahm signifikant mehr Palmitinsäure auf im Vergleich mit den malignen Zelllinien, LNCaP (p= 0,009), DU145 (p= 0,03), PC3 (p= 0,03), zu LNCaP-C4-2 (p= 0,19) bestand kein signifikanter Unterschied.

TRAMP nahm im Vergleich mit den malignen Zelllinien weniger Palmitinsäure auf, LNCaP (p= 0,008), DU145 (p= 0,005), PC3 (p= 0,003), LNCaP-C4-2 (p= 0,03), zu den benignen Zelllinien RWPE (p= 0,04), zu PrEc (p= 0,0008). Kein signifikanter Unterschied bestand im Vergleich TRAMP mit BPH-1 (p= 0,25).

Durch die Hemmung der endogenen Fettsäurebiosynthese nahm die Aufnahme der exogen zugeführten Fettsäure in allen Zelllinien und PrEc ab.

Die erwartete deutliche Zunahme der Palmitinsäureaufnahme durch eine Hemmung der endogenen Biosynthese mittels C75 in den malignen Zellen konnte nicht beobachtet werden. Die Unterschiede zwichen den malignen Zelllinien und RWPE waren signifikant, LNCaP (p= 0,0003), DU145 (p= 0,00004), PC3 (p= 0,0001), LNCaP-C4-2 (p= 0,002). BPH-1 im Vergleich zu LNCaP (p= 0,008), DU145 (p= 0,001), PC3 (p= 0,002), LNCaP-C4-2 (p= 0,03) nahm signifikant weniger der zugegebenen Palmitinsäure auf. Der Vergleich der PrEc mit den malignen Zelllinien erbrachte keine signifikanten Unterschiede zu LNCaP (p= 0,2) und LNCaP-C4-2 (p= 0,53), die Aufnahme war signifikant geringer als die von DU145 (p= 0,003) und PC3 (p= 0,01).

Die murine Zelllinien TRAMP nahm signifikant weniger Palmitinsäure auf im Vergleich zu den malignen Zelllinien LNCaP (p= 0,002), DU145 (p= 0,0002), PC3

(p= 0,0005), LNCaP-C4-2 (p= 0,02), zu den benignen Zelllinien RWPE (p= 0,02), zu PrEc (p= 0,01), der Unterschied zu BPH-1 (p= 0,96) war nicht signifikant.

3.2. zelluläre Aufnahme von ^{14}C- Myrestinsäure

Myrestinsäure ist eine Fettsäure mit 14 C- Atomen, diese findet in den Zellen nur im geringen Masse Verwendung zur Modifikation von Proteinen. Die Myrestinsäure kann über den FAS- Komplex im Zellplasma zu Palmitinsäure verlängert und z.B. in Zellmembranen eingebaut oder über einzelne ACSL (long-chain acyl- coenzyme A synthetasen) verlängert werden, diese sind nicht durch C75 hemmbar.

Dieser Versuchsaufbau wurde mit den Zelllinien LNCaP, DU145, PC3, LNCaP-C4-2 und RWPE mit 20 kBq ^{14}C-Myrestinsäure durchgeführt. Die Aufnahme in die Zellen nach 2 h und 24 h wurde mittels GammaCounter gemessen. Jeweils einer Hälfte der ausplattierten Zellen wurde 18 h vor Versuchsbeginn C75 zugefügt zur Hemmung der FAS zugeführt und ebenfalls nach 2 und 24 h die Aufnahme in die Zellen gemessen *(Abb. 9,10).*

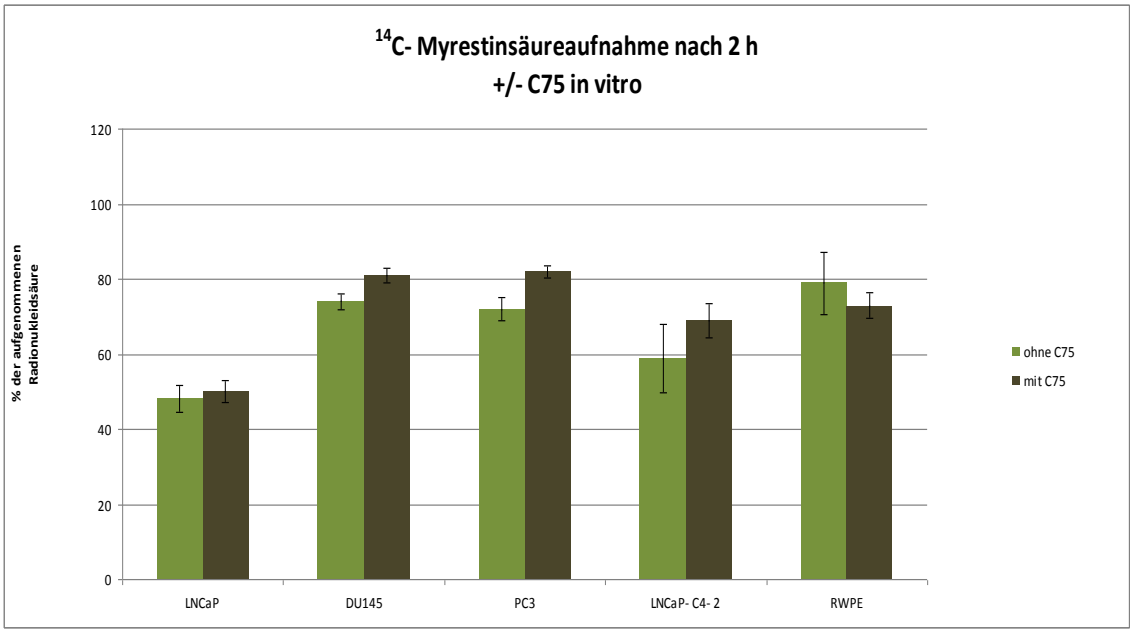


Abb. 9 *Zelluntersuchung in vitro auf Aufnahme von radioaktiv markierter Myrestinsäure nach 2 h mit und ohne vorherige Inhibition der Fettsäuresynthese durch C75. Die Menge der aufgenommenen Aktivität/ Zellzahl wurde in Prozent zur mitbestimmten Zugabeaktivität bestimmt. Die Messung erfolgte am GammaCounter. Die prozentualen Werte wurden über drei Versuche gemittelt.*

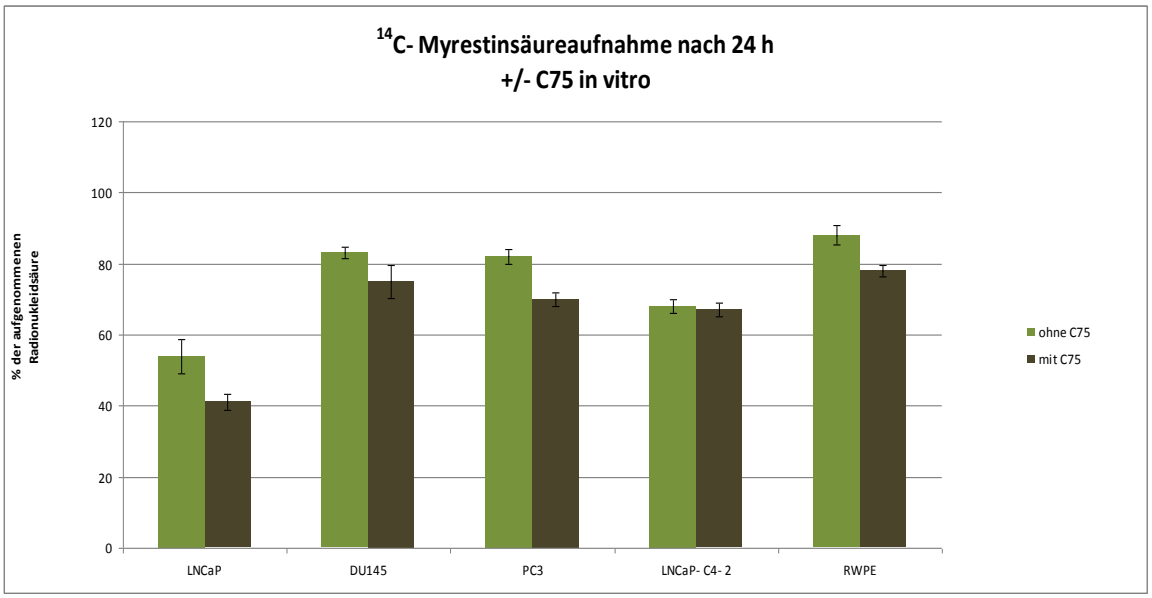


Abb. 10 *Zelluntersuchung in vitro auf Aufnahme von radioaktiv markierter Myrestinsäure nach 24 h mit und ohne vorherige Inhibition der Fettsäuresynthese durch C75. Die Menge der aufgenommenen Aktivität/ Zellzahl wurde in Prozent zur mitbestimmten Zugabeaktivität bestimmt. Die Messung erfolgte am GammaCounter. Die prozentualen Werte wurden über drei Versuche gemittelt.*

Im Vergleich der malignen Zelllinien zur benignen Zelllinie RWPE zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme der Myrestinsäure in die Zellen, LNCaP (p= 0,4), DU145 (p= 0,3), PC3 (p= 0,25) und LNCaP (p= 0,1).

Durch die Hemmung der eigenen Möglichkeit zur Biosynthese von Fettsäuren, nahmen alle malignen Zelllinien deutlich mehr der exogenen Myrestinsäure auf, während die benigne Zelllinie eine verminderte Aufnahme aufwies. Signifikante Unterschiede in der Mehraufnahme unter den malignen Zelllinien zur benignen Zelllinie RWPE bestanden bei LNCaP (p= 0,0008) und PC3 (p= 0,02), bei DU145 (p= 0,06) und LNCaP-C4-2 (p= 0,2) nicht, die benigne Zelllinie zeigte die Mehraufnahme.

Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h nahmen die malignen Zellen mehr Myrestinsäure auf, die benigne Zelllinie RWPE weniger der zugeführten Myrestinsäure auf.

Signifikante Mehraufnahme in RWPE zu den malignen Zelllinien bestanden bei LNCaP (p= 0,0005) und LNCaP-C4-2 (p= 0,0004), bei DU145 (p= 0,13) und PC3 (p= 0,04) konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Allerdings sank die Myrestinsäureaufnahme aller Zelllinien durch Zugabe des Inhibitors C75. Die benigne Zelllinie RWPE nahm ebenfalls weniger der zugeführten Palmitinsäure auf. Signifikante Mehraufnahme von RWPE zu den malignen Zelllinien bestanden bei LNCaP (p= 0,00003), PC3 (p= 0,006) und LNCaP-C4-2 (p= 0,006) zu DU145 (p= 0,7) nicht.

3.3. Zelluläre Aufnahme von 3H-Acetat

Ein weiterer Versuch wurde mit dem Ausgangsprodukt der Fettsäurebiosynthese Acetat durchgeführt.
Den 3 Zelllinien TRAMP, LNCaP-C4-2 und PrEc wurde jeweils ^{3}H- Acetat zugefügt und nach 2 und 24 h die Aufnahme gemessen *(Abb.11).*

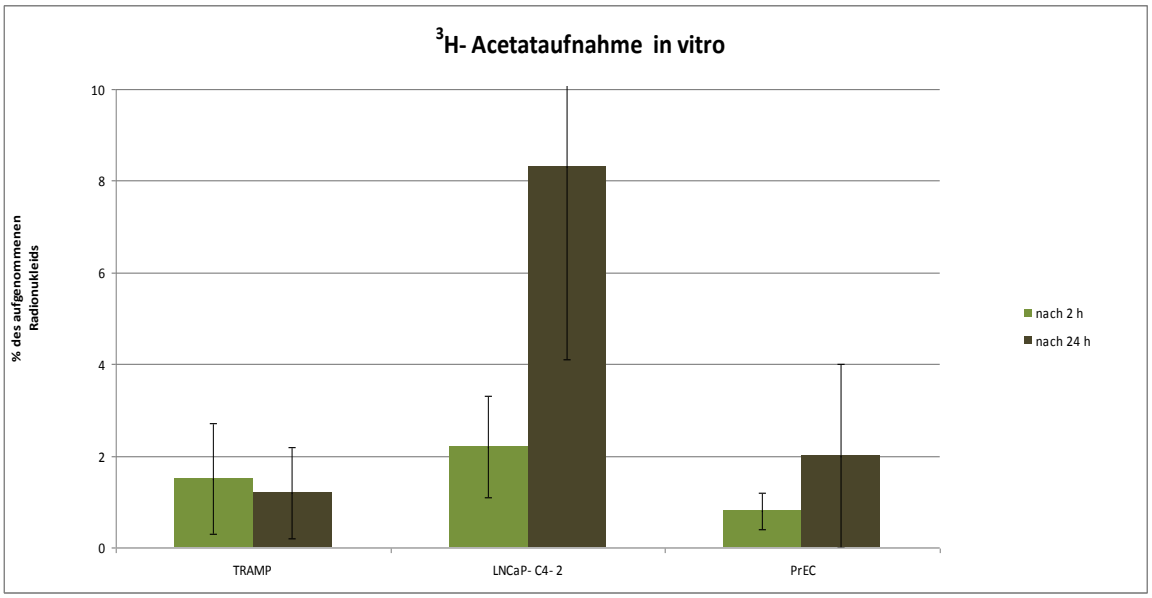


Abb.11 *Zelluntersuchung in vitro auf Aufnahme von radioaktiv markiertem Acetat nach 2 und 24 h. Die Menge der aufgenommenen Aktivität/ Zellzahl wurde in Prozent zur mitbestimmten Zugabeaktivität bestimmt. Die Messung erfolgte am GammaCounter. Die prozentualen Werte wurden über drei Versuche gemittelt.*

Die LNCaP-C4-2 zeigten die höchste Aufnahme an ^{3}H- Acetat, , während die PrEc Zelllinie deutlich weniger aufgenommen hatte. Die murine TRAMP Zelllinie nahm ebenfalls weniger des angebotenen Acetats auf als LNCaP-C4-2. Die malignen Zelllinien nahmen somit deutlich mehr des Ausgangsstoffs für die Biosynthese von Fettsäuren auf als die benignen Zellen. Zwischen LNCaP-C4-2 und PrEc bestehen

signifikante Unterschiede in der Aufnahme des Acetats nach 2 h (p= 0,00004) und nach 24 h (p= 0,0004), zwischen LNCaP-C4-2 und der murinen Zelllinie bestehen ebenfalls nach 2 (p= 0,02) und 24 h (p= 0,03) signifikante Unterschiede. Im Vergleich TRAMP mit PrEc zeigt sich nach 2 (p= 0,02) und 24 h (p= 0,02) eine signifikante Mehraufnahme des Acetats in die TRAMP- Zellen.

3.4. Zelluläre Aufnahme ^{11}C-Cholin

Da das Cholin- PET eine überragende Rolle in der Diagnostik des PCas hat, wurde auch die Aufnahme von ^{11}C-Cholin nach 1h gemessen *(Abb.12).*

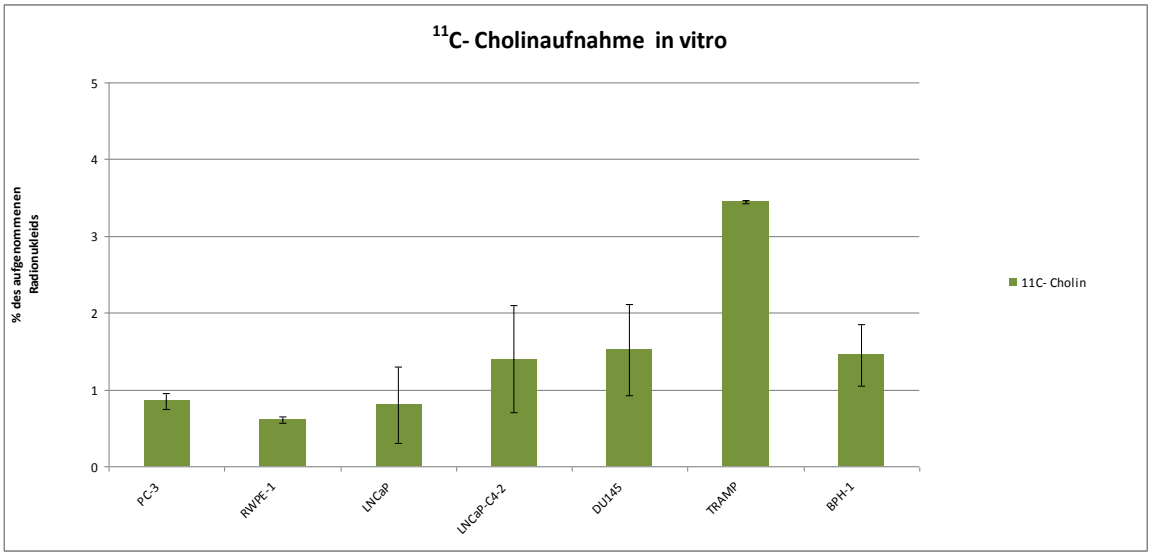


Abb. 12 *Zelluntersuchung in vitro auf Aufnahme von radioaktiv markiertem Cholin nach 1 Stunde. Die Menge der aufgenommenen Aktivität/ Zellzahl wurde in Prozent zur mitbestimmten Zugabeaktivität bestimmt. Die Messung erfolgte am GammaCounter. Die prozentualen Werte wurden über drei Versuche gemittelt.*

TRAMP zeigte hier die höchste Aufnahme, bei den humanen Zelllinien zeigten die malignen Zelllinien eine geringere Aufnahme. Die benigne Zelllinie RWPE nahm von dem zugeführten Cholin die geringste Menge und BPH-1 zeigte eine Aufnahme vergleichbar der der malignen Zelllinien. Die malignen Zelllinien zeigen im Vergleich zu der benignen Zelllinie RWPE eine signifikant höhere Aufnahme des Cholins, LNCaP (p= 0,05), DU145 (p= 0,0001), PC3 (p= 0,0007) und LNCaP-C4-2 (p= 0,0002). Im Vergleich der malignen Zelllinien zu BPH-1 zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede, LNCaP (p= 0,000006), DU145 (p= 0,003),

PC3 (p= 0,00001) und LNCaP-C4-2 (p= 0,00002). Der Vergleich der murinen Zelllinie TRAMP mit den humanen malignen Zelllinien erbrachte eine signifikante Mehraufnahme des Cholins in die murine Zelllinie, LNCaP (p= 0,00001), DU145 (p= 0,00002), PC3 (p= 0,00002) und LNCaP-C4-2 (p= 0,00002), zu den benignen Zelllinien RWPE (p= 0,00001) und BPH-1 (p= 0,000001).

3.5. Lipidextraktion

Wie oben beschrieben wurde die zugeführte ^{14}C- Palmitinsäure in die Zellen aufgenommen.
Die Zellen können die Palmitinsäure in Phospholipide, Palmitat, Triglyceride und Cholesterin einbauen. Für die Bestimmung des vorwiegenden Vewendungszwecks der Palmitinsäure wurde die Lipidfraktion aus den verschiedenen Zelllinien extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Zur Fraktionierung der polaren Endprodukte Palmitat, Triglyceride, Cholesterin und Palmitinsäure wurde ein polares Laufmittel verwendet, das unpolare Endprodukt der Phospholipide wurde mit einem unpolaren Laufmittel untersucht.
Phospholipide und Cholesterinpalmitat weisen auf einen Einbau in der Zellmembran hin, Triglyceride auf eine Speicherung. Nach 2 und 24 Stunden Inkubation mit ^{14}C- Palmitinsäure wurde die Lipidextraktion durchgeführt *(Abb. 13).*

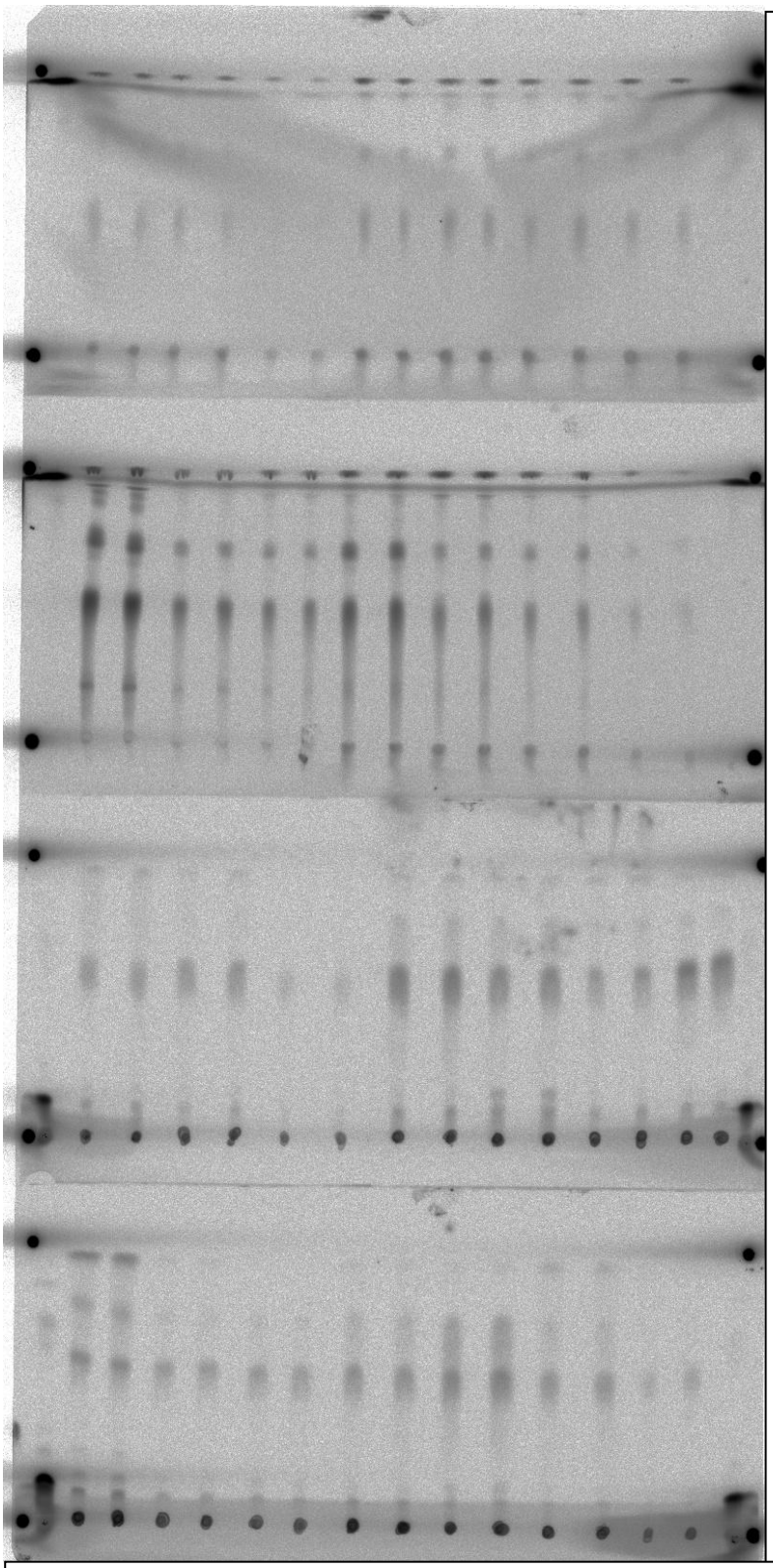

Unpolares Laufmittel 2 Stunden
-Phospholipide
Polares Laufmittel 2 Stunden
-Palmitat
-Triglyceride
-Cholesterin
-Palmitinsäure
Unpolares Laufmittel 24 Stunden
-Phospholipide
Polares Laufmittel 24 Stunden
-Palmitat
-Triglyceride
-Cholesterin
-Palmitinsäure
1 2 2 3 3 4 4 5 5 6 6 7 7 8 8 1

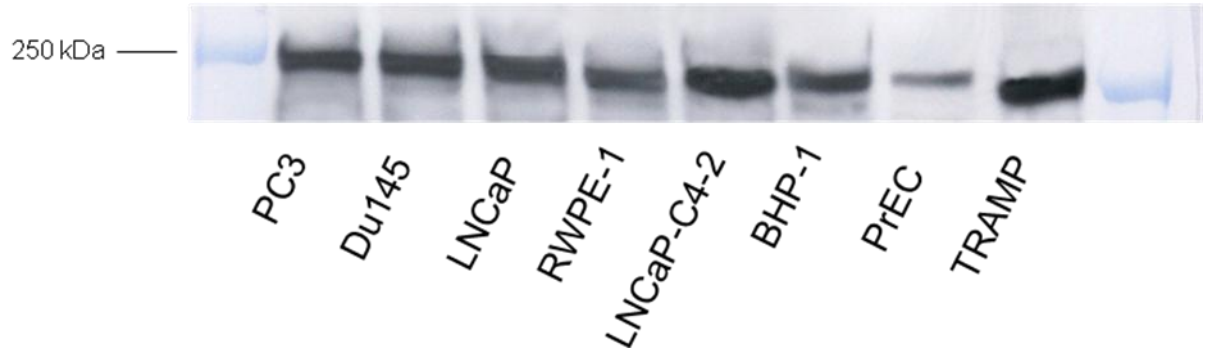
Abb. 13 *Lipidextraktion nach Folch; 1 ^{14}C-Palmitinsäure, 2 LNCaP-C4-2, 3 BPH- 1,4 RWPE, 5 PC3, 6 DU145, 7 TRAMP, 8 LNCaP; Es wurden je 50 µg der Lipidfraktion pro Zelllinie auf eine lane des Kieselgels aufgtragen und mittels Dünnschichtchromatographie in die einzelnen Fraktionen aufgetrennt.*

Bei den malignen Zellen wurde vermehrt die markierte Palmitinsäure in die Phospholipide eingebaut. Insbesondere die benigne Zelllinie RWPE baute kaum Phospholipide aus der zugegebenen Palmitinsäure auf.
Zum Teil wurde die Palmitinsäure auch in Triglyceride und Palmitat umgebaut. Palmitat wurde von den RWPE Zellen am stärksten synthetisiert. Alle Zelllinien stellten in annähernd gleicher Menge das Speicherprodukt Triglyceride her.

3.6. Western Blot

Zur Untersuchung der Expression des Enzyms FAS in den verschiedenen Zelllinien wurde ein Western Blot durchgeführt. Um gleiche Mengen an aufgetragenem Protein gewährleisten zu können, wurde im Vorfeld eine Proteinbestimmung nach Bradford angefertigt. Um etwaige Schwankung in der aufgetragenen Proteinmenge festzustellen, wurde ein zweiter Blot mit GAPDH, dem house keeping protein durchgeführt. Die Proteine wurden mit einer 5 % SDS-Polyscrylamid – Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion des Proteins FAS erfolgte unter Verwendung des anti- FAS– Ak (cell signaling) *(Abb.14).*

Teil A



Teil B

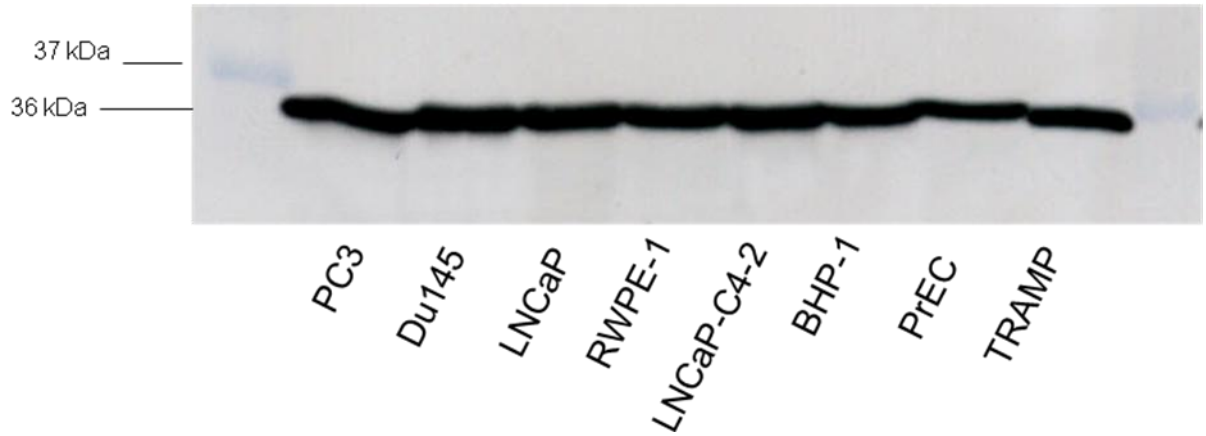


Abb.14 *Teil A zeigt die SDS- Page mit der Bande bei 250 kDa, welche dem Fettsäuresynthase- Homodimer in den einzelnen Zelllinien entspricht. Auftrennung von je 30 µg Protein auf einem 12 % Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen, anschließende Entwicklung mit anti- goat Ak als Sekundärantikörper; Proteinmarker bds. am Rand der SDS- Page Dual Color Proteinmarker (Biorad).*
Teil B SDS- Page mit GAPDH bei 36 kDa zur Kontrolle der gleichen Mengen von aufgetragenem Protein.

Die auf der Höhe von 260 kDa detektierte Bande entsprach der erwarteten Größe des Proteins. Das Molekulargewicht der FAS ist aufgrund der Größe des Homodimers schwankend zwischen 250 und 270 kDa in der Literatur angegeben.[54]

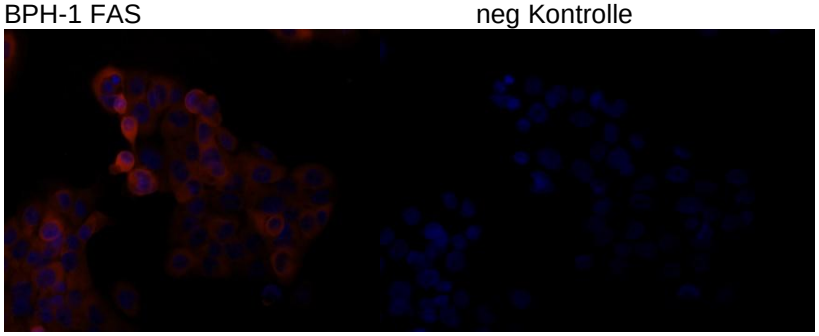
Eine deutlich ausgeprägte Bande und dementsprechend hohe FAS-Konzentrationen fanden sich in der murinen Zelllinie TRAMP und der humanen LNCaP-C4-2, die schwächste Konzentration des FAS- Proteins fand sich in den primaren Prostataepithelzellen. RWPE und BPH- 1 zeigten eine höhere FAS

Konzentration als die PrEc Zellen auf, aber eine deutlich schwächere als die malignen Zellen.
Die GAPDH- Banden waren bei allen Zelllinien und PrEc gleichmäßig ausgeprägt, somit ist von gleichen Ausgangproteinmengen auszugehen.

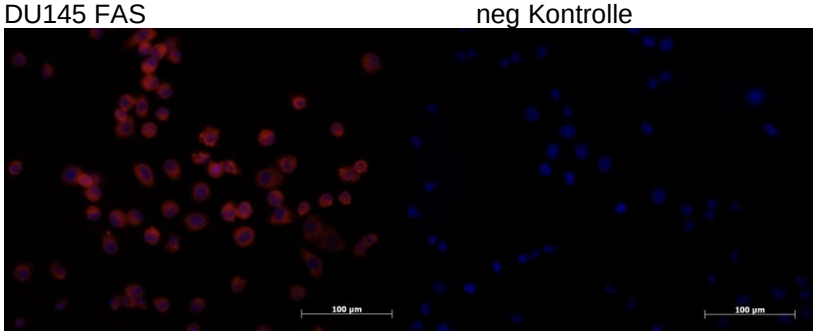
3.7. Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Enzym FAS wurde mittels polyklonalen Primärantikörper und immunfloureszierenden Sekundärantikörper in den Zelllinien LNCaP, DU 145, PC3, LNCaP-C4- 2, BPH- 1, RWPE und den PrEc detektiert. Die Fluoreszenzfärbung wurde hauptsächlich im Zytoplasma demonstriert. Als negative Kontrolle wurde mit Isotykontrolle (dianova) gearbeitet, hier zeigte sich eine nur geringe Anfärbung. Die Intensität der Fluoreszenz korrelierte mit dem Gehalt an FAS- Protein im Zytoplasma *(Abb. 15).*

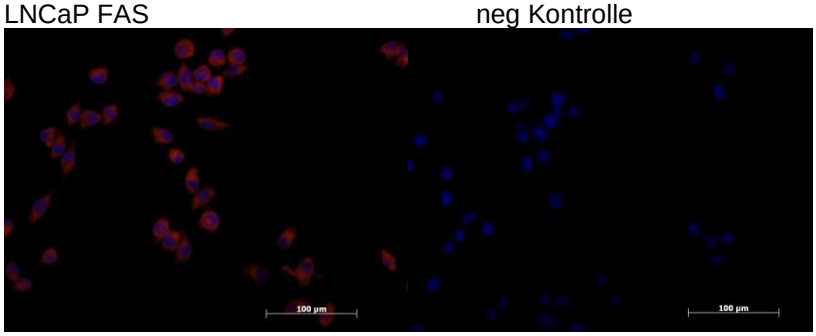
BPH-1 FAS neg Kontrolle



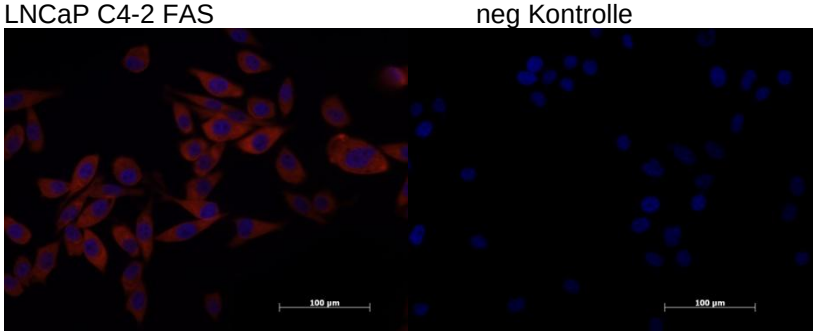
DU145 FAS neg Kontrolle



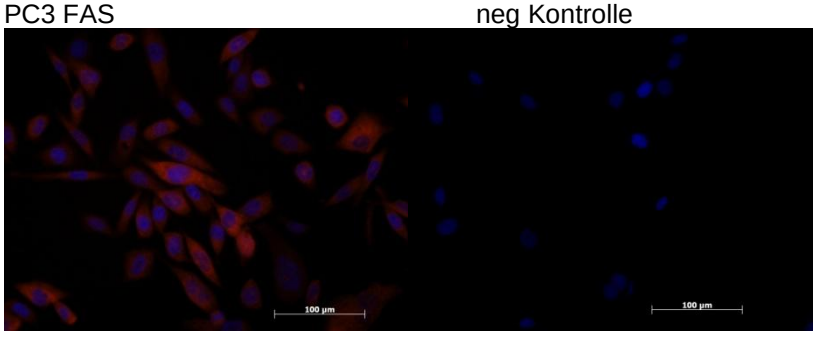
LNCaP FAS neg Kontrolle



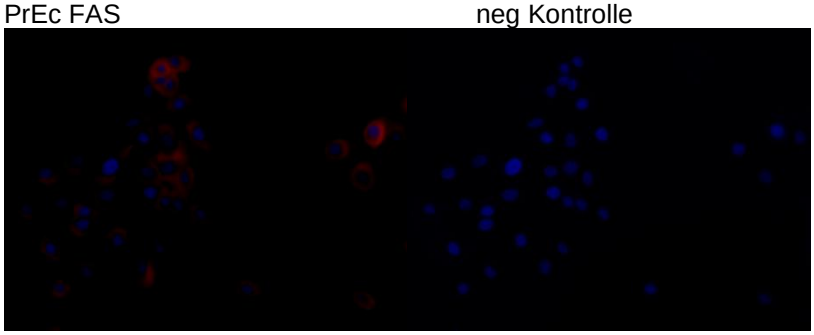
LNCaP C4-2 FAS neg Kontrolle



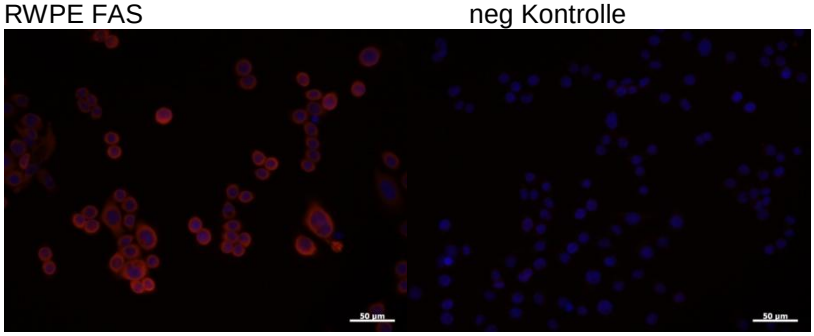
PC3 FAS neg Kontrolle



PrEc FAS neg Kontrolle



RWPE FAS neg Kontrolle



TRAMP FAS neg Kontrolle

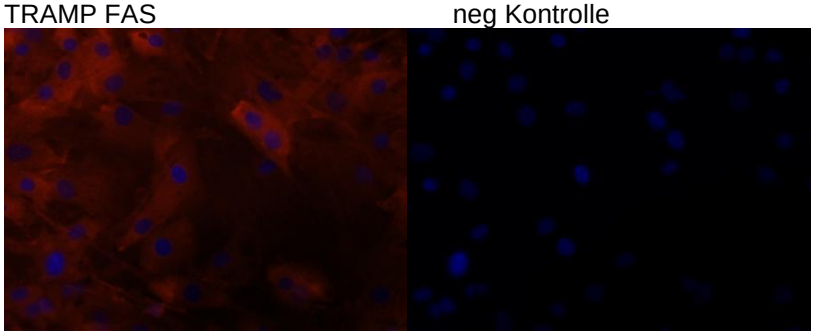


Abb. 15 *Fettsäuresynthase (FAS)- Expressionsanalyse wurde in verschiedenen Zelllinien, sowie PrEc, mittels der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Zellen wurden mit rabbit polyklonal zur Fettsäuresynthase als Primärantikörper inkubiert und mit Cy3 markiertem goat anti- rabbit behandelt. Alle Aufnahmen sind in 20-facher Vergrößerung dargestellt.*

Die beiden stärksten Fluoreszenzen, wie auch nach den Ergebnissen des Western Blot erwartet, traten bei LNCaP- C4- 2 und TRAMP auf. Eine schwache Anfärbung zeigten die primären Prostataepithelzellen und die benignen Zellen RWPE und BPH- 1.

Dieses Ergebnis korreliert mit dem des Western Blots. Hieraus lässt sich zu dem Schluss kommen, dass das FAS- Protein in den malignen Zellen vermehrt synthetisiert wurde.

3.8. PCR Analyse

Die Ergebnisse aus dem Western Blot und der Immunofluoreszenzfärbung zeigen die erhöhte FAS- Synthese in malignen Zellen. Im Anschluss soll gezeigt werden, in wieweit dies auf genetischer Ebene ebenfalls verifizierbar ist durch Steigerung der RNA- Expression des FAS- Proteins.

Zur Eruierung der Genexpression wurde aus den verschiedenen Zelllinien und PrEc RNA gewonnen, mittels reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben und mit humanen- FAS Primern amplifiziert. Danach wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt *(Abb.16).*

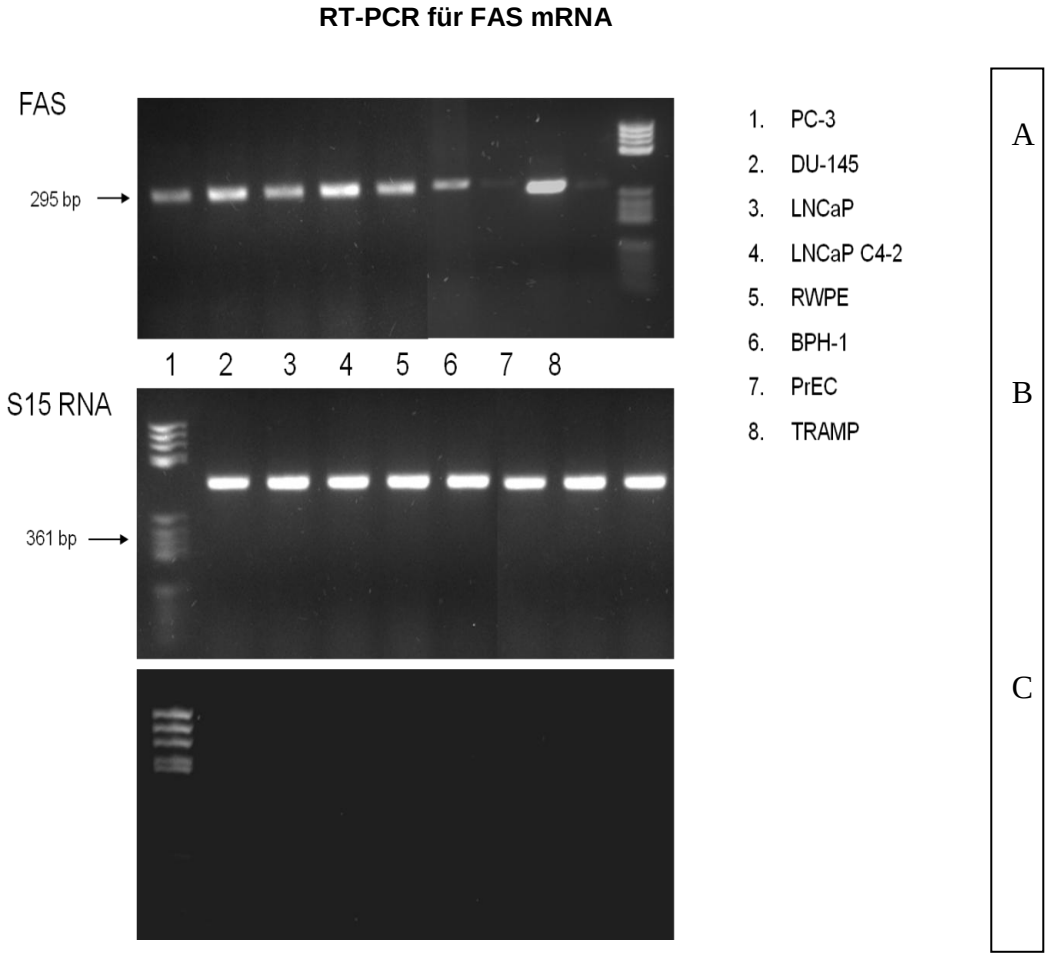


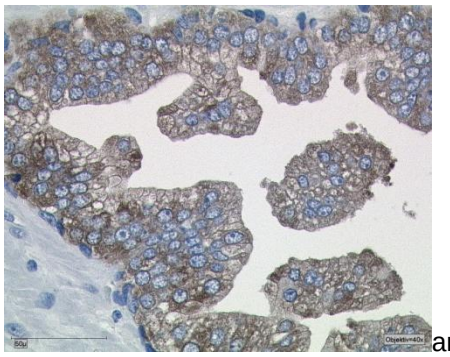
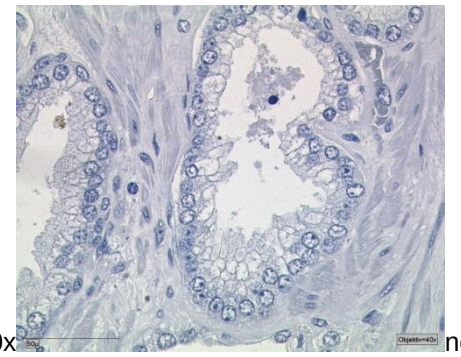
Abb.16 *PCR- Amplifikation der Fettsäuresynthase- RNA mit humanen- FAS Primern (A). Die Positivkontrolle (B) zeigt die Aufnahme gleicher Mengen an aufgetragener DNA, die Negativkontrolle (C) zeigt Verunreinigungen oder falsch bindenden Primer an. Ein DNA- Marker (Fermentas) zur Einordnung der Basenpaargröße wurde mitgeführt.*
(PCR- Polymerasekettenreaktion, RNA- Ribonukleinsäure, DNA- Desoxyribonukleinsäure)

Die Stärke der DNA- Bande korreliert mit der Expression der FAS- DNA. Die stärkste Expression von FAS-DNA zeigte sich in LNCaP- C4- 2 und in den murinen TRAMP- Zellen. Eine kaum zu erkennende Bande bei PrEc deutete hier auf eine minimale Expression von FAS hin. Die benignen Zelllinien RWPE und BPH- 1 zeigten eine schwache Ausbildung einer Bande und somit eine geringe Expression von FAS-DNA.
Die Expression des Proteins FAS und die Expression des Gens der FAS sind in den Zelllinien gleichgerichtet ausgeprägt. So hatten die benignen Zelllinien, sowie PrEc eine geringere Menge an FAS auf Genebene, wie auch auf Proteinebene im Vergleich zu den malignen Zelllinien.

3.9. Immunhistologie der Patientenbiopsien

Die parafineingebetteten Schnitte wurden mit anti- FAS- Ak (cell signaling) gefärbt. Es wurde eine negative Kontrolle, sowie eine HE- Färbung angefertigt. Die Befunde der jeweiligen Biopsien wurden aus der Pathologie von Prof. Dr. Möller freundlicherweise zur Verfügung gestellt *(Abb. 17).*

Patient 1


anti-FAS 40x

neg Kontrolle

Patient 2

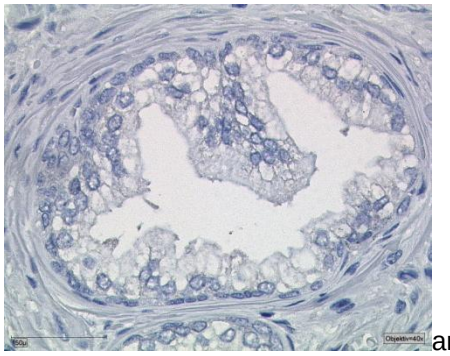
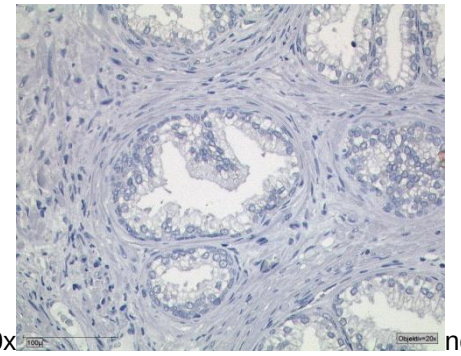

anti-FAS 40x

neg Kontrolle

Abb.17 *Immumhistochemische Untersuchung von Patientenbiopsieschnitten mit anti- FAS als Primärantikörper und anti- rabbit Antikörper als Sekundärantikörper. Die Biopsieschnitte Patient 1 zeigen bei Behandlung mit anti- FAS eine deutliche Anfärbung intrazellulär in den Drüsenepithelien. Bei Patient 2 zeigt die anti- FAS Behandlung keine Anfärbung. (FAS- Fettsäuresynthase)*

Hier zeigte sich bei Patient 1 eine starke Anfärbung intrazellulär bei Behandlung mit anti- FAS Antikörper, in der negativ Kontrolle mit Isotypkontrolle ist dies nicht nachzuweisen.

Hier handelte es sich um eine Biopsie aus einem Prostatakarzinom Gleason Score 7.

Bei Patient 2 war weder in der anti-FAS gefärbten noch in der Isotypkontrolle eine Anfärbung zu erkennen. Laut Befund der Pathologie handelte es sich hier um eine benigne Prostatahyperplasie.

Die Färbung mittels anti- FAS-Ak zeigte auch im Gewebe entsprechend der pathologischen Befunde gute Ergebnisse im Hinblick auf die Detektion von Prostatakarzinomzellen

4. Diskussion

Benigne Zellen mit hoher Proliferationsrate nutzen im Blut zirkulierende Fettsäuren für den Aufbau ihrer strukturellen Lipide. Hingegen Tumorzellen mit ebenfalls hoher Proliferationsrate haben eine hohe Glycolyse und nutzen deren Endprodukt Pyruvat als Ausgangsprodukt für die de novo Biosynthese von Fettsäuren.[72] Maligne Zellen nutzen die im Blut verfügbaren Fettsäuren trotz ausreichendem Angebot nicht.[53,56,62,67,73] Diese Notwendigkeit besteht aufgrund des hohen Bedarfs an Lipiden und Lipidvorstufen für die Membranproduktion und die auf Lipiden basierenden posttranslationellen Modifikationen von Proteinen in hochgradig proliferierenden Geweben. Vorzugsweise stellt die maligne Zelle aus Fettsäuren Phopholipide zur Integration in die Membranen her. Doch die Biosynthese von Fettsäuren hängt noch von anderen Enzymen ab.[74,75]

Als erster Schritt muss zytosolisches Acetyl- CoA hergestellt werden aus mitochondrialem Citrat durch die ATP- Citratlyase (ACLY). Diese ist in ihrer Expression und Aktivität in Tumorzellen deutlich erhöht. Eine Hemmung dieses Enzyms führt zur Inhibition der Proliferation von Tumorzellen und das Überleben der Krebszellen in vivo.[44,76,77]

Eine Akkumulation von Malonyl- CoA in der Zelle wirkt toxisch. Malonyl- CoA hemmt die Carnitin- Palmitoyltranferase 1 (CTP1)- regulierte β- Oxidation von Fettsäuren. Dies induziert die Anhäufung des Shingolipids Ceramid, welches proapoptotische Wirkung hat.

Zweitens benötigt die Zelle das Schrittmacherenzym der de novo Fettsäurebiosynthese, die Acetyl- CoA- Carboxylase, die ATP abhängig Acetyl- CoA zu Malonyl- CoA carboxyliert. Auch hier zeigt sich eine Überexpression auf mRNA und Proteinebene in neoplastischen Geweben. Ein Inhibieren dieses Enzyms führt zu einer Verminderung der Zellproliferation und Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zellen.[77]

Als Drittes zeigt sich eine Überexpression und gesteigerte Aktivität von FAS, dies ist eine der häufigsten Veränderungen in malignen Geweben. Eine erhöhte FAS Expression geht mit einem erhöhten Malignitätsgrad und einer höheren Letalität des Wirts einher.[43,56,78]

Da in malignen Zellen in der einschlägigen Literatur über eine Überexpression an FAS berichtet wird, wurde die Fettsäuresynthese als attraktives Ziel gesehen, hier erstens eine selektive Überexpression in malignen gegenüber benignen Zellen zu detektieren. Zweitens zu beweisen, dass diese Überexpression auch auf Genebene nachzuweisen ist und drittens welche möglichen Stoffe die Zelle durch das Überexpression an FAS anders als benigne Zellen verstoffwechseln und auf längere Sicht der Diagnostik des Prostatakarzinoms dienen kann. In den bis heute publizierten Studien wurde FAS als Zielprotein postuliert. Die dabei beobachteten Resultate überzeugen von dem Potential der Fettsäuresynthese als diagnostischer Angriffspunkt.[53,56,62,67,73]

In den Versuchen kamen als maligne Zelllinien LNCaP aus Lymphknotenmetastasen des PCas, diese Zelllinie ist androgenabhängig, zur Anwendung. LNCaP-C4-2 als Subzelllinie ist androgenunabhängig und mit deutlich höherem Malignitätsgrad, weiterhin wurden DU145 aus Dura mater Metastasen und PC3 aus Knochenmetastasen des PCas verwendet. Hier dienten LNCaP und PC3 als androgenabhängige Zelllinien.

Als benigne Kontrolle dienten immortalisierte RWPE- Zellen aus der normalen Prostata, weiterhin immortalisierte BPH-1 Zellen aus der benignen Prostatahyperplasie und primäre Prostataepithelzellen (nicht immortalisiert). Dies stellte ein adäquates in vitro- Modell dar. Zusätzlich wurde eine murine Zelllinie TRAMP (TRansgenic Adenocarcinoma oft the Mouse Prostate) mitgeführt, um Diskrepanzen zwischen murinen und humanen Versuchen in vitro aufweisen zu können.[69]

4.1. zelluläre Aufnahme

Bei der Zugabe der markierten Palmitinsäure wäre eine verminderte Aufnahme in den malignen Zellen gegenüber den benignen zu erwarten gewesen, da diese Zellen ihre Fettsäuren selbst herstellen und eine deutliche Steigerung bei der Zugabe von C75, da nun die de novo Fettsäuresynthese nicht mehr ausreichend stattfinden kann. Eine Zufuhr unphysiologisch hoher Mengen an Palmitinsäure, kann die Zelle vor der Apoptose bewahren.[62,73,79]

In den durchgeführten Versuchen hingegen reicherten die malignen, wie auch die benignen Zellen die exogen zugeführten Fettsäuren an. Nach 2 Stunden wurde

ein erwartungsgemäßes Bild mit deutlich höherer Akkumulation der markierten Fettsäure in den benignen Zellen beobachtet, aber auch eine Anreicherung in den Malignen. Nach 24 Stunden Inkubationszeit hingegen nahmen die malignen, wie auch die benignen Zellen unerwartet hohe Mengen der Palmitinsäure auf.
Eine Steigerung dieser Aufnahme durch die Hemmung mit C75 war nicht nachzuweisen.
Hingegen die benigne Zellreihe RWPE, wie auch die PrEc nahmen deutlich geringere Mengen der Fettsäure nach Hemmung der FAS auf.
Erklärend muss eingewandt werden, dass die Literatur bei dieser Beobachtung, des Verzichts auf die Aufnahme von exogenen Fettsäuren, meist von in vivo Versuchen spricht. In Vitro besteht anscheinend für die Zellen kein derartiger Selektionsvorteil für die endogene Fettsäurebiosynthese. Den Zellen werden durch ihre Kulturmedien konstant alle benötigten Nährstoffe angeboten. Desweiteren entsteht bei adhärenten Zellrasen kein hypoxisches Milieu in dem auf eine anaerobe Glykolyse zurückgegriffen werden muss, wie dies in Tumorgeweben der Fall ist. Die Karzinomzellen behalten laut Literatur ihren glykolytischen und lipogenischen Phänotyp bei.[53,56,62,67,73]
Die differenten Ergebnisse erklären sich vermutlich durch die in vivo vorhandene avaskuläre Umgebung der malignen Zellen. Die Zellen müssen sich an die hypoxische Umgebung anpassen, indem sie einen anaeroben Stoffwechsel bevorzugen, wodurch sie auch in der Abwesenheit von Sauerstoff noch metabolisch aktiv sein können.[64] Dies wird durch den Warburg Effekt beschrieben.[55] Unter diesen Bedingungen entstehen bei der Glykolyse Laktat, welches die Atmungskette hemmt und so eine Energieproduktion verhindert. Um diese Sauerstoffarmut auszugleichen, aktiviert die Zelle den Fettsäurebiosynthese- Stoffwechselweg um Reduktionsäquivalente, wie NADPH zu produzieren. Eine Akkumulation von NADPH führt zur Aktivierung von Sauerstoffradikalbildnern, wie zum Beispiel NADPH- Oxidase.[56]
Eine exzessive Aufnahme von Glukose und Fettsäuren wird in prämalignen Stadien des PCas, als Wachstumsvorteil bei der Belastung durch Sauerstoff- und Nährstoffarmut beschrieben.[80] Eine Hemmung der Fettsäurebiosynthese führt zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose, unabhängig vom Gehalt an freien Fettsäuren im Blut.[81] Die Aktivierung der Biosynthese von Fettsäuren produziert Laktat und sorgt für eine Azidose im Extrazellularraum, dieser niedrige pH

stimuliert die Aktivität des FAS-Promotergens und hilft den maligen Zellen eine Resistenz zum Beispiel gegen Chemotherapeutika zu entwickeln.[60,56] Um sich an den niedrigen pH zu gewöhnen, müssen die Zellen auch die Anzahl ihrer GLUT1 Rezeptoren erhöhen. Es existiert eine Co- expression von FAS und GLUT1 Genen.[82,83] Dieser hohe Energiebedarf korreliert mit der undifferentierten und aggressiven Form von Tumoren. Weiterhin wird durch die Azidose der Hypoxie-induced factor 1α (HIH1α) hochreguliert. HIH1α aktiviert Zielgene und Signalinduktionswege einschließlich der Expression von FAS und GLUT1 unabhängig vom Sauerstoffgehalt. Bei normalem Sauerstoffgehalt können Tumorzellen über eine hohe Expression von HIH1α und VEGF Hypoxie-ähnliche Signalwege induzieren, zum Beispiel die hohe Expression von FAS.[84,85,86] Dieser Weg der gesteigerten FAS- Synthese ohne Sauerstoffmangel ist die mögliche Erklärung für die bereits im PIN gesteigerte FAS- Expression. In einer Zellkultur besteht ebenfalls kein Sauerstoffmangel, die in der Literatur beschriebene FAS-Steigerung in vitro könnte also auch hier auf oben genanntem Mechanismus beruhen.

Die genutzten Zellen befanden sich bereits in hohen Passagen, möglicherweise veränderten die benutzten Zellen die auf ihnen vorhandene Anzahl an Fettsäuretransporter und steigerten so ihre Aufnahme an den zugegebenen Fettsäuren. Starke Adipositas zählt bereits zu den Risikofaktoren, welche in vivo eine solche Steigerung der Fettsäuretransporter, wie auch der Glucosetransporter bewirken. Neue Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen dem PCa und Übergewicht auf.[87,16]

Das Alter der Zellen könnte oben beschriebenen möglichen Induktionsweg der FAS über HIH1α und VEGF gehemmt haben und so zu den Differenzen in den Ergebnissen geführt haben.

Weiterhin ist C75 bekannt, als Inhibitior mit signifikanter Affinität zu anderen Proteinen. Somit kann die unbefriedigende Senkung der Aufnahme der Fettsäuren eventuell auf eine Interaktion des C75 zurückzuführen sein.[88]

Aufgrund der unerwartet hohen Daten für die markierten Radiofettsäuren muss weiterhin in Betracht gezogen werden, dass die lipophilen Fettsäuren sich an der ebenfalls lipophilen Aussenmembran der Zellen angelagert haben. So ist eine Verzehrung der erhobenen Werte erklärbar. Dies müsste in weiteren Versuchen ausgeschlossen werden.

Palmitinsäure stellt das Endprodukt der Fettsäurebiosynthese dar, deshalb wurde ein Versuch mit einer Vorläuferfettsäure der Palmitinsäure gestartet. Bei dem gleichartig gestalteten Versuch mit ^{14}C- Myrestinsäure, welche aus 14 Kohlenstoffatomen besteht, sollten die Zellen erwartungsgemäß die Myrestinsäure über den FAS Komplex zu Palmitinsäure umbauen um diese in Plasmamembranen integrieren zu können.
Hier zeigte sich eine ebenfalls sehr hohe Aufnahme der Fettsäure in alle verwendeten Zelllinien. Nach 24 h nahm die benigne Zelllinie RWPE den höchsten Anteil der Myrestinsäure auf im Vergleich zu den malignen Zelllinien. Der Unterschied zwischen benignen und malignen Zelllinien war sehr gering.
Alle Zelllinien zeigten eine geringgradige Abnahme der Myrestinsäureaufnahme bei dem Versuch mit C75, diese Inhibition ist nicht signifikant zu nennen. Vermutlich nutzten die Zellen die Myrestinsäure ohne weitere Umbauprozesse für die Membranen oder die posttranslatorischen Modifikationen, z.B. Anhängen von Fettsäuren an Enzyme zur Schaffung von Cholesterin- reichen Mikrodomänen. Dies ermöglicht den Transport von geladenen Proteinen durch die unpolare Membran. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung des Sachverhalts besteht in der Verlängerung zu Palmitinsäure über die ACLS, welche nicht durch C75 hemmbar ist.[78,89]

Da in den Versuchen nicht erwartete Ergebnisse auftraten, sollte die gesteigerte de novo Synthese der malignen Zellen im Vergleich zu den Benignen nachgewiesen werden.
Hierfür wurde den Zellen die Ausgangssubstanz für die Biosynthese von Fettsäuren Acetat zugegeben, hier zeigte sich eine deutlich höhere Aufnahme in die malignen Zellen, hingegen die PrEc nahm sehr wenig markiertes Acetat auf.
Die maligne Zelllinie LNCaP-C4-2 nahm große Mengen des zugeführten Acetats auf und führte dies wahrscheinlich der Fettsäurebiosynthese zu. Die geringe Aufnahme in die PrEc erklärt sich, indem Acetat in den TCA Zyklus eingebaut wurde.[18,32]

Dies belegt die vermehrte Fettsäurebiosynthese der verwendeten malignen Zellen im Gegensatz zu den Benignen.

Nun sollte die bisherige Standardtechnik Cholin auf die Aufnahme in die malignen und benignen Zelllinien getestet werden. Bei diesem Versuch nahm die benigne Zelllinie RWPE die geringste Menge an Cholin auf, allerdings die BPH-1 lies sich anhand der Quantität des aufgenommenen Cholins nicht von den Karzinomzellen unterscheiden. Dies stellt aber auch das tatsächliche diagnostische Defizit des Cholin- PETs dar.[27]

4.2. Lokalisation der aufgenommenen Fettsäuren

Da die maligen Zellen entgegen der Erwartungen deutliche Mengen der exogen zugeführten Fettsäuren aufnahmen, anstatt wie in vielen Arbeiten vorbeschrieben die eigenen Fettsäuren herzustellen, wurde der Weg der markierten Fettsäuren nachvollzogen. Nach Inkubation mit Palmitinsäure wurden die Zellen der Lipidextraktion zugeführt. Die Zellen wurden nach 2 und 24 Stunden Inkubation mittels Lipidextraktion und anschließender Dünnschichtchromatographie untersucht.

Bei der Dünnschichtchromatographie nach 2 Stunden war die Palmitatfraktion noch stark ausgeprägt, diese war bei 24 Stunden kaum noch vorhanden. Hier zeigte sich für die malignen Zelllinien eine deutlich höhere Umwandlung der Palmitinsäure in Phospholipide. Zwischen den malignen Zelllinien war diese Phospholipidfraktion in den LNCaP-C4-2 Zellen am höchsten, allerdings in allen anderen Malignen gegenüber den Benignen auch erhöht. Hingegen die benignen Zellen zeigten vermehrt Triglyceridakkumulationen und eine schwächere Ausbildung der Phospholipidbanden.

Insgesamt passen diese Ergebnisse zu den Wachstumseigenschaften der Zelllinien. Die malignen Zellen haben deutlich höhere Proliferationsraten und müssen um sich teilen zu können, viel Membranmaterial herstellen, dies geschieht aus den gebildeten Phospholipiden. Die benignen Zellen verwandeln die zugeführte Palmitinsäure vor allem zu Speicherzwecken in Triglyceriden.[90,91.92]

4.3. FAS Expression in Prostatazellen

Die Fettsäuresynthase ist das Hauptenzym der Biosynthese der Fettsäuren und in verschiedenen Tumoren deutlich erhöht. Um die Unterschiede in der Expression

des Enzyms FAS in Karzinomen im Gegensatz zu benignen Geweben zu eruieren, führte ich eine Fluoreszenzfärbung durch.

In den Fluoreszenzfärbungen waren in den Tumorgeweben insbesondere LNCaP-C4-2 und LNCaP die stärksten Fluoreszenzeffekte und in den benignen Zelllinien RWPE, BHP- 1 und PrEc eine deutlich Schwächerer detektierbar. Die schwache Anfärbung beruhte zum größten Teil auf Kreuzreaktionen mit IgG, wie die Isotopenkontrolle nahe legt. Somit lag in den Tumorzellen eine höhere Konzentration des FAS- Enzyms vor. Um dieses Ergebnis verifizieren zu können, wurde ein Western Blot durchgeführt.

Hier zeigte sich das FAS Enzym als Protein in Form einer Bande bei 260 kDa. Die stärkste Bande war eindeutig bei der Zelllinie LNCaP-C4-2 zu beobachten. Die benignen Zellen hingegen zeigten nur gering ausgeprägte Banden. Dieses Ergebnis korrelierte sehr gut mit dem der Fluoreszenzfärbung.

Die höchste Expression zeigten in der Literatur die schlecht differenzierten und metastasierenden androgenunabhängigen Tumore. LnCAP-C4-2 ist eine repräsentative Zelllinie für einen aggressiven androgenunabhängigen Tumor.[32,48,93]

LNCaP, wie auch PC3 Zellen sind durch Androgenzufuhr in der FAS Synthese steigerbar. Die Überproduktion ist an die Expression von Progesteron- und Östrogenrezeptoren gekoppelt.[51] In Hormonsensitiven Zellen ist die FAS Expression gesteigert, wie zum Beispiel während des Menstruationszyklus im Endometrium oder im Brustgewebe bei Laktation oder Schwangerschaft.[48,94] Dies erfordert komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen Hormonen, einschließlich Prolaktin, Kortison, Insulin und Progestin. Bei maligner Entartung liegt eine Mutation im Genom des Androgenrezeptors vor, da diese eine abweichende Ligandenspezifität für Steroide besitzen. Androgene induzieren einen Anstieg der neutralen Lipidvakuolen in LNCaP Zellen, in denen hauptsächlich Triglyceride und Cholesterin enthalten sind. Die FAS Expression korreliert mit Lipidakkumulationen in der Zelle sowie der erhöhten Proliferation der Zellen und der PSA- Sekretion.[44,95]

4.4. Prozess der FAS Expression auf DNA Ebene

Durch Fluoreszenzfärbung und Western Blot nachgewiesen, war in den malignen Zellen die Konzentration des Enzyms FAS gesteigert. Um weiterhin nachzuweisen, ob dies schon auf Genebene der Fall war, wurde eine PCR-Analyse durchgeführt.

In der PCR Analyse der Zelllinien zeigten sich deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Banden. Die maligen Zelllinien zeigten stärker ausgebildete Banden, als die benignen Zelllinien. Somit waren auch die ensprechenden Gene für das Enzym FAS in den malignen Zellen gegenüber den Benignen deutlich vermehrt.

Durch die erhöhte Expression des FAS- Gens scheint die Zelle einen Überlebensvorteil zu erhalten. Einige Studien zeigen, dass die Inhibition des FAS-Gens in malignen Zelllinien mit RNA- interference Methoden zum Ausschalten entsprechender DNA- Sequenzen oder durch chemische Inhibitoren Apoptose induzieren.[15,64] Die Phospholipidbiosynthese ist am stärksten während der G1 und S Phase des Zellzyklus, in Vorbereitung auf die anstehende Zellteilung. Die Blockade des FAS- Gens inhibiert schnell und potent die DNA- Replikation, indem es denn Zellzyklus vor der G1 Phase über Cyclin- abhängige Kinaseinhibitoren p21 und p27, BRCA1, SKP2 und NFκB stoppt.[56,73,74,96]

Es gibt verschiedene Erklärungsmodelle für die Steigerung der Expression der FAS bei Malignomen. Die Expression wird über Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren gesteuert. Hier sei als wichtigster der epidermal growth factor (EGF) und dessen Rezeptor (EGFR) genannt.[97] Diese Aktivierung erfolgt über komplexe noch nicht komplett verstandene Signaltransduktionswege. Ein Faktor ist der in malignen Zellen reduzierte Antagonist PTEN (phosphatase and tensin homoloque). Bei pharmakologischer Inhibition von PTEN ist die FAS Expression vermindert. Die FAS Expression konnte mit einer aktivierten Akt in LNCaP Zellen über die Expression von PTEN wieder aktiviert werden. Der aktivierte Weg über Akt und die Verminderung von PTEN führen zu der Überexpression von FAS beim Prostatakarzinom.[56,98]

Weiterhin kann der Transduktionsweg über die MAPK (mitogen- aktivated Protein kinase) und ERK1/2 (extracellular signal- regulated kinase) gesteigert werden.

Hier sind die Steroid Hormone involviert (SH), welche in den hormonsensitiven Geweben über Androgen und Progestin die FAS Genexpression steigern. Die Regulationseffekte der Steroidhormone auf die FAS- Genexpression, die Verringerung des SR (Steroidrezeptor), ER ,PR und AR benötigt auch die Aktivierung der PI3K –Akt und ERK1/2 Signaltransduktionswege.[99,100] Es besteht eine Korrelation der FAS Biosynthese durch die Modulation der Expression, sowie Aktivität des sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1 c). Viele pro– und anti- lipogene Baustoffe, für allosterische Effekte, sowie Hormone stimulieren die FAS Transkription durch die Interakton am SREBP1 c am FAS- Promotor. Tumorzellen zeigen sich allerdings im Gegensatz zu benignen Zellen unempfänglich für Inhibition durch Nahrungsbausteine, dieser allosterische Effekt wurde durch Mutation gelöscht. In benignen Zellen erfolgt eine Regulation durch Hormone, inhibitorisch wirken Leptin, Glucagon und cyclisches AMP, stimulierend wirken hingegen Insulin, Trijodothyronin und Glukokortikoide. Bei malignen Zellen führt eine Stimulation von aberrierenden GF und GFR, sowie SH und SHR zu einer Expression und Aktivierung des SREBP1 c.[101] Somit führt eine Inhibition von PI3K und MAPK zu einer Verminderung von SREBP1c und somit zur Reduktion von FAS Transkription. Akt stimuliert die Synthese und nukleare Akkumulation von aktiviertem SREBP1 c, auch SH können die proteolytische Aktivierung von SREBP1c induzieren und führen so zu einer gesteigerten Expression von FAS.[102,103]

Auch posttranslationelle Regulationen im Prostatakarzinom können die Überexpression von FAS induzieren, zum Beispiel die Interakton mit ubiquitin-spezifischer Protease (USP2a), welche Ubiquitin verdrängt und so den FAS Genkomplex stabilisiert. Eine Inhibition der USP2a führt zu Stagnation im Zellwachstum und induziert Apoptose. Daten vom Prostatakarzinom zeigen eine Korrelation zwischen erhöhter FAS Expression und erhöhter USP2a Expression. Die Manifestation der erhöhten FAS Expression zeigt sich somit als Ergebnis einer bereits auf Genebene vorgeschalteten FAS Transkriptionssteigerung aufgrund von veränderten Induktionsfaktoren.[104]

4.5. FAS Expression in Geweben

Vorangehende Ergebnisse wiesen die gesteigerte Expression und Funktion der FAS in malignen Zellen nach. Es wurde angestrebt diese gesteigerte Expression auch in Gewebeschnitten von bereits bekannten Patientenbiopsien nachzuweisen.
Es wurde eine Immunzytochemie zur Verifikation der FAS- Expression in Geweben an bekannten Befunden ausgeführt. Die Untersuchungsergebnisse standen aus der Pathologie zum Vergleich der Färbung mit den dort beschriebenen Befunden zur Verfügung.
Bei Patient 1 zeigte sich intrazellulär eine Anfärbung des FAS- Enzyms, im Biopsiebefund wurde hier von einem azinösen Adenokarzinom Gleason Score 6 ausgegangen, mit Tumorformel pT2c pN0, pMx. Der hier untersuchte Tumor zeigt eine deutliche FAS- Expression.
Bei dem zweitem Patient zeigte sich keine Anfärbung bei Behandlung mit anti-FAS Antikörper, der histologische Befund bestätigte eine benigne Prostatahyperplasie. Die BPH bei Patient 2 wies keine gesteigerte FAS-Expression auf.
In vitro konnte nach Anfärbung der Stichproben eine deutliche FAS-Expressionssteigerung in malignen gegenüber benignen Geweben beobachtet werden. Im Züricher Schema zur histologischen Diagnostik ist die Färbung von Prostatabiopsien mit FAS bereits berücksichtigt und wird so bald große Fallzahlen mit repräsentativen Ergebnissen erzielen.
Es gibt heute keine verlässliche Möglichkeit durch Bildgebung eine klare Unterscheidung zwischen der BPH und dem PCa zu treffen. Durch die hier postulierten Ergebnisse stellt die FAS ein Ziel weiterer Forschung dar, um mittels geeigneter Tracer eine neue diagnostische Möglichkeit zu finden, um auch zwischen BPH und PCa unterscheiden zu können.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit versuchte ein Target für neue Substanzen zur Detektion des Prostatatkarzinoms mittels bildgebender diagnostischer Verfahren zu identifizieren, um noch bestehende Lücken, z. B. der Unterscheidung zwischen benigner Prostatahyperplasie, Karzinom und Prostatitiden zu schließen. Durch die Besonderheit des Prostatakarzinoms, der gesteigerten Lipidsynthese, stellte das Hauptenzym dieser Fettsäurebiosynthese ein vielversprechendes Target dar. Die Untersuchungen erfolgten mit verschiedenen malignen und benignen Zelllinien, sowie primären Prostataepithelzellen (PrEc). Die malignen Zelllinien zeigten deutlich stärkere zytoplasmatische Anfärbungen bei der Fluoreszenzmikroskopie, als die Benigen und PrEc. Dies wurde mittels Western Blot verifiziert. Um diese Expression auch auf Genenbene nachzuweisen, wurde die entsprechende RNA gewonnen, in DNA transferiert und mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Auch hier zeigten die malignen Zelllinien eine gesteigerte Expression dieses Gens im Vergleich zu den benignen Zellen. Bei den zellulären Aufnahmeuntersuchungen mit unterschiedlichen radioaktiv markierten Fettsäuren, zeigten sich divergierende Ergebnisse zur derzeitigen Literatur. In vitro konnte die exzessive de novo Biosynthese der Fettsäuren trotz ausreichend zugeführten exogenen Fettsäuren nicht nachgewiesen werden. Die Zellen nahmen die zugeführten Fettsäuren auf, und eine Steigerung der Aufnahme nach Hemmung der endogenen Fettsäurebiosynthesse konnte nicht postulieren werden.

Um Unterschiede zwischen malignen und benignen Zelllinien hinsichtlich der Verwendung der aufgenommenen Fettsäuren zu erforschen, wurde eine Lipidextraktion mit anschließender Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Hier zeigte sich, dass maligne Zelllinien die aufgenommene Fettsäure hauptsächlich in Phospholipide einbauen, während die benignen Zellen das Speicherprodukt Triglyceride favorisierten.

Anschießend wurden diese Ergebnisse versucht auf Gewebe zu übertragen. Patientenbiopsiematerialen bekanner Befundkonstellation wurden mit anti- FAS AK inkubiert. In den Karzinomproben konnte eine deutliche Anfärbung der Zellen durch Detektion der Überexpression von FAS (Fettsäuresynthase) aufgezeigt und von denen der benignen Hyperplasie unterschieden werden.

Bei allen Versuchen wurde die murine TRAMP Zellllinie mitgeführt, diese verhielt sich nicht signifikant unterschiedlich zu humanen Karzinomlzelllinien. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und den in der Literatur beschriebenen Verhalten der Karzinomzellen in vivo, erscheinen weitere Versuche, insbesondere ein geeignetes Tiermodell vielversprechend.

6. Literaturverzeichnis

[1] **Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P.** (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol 76,* 456-463

[2] **Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A.** (2010) Krebs gesamt, 19-23, Robert Koch-Institut, Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends, 7.Ausgabe, Berlin

[3] **Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M.** (2006) Cancer statistics 2006. *Cancer J 56,* 106-130

[4] **Steineck, G., Helgesen, F., Adolfsson, J., Dickman, P.W., Johansson, J.E., Norlen, B.J., Holmberg, L.** (2002) Quality of life after radical prostatectomy or watchful waiting. *N Engl J Med 347,* 790-796

[5] **Pandian,S., Eremin,O., McClinton, S., Wahle, K., Heys, S.** (1999) Fatty acid and prostate cancer: current status and future challenges. *J R Coll Surg Edinb 44,* 352-361

[6] **Paris, P.L., Albertson, D.G., Alers, J.C., Andaya, A., Carroll, P., Fridlyand, J., Jain, A.N., Kamkar, S., Kowbel, D., Krijtenburg, P.J., Pinkel, D., Schroder, F.H., Vissers, K.J., Watson, V.J., Wildhagen, M.F., Collins, C., Van Dekken, H.** (2003). High-resolution analysis of paraffinembedded and formalin-fixed prostate tumors using comparative genomic hybridization to genomic microarrays. *Am J Pathol 162,* 763-770

[7] **Hautmann, R., Huland, H.** (2006), Prostata, 17-19, Urologie, 3. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York

[8] **Luboldt, H.J., Bex, A., Swoboda, A., Husing, J., Rubben, H.** (2001). Early detection of prostate cancer in Germany: a study using digital rectal examination and 4.0 ng/ml prostate-specific antigen as cutoff. *Eur Urol 39,* 131-137

[9] **Bubendorf, L., Schopfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T., Mihatsch, M.** (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol 31,* 578-583

[10] **Wirth, M., Weißbach, L., Ackermann, R., Alberti, W., Albrecht, C., Göckel-Beining, B., Fröhner, M., Hinkelbein, W., Miller, K., Rübben, H., Wiegel, T., Wolff, J., Wörmann, B.** (2009) Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms

[11] **Sakr, W.A., Partin, A.W.** (2001). Histological markers of risk and the role of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*, 57, 115-120

[12] **Prowatke, I., Devens, F., Benner, A., Grone, E., Mertens, D., Grone, H., Lichter, P., Joos, S.** (2007). Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *Br J Cancer 96,* 82-88

[13] **Häußler, J., Rösch, K., Paiss, T., Vogel, W.** (2000) Genetische Disposition zum Prostatakarzinom. *Reproduktionsmedizin 16*, 420-427

[14] **Bianchi- Frias, D., Pritchard, C., Mecham, B., Coleman, I., Nelson, P.** (2007) Genetic background influences murine prostate gene expression: implications for cancer phenotypes. *Genome Biol 8,* 117-119

[15] **Eeles, R., Kote-Jarai, Z., Giles, G.** (2008) Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet 40,* 316-321

[16] **Mehdad, A., McBride, E., Grillo, I., Camilo, M., Ravasco, P.** (2010) Nutritional status and eating pattern in prostate cancer patients. *Nutr Hosp 25,* 422-427

[17] **Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N., Mitchell, R.** (2007) Prostate, 697-700, Saunders, 8.Eddition, Basic Pathology, Elsevier, München Jena

[18] **Vavere, A.L., Kridel, S.J., Wheeler, F.B., Lewis, J.S.** (2008) ^{11}C-Acetate as a PET Radiopharmaceutical for Imaging Fatty Acid Synthase Expression in Prostate Cancer. *J Nucl Med 1008,* 327- 334

[19] **Dearnaley, D., Hall, E., Lawrence, D., Huddart, R., Eeles, R., Nutting, C., Gadd, J., Warrington, A., Bidmead, M., Horwich, A.** (2005) Phase III pilot study of dose escalation using conformal radiotherapy in prostate cancer: PSA control and side effects. *Br J Cancer 95,* 488-498

[20] **Albertsen, P., Hanley, J., Penson, D., Fine, J.** (2004). Validation of increasing prostate specific antigen as a predictor of prostate cancer death after treatment of localized prostate cancer with surgery or radiation. *J Urol 171*, 2221-2225

[21] **Perron, L., Moore, L., Bairati, I., Bernard, P.M., Meyer, F.** (2002) PSA screening and prostate cancer mortality. *Can Med Asso J 166*, 586-591

[22] **Maattanen, L., Hakama, M., Tammela, T., Ruutu, M., Ala-Opas, M., Juusela, H., Martikainen, P., Stenman, U., Auvinen, A.** (2007) Specificity of serum prostate-specific antigen determination in the Finnish prostate cancer screening trial. *Br J Cancer 96,* 56-60

[23] **Honma, I., Torigoe, T., Hirohashi, Y., Kitamura, H., Sato, E., Masumori, N., Tamura, Y., Tsukamoto, T., Sato, N.** (2009) Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostate cancer. *J Transl Med* 7, 1-11

[24] **Kristiansen, G.** (2009) Immunhistochemische Algorithmen in der Prostatadiagnostik. *Pathologe 30,* 146–153

[25] **Gleason, D.F., Mellinger, G.T.** (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological Grading and clinical staging. *J Urol 111,* 58-64

[26] **Kwee, S., Wei, K., Sesterhenn, i., Yun, D., Coel, M.** (2006) Localization of primary prostate cancer with dual-phase 18F- Fluorocholine PET. *J Nucl Med 47,* 262-269

[27] **Reske, S.** (2009) Multimodale molekulare Bildgebung des Prostatakarzinoms. *Nuklearmedizin 32,* 105-114

[28] **Reske, S., Blumstein, N., Glatting, G.** (2006) PET und PET/CT in der Rezidivdiagnostik des Prostata-Karzinoms. *Urologe A 45,* 1240-1250

[29] **Hara, T., Kosaka, N., Kishi, H.,** (1998) PET imaging of prostate cancer using carbon-11-choline. *J Nucl Med 39,* 990-995

[30] **Oyama, N., Miller, T., Dehdashti, F.** (2003) 11C-Acetate PET Imaging of prostate cancer: detection of recurrent disease at PSA relapse. *J Nucl Med 44,* 549-555

[31] **Briere, J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A., Rustin, P.** (2006) Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *J Physiol Biochem 291,* C1114-C1120

[32] **Franklin, R., Juang, H., Zou, J., Costello, L.** (1995) Regulation of citrate metabolism by androgen in the LNCaP human prostate carcinoma cell line. *Nat Genet 64,* 603-607

[33] **Kotzerke, J., Volkmer, B., Glatting, G.** (2003) Intraindividual camparison of 11C-Acetate and 11C- Choline PET for detection of metastases of prostate cancer. *J Nucl Med 42,* 25-30

[34] **Emonds, K, Swinnen, J., Mortelmans, L., Mottaghy, F.** (2009) Molecular imaging of prostate cancer. *J Nutr 102*, 193-199

[35] **Mycielska, M., Patel, A., Rizaner, N., Mazurek, M., Keun, H., Patel, A., Ganapathy, V., Djamgoz, M.** (2009) Citrate transport and metabolism in mammalian cells. *Bioessays 31,* 10-20

[36] **Carroll, P., Coakley, F., Kurhanewicz, J.** (2006) Magnetic resonance imaging and spectroscopy of prostate cancer. *Rev Urol 8,* 4-10

[37] **Hricak, H., Choyke, P., Eberhardt, S., Leibel, L., Scardino, P.** (2007) Imaging prostate cancer: a multidisciplinary perspektive. *Radiology 43,* 28-53

[38] **Albertsen, P., Hanley, J., Fine, J.** (2005) 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *JAMA, 293,* 2095-2101

[39] **Gimeno,R.** (2007) Fatty acid transport proteins. *Lipids 18,* 271-276

[40] **Doege, H., Stahl, A.** (2006) Protein-mediated fatty acid uptake: Novel insights from in vivo models. *Am J Physiol 15,* 259-268

[41] **Löffler, G., Petrides, P.** (2003) Regulation von Synthese und Abbau von Fettsäuren, 457-460, Biochemie und Pathobiochemie, 7. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg, New York

[42] **Beckers, A., Organe, S., Timmermans, L., Scheys, K., Peeters, A., Brusselmanns, K., Verhoeven, G., Swinnen, J.** (2007) Chmeical linhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res 67,* 8180-8187

[43] **Kuhajda, F.** (2006) Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res 66,* 5977-5980

[44] **Swinnen, J., Brusselmans, K., Verhoeven, G.** (2006) Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel target. *Clin Nutr 9,* 358-365

[45] **Löffler, G., Petrides, P.** (2003) Regulation des Stoffwechsels von Fettsäuren und Triacylglycerinen, 455-457, Biochemie und Pathobiochemie, 7. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg, New York

[46] **Liu, Y.** (2006) Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis 9,* 230-234

[47] **Sul, H., Wang, D.** (1998) Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3 phosphate acyltransferase gene transcription. *Ann Rev Nutr 18,* 331-351

[48] **Kusakabe, T., Maeda, M., Hoshi, N., Sugino, T., Watanabe, K., Fukuda, T., Suzuki, T.** (2000) Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone- sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells. *J Histochem Cytochem 48,* 613-622

[49] **Asturias, F.** (2005) Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids 39*, 1045-1053

[50] **Monaco, M., Creighton, C., Lee, P., Zou, X., Topham, M., Stafforini, D.** (2010) Expression of long-chain fatty acyl-CoA synthetase 4 in breast and prostate cancers is associated with sex steroid hormone receptor negativity. *J Transl Oncol 3,* 91-98

[51] **Gerber, M**. (2010) Background review paper on total fat, fatty acid intake and cancers. *Ann Nutr Metab 55,* 140–161

[52] **Mobbs, C., Makimura, H**. (2002) Block the FAS, lose the fat. *Nat Med 8*, 335-336

[53] **Thupari, J., Pinn, M., Kuhajda, F.** (2001) Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun 285,* 217-223

[54] **Wakil, S.** (2004) Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids 39,* 1045-1053

[55] **Warburg, O.** (1956) Respiratory impairment in cancer cells. *Science 124,* 269-270

[56] **Menendez, J., Lupu, R.** (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer 7*, 763-777

[57] **Gatenby, R.** (2006) Acid- mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res 66,* 5216-5223

[58] **Smalbone, K.** (2007) Metabolic changes during carcinogenesis: potential impact on invasiveness. *J Theor Biol 244,* 703-713

[59] **Hochachka, P.** (2002) Going malignant: the hypoxia- cancer connection in the prostate. *Bioessays 24,* 749-757

[60] **Gatenby, R., Gilles, R.** (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer 4,* 891-899

[61] **Hayward, S., Dahiya, R., Cunha, R., Bartek, J., Deshpande, N., Narayan P.** (1995) Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *Soc Nat Resour 8,* 14-24

[62] **Pizer, E.** (1996) Fatty acid synthase (FAS): A target for cytotoxic metabolites in HL60 promyelocitic leukemia cells. *Cancer Res 56,* 745-751

[63] **Wang, C., Xu, C., Sun, M., Luo, D., Liao, D., Cao, D.** (2009) Acetyl-CoA carboxylase-α inhibitor TOFA induces human cancer cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun 31,* 302–306

[64] **Migita, T., Ruiz, S., Fornari, A.** (2009) Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. *J Nat Cancer Inst 101,* 519–532

[65] **López, M., Diéguez, C.** (2007) C75, a fatty acid synthase (FAS) inhibitor. *Br Med J 71,* 53-62

[66] **Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., Rossetti, L.** (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes 51,* 271-275

[67] **Pizer, E., Thupari, J., Han, W., Pinn, M., Chrest, F., Frehywot, G., Townsend, C., Kuhajda, F.** (2000) Malonyl- coenzyme- A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res 60,* 213-218

[68] **Zhou, W., Simpson, J., McFadden, J., Townsend, C., Medghalchi, S., Vadlamudi, A., Pinn, M., Ronnett, G., Kuhajda, F.** (2003) Fatty Acid Synthase Inhibition Triggers Apoptosis durng S Phase in Human Cancer Cells. *Cancer Res 63,* 7330-7337

[69] **Teichert, F., Verschoyle, R., Greaves, P., Edwards, R., Teahan, O., Jones, D., Wilson, I., Farmer, P., Steward, W., Gant, T., Gescher, A., Keun, H.** (2008) Metabolic profiling of transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) tissue by `H-NMR analysis: Evidence for unusual phospholipid metabolism. *Prostate 68,* 1035-1047

[70] **Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem 72,* 248-254

[71] **Laemli, U., Beguin, F., Gujer- Kellenberger, G.** (1970) A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol 14,* 69-85

[72] **Kuhajda, F.** (2000) Fatty- acid Synthase and human cancer: new perspektives on its role in tumor biology. *Nutrition 16,* 202-208

[73] **Menendez, J.** (2004) Novel signaling molecules implicated in tumor- associated fatty acid synthase-dependent breast cancer cell proliferation and survival: a role of exogenous dietary fatty acids, p53-p21WAF1/CIP1, ERK1/2 MAPK, p27KIP1, BRCA1, and NF-κB. *Int J Oncol 24,* 591-608

[74] **Costello, L., Franklin, R.** (2006) Tumor cell metabolism: the marriage of molecular genetics and proteomics with cellular intermediary metabolism: proceed with caution. *Mol Cancer 5,* 59-60

[75] **Hatzivassiliou, G.** (2005) ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell 8,* 311-321

[76] **Milgraum, L.** (1997) Enzymes of the fatty acid synthase pathway are highly expressed in *in situ* breast carcinoma. *Clin Cancer Res 3,* 2115-2120

[77] **Menendez, J., Lupu, R.** (2006) Oncogenic properties of the endogenous fatty acid metabolism: molecular pathology of fatty acid synthase in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care 9,* 346-357

[78] **Watkins, P.** (2008) Very- long- chain acyl- CoA synthetases. *J Biochem 283,* 1773-1777

[79] **Menendez, J.** (2004) Overexpression and hyperactivity of breast cancer- associated fatty acid synthase (oncogenic antigen- 519) is insensitive to normal arachidonic fatty acid- induced suppression in lipogenic tissues but it is selectively inhibited by tumoricidal alpha- linolenic and gamma-linolenic fatty acids: a novel mechanism by which dietary fat can alter mammary tumorigenesis. *Int J Oncol 24,* 1369-1383

[80] **Zhao, W**. (2006) Fatty acid synthase: a novel target for antiglioma therapy. *Br J Cancer 95,* 869-878

[81] **Bandyopadhyay, S.** (2006) Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res 66,* 5934-5940

[82] **Chen, J., Brown, T., Russo, J.** (2009) Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochim Biophys Acta 7,* 1128–1143

[83] **Li, J.** (2006) Altered metabolic response to intermittent hypoxia in mice with partial deficiency of hypoxia- inducible factor- 1α. *Physiol Genomics 25,* 450-457

[84] **Thors, L., Bergh, A., Persson, E., Hammarsten, P., Stattin, P., Egevad, L., Granfors, T., Fowler, C.** (2010) Fatty acid amide hydrolase in prostate cancer: association with disease severity and outcome, CB1 receptor expression and regulation by IL-4. *PloS one 5,* 1-12

[85] **Menendez, J.** (2005) Does endogenous fatty acid metabolism allow cancer cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? Characterization of a novel molecular connection between fatty acid synthase (FAS) and hypoxia- inducible factor-1α (HIF- 1α)- related expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cancer cells overexpressing Her- 2/neu oncogene. *J Biochem 94,* 857-863

[86] **Robey, I.** (2005) Hypoxia-inducible factor- 1α and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia 7,* 324-330

[87] **Benedettini, E., Nguyen, P., Loda, M.** (2008) The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations. *Diagn Histopathol 14*,195–201

[88] **Richardson, R., Smith, J.** (2007) Novel antagonists of the thioesterase domain of human fatty acid synthase. *Mol Cancer Ther 6,* 2120-2126

[89] **Coleman, R., Lewin, T., Van Horn, C., Gonzalez- Baro, M.** (2002) “Do long- chain acyl- CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways?” *J Nutr 3166,* 2123-2126

[90] **Lin, H., Lu, J., Laflamme, P., Qiao, S., Shayegan, B., Bryskin, I., Monardo, L., Wilson, B., Singh, G., Pinthus, J.** (2010) Inter-related *in vitro* effects of androgens, fatty acids and oxidative stress in prostate cancer: a mechanistic model supporting prevention strategies. *Int J Oncol 37,* 761-766

[91] **Swinnen, J., Vanderhoydonc, F., Elgamal, A., Eelen, M., Vercaeren, I., Joniau, S., Van Poppel, H., Baert, L., Goossens, K., Heyns, W., Verhoeven, G.** (2000) Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer 15*, 176-179

[92] **Little, J., Wheeler, F., Fels, D., Koumenis, C., Krid, S.** (2007) Inhibition of fatty acid synthase induces endoplasmic reticulum stress in tumor cells. *Cancer Res 67,* 1262-1269

[93] **Van Veldhoven, P., Bell, R.** (1987) Effect of harvesting methods, growth conditions and growth phase on diacylglycerol levels in cultured human adherent cells. *Am J Gastroenterol 532*, 185-196

[94] **Pizer, E., Lax, S., Kuhajda, F., Pasternack, G., Kurman, R.** (1998) Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma. *Am J Clin Oncol 83,* 528-537

[95] **Wang, W. Sun, X., Epstein, J.** (2008) Partial atrophy on prostate needle biopsy cores: a morphologic and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol 32*, 851–857

[96] **Buzzai, M.** (2006) The glucose dependence of Akt- transformed cells can be reversed by pharmacological activation of fatty acid- beta oxidation. *Oncogene 24,* 4165-4173

[97] **Bandyopadhyay, S.** (2005) FAS expression inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI3- kinase inhibitor synergizes with FAS siRNA to induce apoptosis. *Oncogene 24,* 5389-5395

[98] **Porstmann, T., Griffiths, B., Chung, Y., Delpuech, O., Griffiths, J., Downward, J., Schulze, A.** (2005) PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Nat Rev Clin Oncol 146,* 6465-6481

[99] **Shah, U., Dhir, R., Gollin, S., Chandran, U., Lewis, D., Acquafondata, M., Pflug, B.** (2006) Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol,* 401-409

[100] **Uddin, S., Hussain, A., Ahmed, M., Abubaker, J., Al-Sanea, N., AbdulJabbar, A., Ashari, L., Alhomoud, S., Al-Dayel, F., Bavi, P., Al-Kuraya, K.** (2009) High prevalence of fatty acid synthase expression in colorectal cancers in Middle Eastern patients and its potential role as a therapeutic target. *Am J Gastroenterol 230,* 1-11

[101] **Zhang, D.** (2005) Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu- positive breast cancer. *Mol Cell Proteomics 4,* 1686-1696

[102] **Menendez, J., Colomer, R., Lupu, R.** (2005) Why does tumor- associated fatty acid synthase (oncogenic antigen- 519) ignore dietary fatty acids? *Med Hypotheses 64*, 342- 349

[103] **Zeng,L., Wu, G., Goh, K., Lee, Y., Ng, C., You, A., Wang, J., Jia, D., Hao, A., Yu, Q., Li, B.** (2008) Saturated fatty acids modulate cell response to DNA damage: Implication for their role in tumorigenesis. *PLoS One,* 1-9

[104] **Priolo, C.** (2006) The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. *Cancer Res 66,* 8625-8632

7. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Reske, dem Ärztlichen Direktor des Nuklearmedizinischen Instituts des Universitätsklinikums Ulm, der mir die Möglichkeit gab meine Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen, bedanken.

Der meiste Dank gilt Frau Dr. Morgenroth, die mit ihrer Betreuung und Engagement den größten Anteil am Zustandekommen dieser Dissertation hat. Ohne ihre Anleitung und unermüdliche Geduld wäre eine so zeitige Fertigstellung meiner Arbeit nicht vorstellbar gewesen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dinger, welche mich ebenfalls in vielen fachlichen Fragestellungen unterstützte.

Ich danke dem Institut für Pathologie für die Bereitstellung von Schnitten, dem Isotopenlabor, sowie dem Institut für Biochemie für die Möglichkeit der Mitbenutzung der Instrumente.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Name, Vorname: Graul, Isabel

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe keine Promotionsversuche an anderen Universitäten unternommen.

Es laufen keine Strafverfahren gegen mich.

.....
Datum, Unterschrift