Universität Ulm

Institut für Pathologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

Analyse des signalinduzierten Verlusts des Tumorsuppressors NKX3.1 in Prostatitis und Prostatakarzinomzellen

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

vorgelegt von

Josua Decker

aus Achern

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Marienfeld
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Cornelia Brunner
Tag der Promotion: 13.05.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

1 Einleitung **1**

1.1 Das Prostatakarzinom 1

1.2 Der Tumorsuppressor NKX3.1 5

1.3 Ziel der Arbeit 9

2 Material und Methoden **11**

2.1 Material 11

2.2 Methoden 30

3 Ergebnisse **40**

3.1 Einfluss verschiedener Zytokine und Entzündungsmediatoren auf die NKX3.1 Expression 40

3.2 Der EGF-induzierte Verlust von NKX3.1 ist ein genereller Regulationsmechanismus in PCa Zelllinien 43

3.3 Ko-Stimulation von Prostatakarzinomzelllinien mit PMA und Ionomycin führt zu verminderten NKX3.1-Proteinspiegeln 46

3.4 Stimulation von LNCaP-Zellen mit EGF und PMA + Ionomycin beeinflusst die Expression des Androgenrezeptors sowie der NKX3.1-Zielgene 47

3.5 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den durch EGF und PMA + Ionomycin induzierten Verlust von NKX3.1 50

3.6 Ein Entzug von Androgenen führt in LNCaP-Zellen zu einer Erniedrigung des NKX3.1-Proteinspiegels 61

3.7 Inhibition verschiedener Signalwege mittels siRNA und deren Einfluss auf den EGF vermittelten Verlust von NKX3.1 63

3.8 Einfluss von IL-1α, TNF-α und EGF auf das Wachstum von LNCaP-Zellen 69

3.9 Einfluss von PMA + Ionomycin oder EGF auf die Aktivität des NKX3.1-Promotors und den 3´UTR Bereiche des NKX3.1-Gens 71

3.10 Der Verlust von NKX3.1 nach EGF Stimulation resultiert nicht aus einer Herunterregulation des Androgenrezeptors 74
3.11 NKX3.1 Gehalt in gesunden, entzündlich infiltrierten und präneoplastisch veränderten Bereichen humaner Prostatae 76
3.12 Verteilung von NKX3.1 positiven Zellen in verschiedenen pathologisch veränderten Bereichen der Prostata 82

4 Diskussion **85**
4.1 Zusammenhang zwischen Prostatakarzinom und Prostatitis 85
4.2 Welche Stoffe führen im Entzündungsmilieu zu einem Verlust von NKX3.1 86
4.3 Welche Signalwege liegen dem induzierten Verlust von NKX3.1 zugrunde 88
4.4 Wechselwirkungen von Androgenen, dem Androgenrezeptor und NKX3.1 91
4.5 Expression von NKX3.1 in neoplastisch und entzündlich veränderten Bereichen humaner Prostatae 93

5 Zusammenfassung **98**

6 Literaturverzeichnis **100**
Tabellenverzeichnis 108

Abkürzungsverzeichnis

AMACR	Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase
APS	Ammoniumperoxysulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen respondierendes Element
BAY	BAY 11-7082 (IKK-Inhibitor)
BCA-1	B-Zell-Chemoattraktant-1
BIM-I	Bisindolylmaleimide-1
bp	Basenpaar
BRCA-1	Brustkrebsgen-1
CD	Cluster of differentiation, Unterscheidungsgruppen
cDNA	komplementäre DNA
CK	Kreatin-Kinase
CPPS	Chronisches pelvines Schmerz-Syndrom
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHT	Dihydro-Testosteron
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced (verbesserte) Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
FBS	Fötales bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gö	Gö 6983 (PKC-Inhibitor)
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
HDAC-1	Histondeacetylase-1
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure
HG-PIN	Höhergradige prostatisch intraepitheliale Neoplasie
IB	Immuno-Blot
IKK	IκB-Kinase
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium
Iono	Ionomycin
kD	Kilodalton
LNCaP-M	LNCaP-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
M1I	Mek-1-Inhibitor
MOPS	Morpholine-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NP-40	Nonidet P-40
NVP	NVP-BEZ235 (PI3K-Inhibitor)
P+I	PMA + Ionomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIA	Proliferativ entzündliche Atrophie
PIN	Prostatisch intraepitheliale Neoplasie
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Prostata-Medium
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonlyfluorid
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
RAMP1	Rezeptor Aktivität modifizierendes Protein 1
RKI	Robert Koch Institut
RLU	Relative Lichteinheiten (Relative Light Units)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SB21	SB 216763 (GSK-3-Inhibitor)
SB41	SB 415286 (GSK-3-Inhibitor)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sER	Glattes endoplasmatisches Retikulum

siRNA	Small interfering RNA, kleine eingreifende RNA
SKT	Schnellkochtopf
St.	Heißluftdämpfer (Steamer)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS-T	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMPRSS2	Transmembran Protease, Serin 2
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	Tris-Hydroxymethly-Aminomethan
TWEAK	TNF-verwandter, schwacher Apoptoseinduktor
VEGF	Vasculo-endothelialer Wachstumsfaktor

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist mit einer Inzidenz von 65.830 Neudiagnosen im Jahr 2010 und geschätzten 70.100 Neuerkrankungen in 2014 die häufigste Krebserkrankung bei Männern in Deutschland. Trotz einer relativen Fünfjahresüberlebensrate von 93% stellt das Prostatakarzinom aufgrund seiner hohen Inzidenz mit 12.676 Todesfällen (2010) die dritthäufigste Krebstodesursache nach dem Lungen- und dem Kolorektalkarzinom bei Männern in Deutschland dar. Dies machte in Deutschland 6% aller Krebstodesfälle im Jahre 2010 aus (RKI 2014; Todesursachenstatistik 2013).
Weltweit macht das Prostatakarzinom 14% aller Krebsneudiagnosen aus, wobei die Zahl der betroffenen Männer aufgrund der beständig alternden Weltbevölkerung stetig zunimmt und somit auch die Zahl der über 50-jährigen steigt (Jemal et al. 2011; Ferlay et al. 2010).
Bei einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren beträgt das 10-Jahres-Erkrankungsrisiko 6,6%, was in Deutschland zu einer standardisierten Erkrankungsrate von 111,4 pro 100.000 Männern (2010) führt (RKI 2014).

1.1.2 Risikofaktoren und Ursachen

Aufgrund des häufigen Auftretens wurden in großen epidemiologischen, klinischen und retrospektiven Studien bereits viele Risikofaktoren für die Entstehung des Prostatakarzinoms identifiziert, welche sich hinsichtlich ihrer Bedeutung erheblich unterscheiden.
Das größte Risiko stellt wie bei vielen Krebsarten das Alter des Patienten dar (10-Jahres-Risiko eines 40-jährigen: 0,1%; 10-Jahres-Risiko eines 70-jährigen: 6,6%) (RKI 2014; Ries und Eisner 2003; Hankey et al. 1999; Bankowski et al. 1986).
Die hereditäre Komponente stellt einen weiteren Risikofaktor dar. Bei Verwandten ersten Grades, wie z.B. bei Brüdern und Söhnen von Prostatakrebs-Patienten, ist das Risiko selbst an einem Prostatakarzinom zu erkranken um das zwei- bis dreifache er-

höht (Johns und Houlston 2003). Das genetische Risiko ist jedoch nicht alleine auf eine einzelne Mutation zu beschränken, sondern erstreckt sich auf verschiedene Gene und Loci. So konnte bisher zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen Mutationen in den Brustkrebsgenen 1 und 2 (BRCA-1/BRCA-2) und einem erhöhten Prostatakarzinomrisiko hergestellt werden (Leongamornlert et al. 2012; Kote-Jarai et al. 2011). Durch eine Mutation in einem dieser Tumorsuppressorgene wird die Funktion der jeweiligen BRCA1- und BRCA2-Proteine bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen wesentlich beeinträchtigt. Als Folge des verminderten DNA-Reparaturpotentials kommt es dann zu einer erhöhten Mutationsrate, was nachfolgend zu einer weiteren Zellschädigung bis hin zu maligner Entartung führen kann (Boulton 2006).
Weiterhin spielen auch Genfusionen eine Rolle bei der Karzinogenese des Prostatakarzinoms. So kommen Fusionen des Promotors im TMPRSS2-Gen, das in androgenabhängigen Prostatakarzinomen besonders häufig abgelesen wird, mit Genen, welche für Mitglieder der ETS-Transkriptionsfaktoren kodieren (z.B. ERG und ETV-1), in 40-80% der Prostatakarzinome vor. Die durch diese Genfusion bedingte Überexpression von ERG trägt dazu bei, dass sich durch eine ERG-vermittelte Inhibition der Androgenrezeptorexpression und eine daraus resultierende Störung des Androgenrezeptor-Signalwegs eine Androgenunabhängigkeit in Prostatakarzinomen entwickeln kann (Clark et al. 2007; Hermans et al. 2006). In 15% der primären Prostatakarzinome und bis zu 60% der Metastasen wurde zudem eine durch Deletion verursachte genetische Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN gefunden. Dieser, bei vielen Tumoren mutierte bzw. deletierte Tumorsuppressor, agiert als negativer Regulator des PI3K/AKT-Signalweges, indem er durch Dephosphorylierung von z.B. PIP3 einen direkten Einfluss auf die PI3K-Aktivierung hat (Suzuki et al. 1998; Cairns et al. 1997; Kwak et al. 2013).
Ein weiterer Einflussfaktor stellt die ethnische Herkunft dar. So zeigen sich z.B. überdurchschnittlich hohe Inzidenzen und eine erhöhte Mortalität bei US-amerikanischen Schwarzen. Deutlich unter dem Durchschnitt liegende Inzidenzen zeigen sich bei asiatischen Männern in den USA. Als Ursache für die erhöhte Inzidenz bei der schwarzen männlichen US-Bevölkerung sind bisher Unterschiede im Androgenrezeptor (z.B. kürzere CAG-Repeat-Längen der amino-terminalen Domäne des AR-Gens, welche mit erhöhter Transkription und zugleich verringerter funktionaler Aktivität einhergehen) und höhere Androgenspiegel im Blut beschrieben (Gaston et al. 2003; Pettaway 1999). Auch Ernährungsgewohnheiten spielen prospektiven Studien zufolge eine Rolle in der Prostatakarzinomentstehung. So wurde beispielsweise beschrieben, dass fettreiche Kost und ein erhöhter Konsum von rotem Fleisch positiv mit einer erhöhten Karzinominzidenz korellieren (Salem et al. 2011).

Die Unterschiede der Inzidenz in verschiedenen ethnischen Gruppierungen sind jedoch noch nicht abschließend geklärt. Sowohl die beschriebenen Ernährungs- als auch die unterschiedlichen Umwelt- und Lebensverhältnisse der untersuchten ethnischen Gruppen könnten dabei die Ergebnisse beeinflussen, sodass eine genaue Aussage bislang nicht getroffen werden kann. Unterschiede in den Screeningmethoden scheinen hingegen die Studienergebnisse nicht maßgeblich zu beeinflussen (Hsing et al. 2000).
Ein bis dato kontrovers diskutierter Risikofaktor des Prostatakarzinoms stellt zudem die Entzündung der Prostata (Prostatitis) dar, welche im nächsten Punkt näher dargestellt werden soll.

1.1.3 Prostatitis

Bei vielen Krebsarten (z.B. Magenkarzinom, Kolorektalkarzinom, Hepatozelluläres Karzinom) ist eine vorangegangene Entzündung ein wichtiger Risikofaktor und nahezu jede vierte Krebserkrankung kann mit einer vorhergehenden Entzündung in Verbindung gebracht werden (Lu et al. 2006). Auch beim Prostatakarzinom wird schon lange untersucht, ob sich eine Verbindung zwischen chronischer Prostatitis, dem damit einhergehenden veränderten Mikromilieu und (prä-)neoplastischen Veränderungen herstellen lässt. Aktuell ist jedoch noch nicht endgültig geklärt, ob die Prostatitis eine Ursache für das Prostatakarzinom darstellt. In einer großen epidemiologischen Studie wurde bisher zwar gezeigt, dass die chronische Prostatitis mit einem ca. 60% erhöhten Auftreten einer malignen Entartung der Prostata einhergeht, jedoch ist die Kausalität dieses Resultats nicht sicher beurteilbar, weshalb sich nur eine Tendenz abzeichnet, aber keine endgültige Verbindung hergestellt werden kann (Dennis et al. 2002). Die weltweite Prävalenz der Prostatitis reicht je nach Kriterien von 2,2 bis 9,7% (Krieger et al. 2008). Aktuell werden durch eine Klassifizierung des National Institutes of Health vier Formen der Prostatitis unterschieden: I. Akute bakterielle Prostatitis; II. Chronische bakterielle Prostatitis; III. Chronische Prostatitis/Chronisches Schmerzsyndrom des Beckens (CP/CPPS); A. Entzündlich; B. Nichtentzündlich; IV. Asymptomatische entzündliche Prostatitis. In allen Formen, außer der nichtentzündlichen Form des CPPS (IIIB), können Entzündungszellen nachgewiesen werden (Krieger et al. 1999). Wenn deshalb im Folgenden von chronischer Prostatitis gesprochen wird, schließt dies die chronisch-nichtentzündliche Form der Kategorie IIIB aus.
Schon seit 1998 ist bekannt, dass die Fokale Prostataatrophie, welche mit chronischer Prostatitis assoziiert ist, eine hohe Proliferationsrate aufweist. Deshalb wird sie auch als proliferativ-entzündliche Atrophie (PIA) bezeichnet. Histologisch betrachtet sind die meisten entzündlichen Gebiete mit PIA-Läsionen vergesellschaftet. Auch wur-

den bereits histologische Übergänge von PIA-Läsionen zu hochgradigen prostatisch-intraepithelialen Neoplasien (HG-PIN) und weiterhin von HG-PIN zu Prostatakarzinomen beobachtet und beschrieben (Marzo et al. 1999; Marzo et al. 2007).
Das Vorhandensein von HG-PIN wiederum ist mit einem bis zu zweifach erhöhten Risiko einer malignen Entartung vergesellschaftet. Die Anwesenheit von mononukleären Zellen (MNC) und polymorphnukleären Zellen (PMNC) in PIA-Läsionen ist aufgrund ihrer Fähigkeit zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 und IL-17, ein Schlüsselaspekt (Marzo et al. 1999; Vykhovanets et al. 2011; Vykhovanets et al. 2008).
Die sezernierten Zytokine haben nun durch die Bildung eines lokal veränderten Mikromilieus weitere Effekte auf benachbarte Stroma- und Epithelzellen. So wurde in anderen Krebsarten bereits gezeigt, dass extrazelluläre Stimuli, wie z.B. IL-1β und IL-8, unter anderem auch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie TGF-β und EGF anregen (Higashiyama et al. 2008). Speziell in der Prostatitis wurden neben TNF-α und IL-1β diverse andere Botenstoffe, wie die Interleukine IL-6 und IL-8, die Wachstumsfaktoren EGF, TGF-β und VEGF, sowie das Chemokin BCA-1/CXCL13 beschrieben (Nadler et al. 2000; Sherwood und Lee 1995; Myers et al. 1993; Ammirante et al. 2010). Von dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ist bekannt, dass er sowohl während der Phase der Resolution einer akuten Entzündung, als auch während einer persistierenden chronischen Entzündung zur Initiation von Reparaturprozessen sezerniert wird (Bodnar 2013). Weiterhin wurde in terminal differenzierten Epithelzellen des Ductus deferens unter Einfluss von EGF ein Wiedereintritt in den Zellzyklus beobachtet (Leotoing et al. 2007). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde das Panel an Zytokinen und Wachstumsfaktoren zusammengestellt, welches in dieser Arbeit zunächst näher untersucht wird.

1.1.4 Prostatische intraepitheliale Neoplasien (PIN) und höhergradige PIN (HG-PIN)

PIN-Läsionen und die sich daraus entwickelnden HG-PIN stellen neoplastische Anomalien der Prostatadrüsen dar, wobei die HG-PIN als Präkanzerose, wie in 1.1.3 bereits beschrieben, mit einem erhöhten Risiko der malignen Entartung und somit der Entstehung eines Prostatakarzinoms einhergeht (Brawer 2005; Bostwick und Qian 2004; Montironi et al. 2007; Kryvenko et al. 2012).
Wie das Prostatakarzinom treten PIN-Läsionen mit zunehmendem Alter häufiger - auch in höhergradigen Stadien - in der peripheren Zone der Prostata auf. Sie sind mit

durchschnittlich 9% (4-16%) kein seltener Fund in Prostatastanzbiopsien. Eine Autopsiestudie hat eine HG-PIN Prävalenz von 82% bei Prostatakarzinomen im Vergleich zu 43% Prävalenz bei unauffälligen Autopsien ergeben (Chin et al. 2007).
Ein deutlich vermehrtes Auftreten von PIN-Läsionen wurde zudem in adulten Mäusen beobachtet, die durch eine genetische Inaktivierung des NKX3.1-Genlokus ("NKX3.1-KnockOut-Mäuse") einen Verlust des Tumorsuppressors NKX3.1 hatten (Abdulkadir et al. 2002). Somit scheint eine Verbindung zwischen dem Verlust von NKX3.1, der Entstehung von PIN-Läsionen und einer potentiell folgenden malignen Entartung mit Bildung eines Karzinoms bestehen.

1.2 Der Tumorsuppressor NKX3.1

1.2.1 Allgemeines

Der Tumorsuppressor NKX3.1 ist ein weitgehend prostataspezifisches Protein und wird dort hauptsächlich in Prostataepithelzellen nukleär exprimiert.



Abb. 1: ***Normale NKX3.1-Expression in den Nuklei luminaler Prostataepithelzellen.*** *Immunhistochemische NKX3.1-Färbung von normalem Prostataepithel in 40-facher Vergrößerung. Exemplarisch sind NKX3.1 positive Nuklei markiert (schwarze Pfeile).*

Es spielt bei der Prostataentwicklung und der Differenzierung von luminalen Prostataepithelzellen eine entscheidende Rolle. Seine Expression wird unter anderem durch

Androgene reguliert (He et al. 1997; Thomas et al. 2010; Bhatia-Gaur et al. 1999). NKX3.1 ist ein Transkriptionsfaktor der NK-Familie, welcher durch seine Homöobox-beinhaltende Struktur DNA binden und die Transkription von Genen beeinflussen kann (He et al. 1997; Thomas et al. 2010). NKX3.1 wird durch das Gen NKX3-1 kodiert, welches auf 8p21 lokalisiert ist. Dieser Genlokus ist in Prostatakarzinomen häufig deletiert, weshalb durch einen Verlust der Heterozygotie eine Haploinsuffizienz vorliegt (He et al. 1997).

1.2.2 NKX3.1 und (HG)-PIN-Läsionen

Wie bereits in 1.1.4 beschrieben, wurde in Mäusen mit einer sowohl heterozygoten als auch homozygoten Inaktivierung des Gens NKX3-1 eine höherfrequente Entwicklung epithelialer Dysplasie und Metaplasie, sowie eine signifikant erhöhte Inzidenz von PIN-Läsionen beobachtet (Lei et al. 2006; Kim et al. 2002; Abdulkadir et al. 2002). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass NKX3.1 vor allem in frühen Stadien der Karzinomentstehung als eine Art „gate-keeper“ eine wichtige Funktion ausübt (Song et al. 2009). Weiterführend ist zu sagen, dass nicht nur in HG-PIN-Läsionen NKX3.1-defiziente Prostataepithelzellen gefunden werden konnten, sondern auch in PIN und PIA-Läsionen humaner Prostatae eine weitgehend verminderte NKX3.1 Expression mittels immunhistochemischer Färbungen beobachtet wurde. Zusätzlich wurde, ebenfalls mittels immunhistochemischen Färbungen, eine Korrelation des Grades an NKX3.1-Verlust mit dem zum Tumorgrading verwendeten Gleason-Score in Prostatakarzinomen gezeigt (Bethel et al. 2006).

1.2.3 Wechselwirkungen und Interaktionen

NKX3.1 zeigt als Homöobox-Protein weitläufige Wechselwirkungen mit anderen Genen und Signalwegen. So führt z.B. der Verlust von PTEN, welcher in bis zu 15% der primären Prostatakarzinome auftritt (Siehe 1.1.2) (Suzuki et al. 1998; Cairns et al. 1997; Kwak et al. 2013), zu einer reduzierten Expression von NKX3.1 in murinen und humanen Prostatakarzinomzellen (Lei et al. 2006). Sind beide Gene (NKX3-1 und PTEN) deletiert, führt dies zu einer häufigeren Entstehung von HG-PIN und frühen Stufen von Prostatakarzinomen (Kim et al. 2002).
Auch eine wechselseitige Beeinflussung der Expression von NKX3.1 und dem Onkogen C-MYC ist beschrieben. Das Produkt des C-MYC Gens ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in einer Vielzahl von Krebsarten durch Mutation überexprimiert wird. Ein Verlust von NKX3.1 führt zu einer Überexpression von C-MYC, was wiederum mit

Rezidiven eines bereits behandelten Prostatakarzinoms assoziiert ist (Anderson et al. 2012).
Des Weiteren führt der Verlust von NKX3.1 in Prostataepithelzellen zu einer erhöhten Expression von V-EGF (Vasculo-endothelialer Wachstumsfaktor), welcher z.B. in einem bestehenden Karzinom zu einer erhöhten Neubildung von Blutgefäßen und somit auch zu einer potentiell erhöhten Gefahr der Metastasierung beiträgt (Zhang et al. 2008).

In der nachfolgenden Abbildung (Abb.2) sind zur besseren Übersicht stark vereinfacht noch weitere Signalwege dargestellt, welche an dem Verlust von NKX3.1 beteiligt sein könnten. Diese sind zum Teil bereits aus der Literatur bekannt (durchgezogene und gestrichelte Linien) und zum Teil hypothetisch und in dieser Arbeit untersucht (gepunktete Linien).

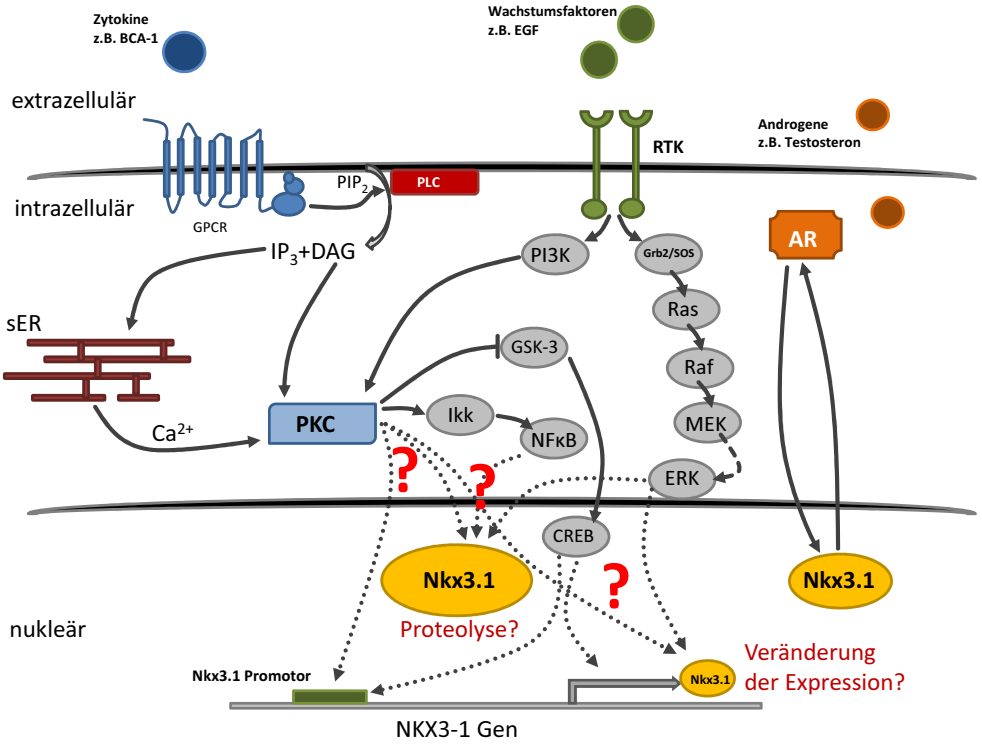

Abb. 2: ***Schematische Darstellung der potentiell am NKX3.1-Verlust beteiligten Signalwege in Prostatakarzinomzellen.*** *Gepunktete Pfeile entsprechen möglichen unbekannten Signalwegen. Grafik ist stark vereinfacht und dient der besseren schematischen Anschauung. Sie beinhaltet nicht alle Mitglieder der jeweilig aufgeführten Signalkaskaden.*
BCA = B-Zell Chemoattraktant, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, RTK = Rezeptortyrosinkinase, GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor, PIP_2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphatt, PLC = Phospholipase C, IP_3 = Inositoltriphosphat, DAG = Diacylglycerol, sER = glattes endoplasmatisches Retikulum, PKC = Proteinkinase C, AR = Androgenrezeptor, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase, GRB2 = Wachstumsfaktor rezeptorgebundenes Protein 2, SOS = Son of sevenless, GSK = Glykogensynthase-Kinase, NF = Nukleärer Faktor, Ikk = IκB-Kinase, CREB = cAMP-Responseelement bindendes Protein, MEK = Mitogen/Extrazellulär signalregulierte Kinase. Quelle: Josua Decker

1.2.4 NKX3.1 und Prostatitis

Wie bereits beschrieben, weisen frühere Studien auf einen Zusammenhang zwischen dem Verlust des Tumorsuppressors NKX3.1 und der Entstehung von PIN Läsionen hin. Auch wurde beschrieben, dass es eine Verbindung zwischen chronischer Prostatitis und Läsionen mit Potential zur malignen Entartung gibt (Marzo et al. 1999; Marzo et al. 2007). Hinsichtlich des Tumorsuppressors NKX3.1 ist es relevant, ob eine Verbindung zwischen einem Verlust von NKX3.1 in prostatitischen Bereichen und einem erhöhten Risiko einer malignen Entartung dieser Bereiche gezogen werden kann.
Es wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass die ansonsten stabile Expression von NKX3.1 in den Epithelzellen aller Lappen der Prostata durch Anwesenheit einer akuten glandulären Entzündung signifikant erniedrigt ist und sich nach Beendigung der Entzündung wieder teilweise normalisiert (Khalili et al. 2010). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass sich ein verändertes inflammatorisches Mikromilieu negativ auf die NKX3.1-Expression auswirkt.
In einem weiteren Mausmodell, in welchem in murinen Prostatae eine über mindestens acht Wochen andauernde chronische Entzündung durch humane Propionibakterien ausgelöst wurde, zeigte sich zu einer erniedrigten Konzentration von NKX3.1 und des Androgenrezeptors, zusätzlich eine erhöhte Anzahl an Zellen, welche positiv für den Proliferationsmarker Ki-67 sind, was für einen höheren Proliferationsindex in den chronisch entzündlichen Bereichen spricht (Shinohara et al. 2013).

1.3 Ziel der Arbeit

Obwohl in den letzten Jahren bereits viel hinsichtlich des Verlustes des Tumorsuppressors NKX3.1 in Verbindung mit Prostatitis und präneoplastischen Läsionen bekannt geworden ist, bleiben immer noch viele Fragen offen.
Vorarbeiten anderer Forschergruppen konnten bereits zeigen, dass gewisse Zytokine, welche in inflammatorischen Arealen exprimiert und sezerniert werden, einen Einfluss auf den NKX3.1-Gehalt in luminalen Prostataepithelzellen haben. Dies lässt die Vermutung zu, dass in diesen entzündlich infiltrierten Bereichen durch die eingewanderten Immunzellen ein spezielles Mikromilieu entsteht, welches mit den anwesenden Botenstoffen maßgeblich für den Verlust von NXK3.1 verantwortlich sein könnte.
Hauptziel dieser Arbeit ist es, die Mediatoren und Botenstoffe zu definieren, welche in eben diesem veränderten Mikroumfeld des entzündeten Prostatagewebes bzw. -epithels den Verlust von NKX3.1 induzieren können. Im Zuge dieser Arbeit sollen ebenfalls die Signalwege identifiziert werden, welche an der Regulation des NKX3.1-Verlusts

in Prostatakarzinom-Zelllinien beteiligt sind. Wie zuvor erwähnt, ist in der Literatur bereits ein Zusammenhang zwischen einem Verlust von NKX3.1 und der Prostatitis beschrieben. Zur Bestätigung der bisher lediglich in Mausmodellen gezeigten Korrelation von entzündlichen Bereichen und erniedrigter NKX3.1-Expression, sollen in dieser Arbeit immunhistochemisch gefärbte Proben von humanen Prostatae hinsichtlich entzündlicher Bereiche und deren NKX3.1-Expression im Vergleich zu gesunden Bereichen untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit sollen vor allem Botenstoffe, Zytokine und Chemokine von denen bereits bekannt ist, dass sie verstärkt im Prostatakarzinom bzw. bei Entzündungsereignissen eine Rolle spielen, bezüglich ihrer Wirkung auf die Expression des Tumorsuppressors NKX3.1 untersucht werden. Weiterführend sollen hier auch die Mechanismen identifiziert werden, durch welche der Verlust NKX3.1 in Prostatakarzinomzellen vonstatten geht.
Letztendlich soll diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der kausalen Verbindung von Prostatitis, NKX3.1-Verlust, präneoplastischen Läsionen, sowie schließlich dem Prostatakarzinom beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden drei etablierte Prostatakarzinomzelllinien verwendet: LNCaP, LNCaP C4.2 und 22RV1. Diese drei Zelllinien stammen ursprünglich alle von humanen Prostatakarzinomen bzw. deren Metastasen, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Tumorigenität und ihrer Androgenabhängigkeit.
LNCaP wurde aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata eines 50 jährigen Mannes gewonnen. Diese adhärente Zelllinie exprimiert den Androgenrezeptor und ist abhängig von Androgenen. Sie hat eine Verdopplungszeit von ungefähr 60 Stunden und exprimiert zudem den in dieser Arbeit untersuchten Tumorsuppressor NKX3.1 (Horoszewicz et al. 1983).
Die Zelllinie LNCaP C4.2 wurde etabliert, indem LNCaP Zellen mit humanen Knochenfibroblasten zusammen in immunsupprimierte Mäuse injiziert wurden. Aus den entstehenden Tumoren wurde die Zelllinie LNCaP C4.2 entwickelt, welche sich zu der ursprünglichen LNCaP-Zelllinie durch eine höhere Tumorigenität und der Expression eines konstitutiv aktiven Androgenrezeptors unterscheidet. Folglich ist diese Zelllinie androgenunabhängig (Wu et al. 1994).
Als dritte Zelllinie wurde 22Rv1 verwendet. Diese wurde aus einer Xenotransplantation von humanen Prostatakarzinomzellen in Nacktmäuse etabliert, in welchen zuvor durch Kastration eine Regression und ein Rezidiv des androgenabhängigen Xenografts induziert wurde. 22Rv1-Zellen exprimieren den Tumorsuppressor NKX3.1 und zusätzlich zwei Splicevarianten des Androgenrezeptors (Sramkoski et al. 1999).

2.1.2 Kulturmedien

Die verwendeten drei Zelllinien wurden in drei unterschiedlichen Kulturmedien gehalten. Die androgenabhängigen LNCaP-Zellen wurden in LNCaP-Medium gehalten, welches als Besonderheit unbehandeltes fötales Kälberserum (FBS) enthält. LNCaP

C4.2 Zellen wurden aufgrund ihrer Androgenunabhängigkeit durch den konstitutiv aktiven Androgenrezeptor in Prostata-Medium gehalten. Dieses enthält ein FBS, welches durch Aktivkohlebehandlung frei von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen und somit auch frei von Androgenen ist.

Tabelle 1: *Kulturmedien*

Standard-Medium	· 400 ml IMDM · 100 ml RPMI 1640 · 50 ml FBS -unbehandelt- · 5 ml Glutamin · 5 ml Penicillin/Streptomycin
LNCaP-Medium	· 500 ml RPMI 1640 · 50 ml FBS -aktivkohlebehandelt- · 5 ml Glutamin · 5 ml Penicillin/Streptomycin
Prostata-Medium	· 500 ml IMDM · 50 ml FBS -aktivkohlebehandelt- · 5 ml Glutamin · 5 ml Penicillin/Streptomycin

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primärantikörper Immunoblot

Tabelle 2: *Primärantikörper Immunoblot*

Antikörper	**Hersteller**	**Art**	**Verdünnung**	**Bestellnummer**
AR	Dako	Maus	1:2000	AR441
ERK-2	Santa Cruz	Kaninchen	1:2000	sc-154
HDAC-1	Santa Cruz	Kaninchen	1:2000	sc-7872
IKK-α	Santa Cruz	Maus	1:5000	sc-7383
NKX3.1	Santa Cruz	Ziege	1:1000	sc-15022
RelA	Santa Cruz	Maus	1:2000	sc-81622
α-Tubulin	Sigma	Maus	1:2000	T 5168

2.1.3.2 Sekundärantikörper Immunoblot

Tabelle 3: *Sekundärantikörper Immunoblot*

Antikörper	**Hersteller**	**Art**	**Verdünnung**	**Bestellnummer**
Anti-Kaninchen	Sigma	Ziege	1:10000	A6154
Anti-Maus	Santa Cruz	Esel	1:8000	sc-2314
Anti-Ziege	Santa Cruz	Kaninchen	1:5000	sc-2768

2.1.3.3 Immunhistochemie-Antikörper

Tabelle 4: *Immunhistochemie-Antikörper*

Antikörper	**Hersteller**	**Klonname**	**Verd.**	**Vorbehandlung**	**Best.-Nr.**
AMACR	DAKO	13H4	1:200	St. EDTA pH 9.0	M 3616
AR	DAKO	AR441	1:200	St. TRS pH 6.2	M 3562
CD20	DAKO	L26	1:1000	St. TRS pH 6.1	M 0755
CD3	DAKO	F7.2.38	1:100	SKT	M 7254
CD68	DAKO	PG-M1	1:100	St. TRS pH 6.1	M 0876
CK basal	DAKO	34βE12	1:100	Mikrowelle	M 0630
CK5/6	Sanova	CK5/6.007	1:50	SKT/1min Pepsin	CM105A
LeuM1 (CD15)	BD	MMA	1:300	St. TRS pH 6.1	559045
NKX3.1	Zytomed	polyklonal	1:10	St. TRS pH 6.1	514-14104

2.1.4 Inhibitoren und Stimulantien

Tabelle 5: *Inhibitoren und Stimulantien*

Bezeichnung:	**Hersteller:**	**Produkt-Nr.:**
BAY 11-7082	Sigma-Aldrich	B5556
BIM-1	Calbiochem	203290
Bortezomib	Santa Cruz	179324-69-7
Gö 6976	LC Laboratories	G-6203
Ionomycin	Calbiochem	407952
MG132	Biomol	PI-102
NVP-BEZ235	Biomol	Cay10565-100
PD98059	Cell Signaling	9900
PMA	Calbiochem	16561-29-8
SB-216763	Sigma-Aldrich	S3442
SB-415286	Sigma-Aldrich	S3567
Wortmannin	InvivoGen	tlrl-wtm

2.1.5 Zytokine und Hormone

Tabelle 6: *Zytokine und Hormone*

Bezeichnung:	**Hersteller:**	**Produkt-Nr.:**
BCA-1, CXCL13	ImmunoTools	11344180
DHT	Sigma-Aldrich	D-073
EGF	ImmunoTools	11343406
IL-1α	Biomol	50430
TNF-α	ImmunoTools	11343015
TWEAK	Sigma-Aldrich	SRP3270

2.1.6 Primer für Real-Time-PCR

Tabelle 7: *RT-PCR Primer*

RealTimePrimers.com:

NKX3.1	Vorwärts:	5´-AGAACGACCAGCTGAGCAC-3´
	Rückwärts:	5´-TAAGACCCCAGTGCCTTTC-3´
	Verdünnung:	1/20
AR	Vorwärts:	5´-GCCTTGCTCTCTAGCCTCAA-3´
	Rückwärts:	5´-GGTCGTCCACGTGTAAGTTG-3´
	Verdünnung:	1/20
RAMP-1	Vorwärts:	5´-TCCACAAATGTGGCTATGGG-3´
	Rückwärts:	5´-TTCCAGCCAAGAAGAGCTCA-3´
	Verdünnung:	1/50
TWIST-1	Vorwärts:	5´-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3´
	Rückwärts:	5´-CCAGCTTGAGGGTCTGAATC-3´
	Verdünnung:	1/50
TMPRSS2	Vorwärts:	5´-GCGGCGCGGCAGGTCATA-3´
	Rückwärts:	5´-GACCACAGTGGGCTGTGCGG-3´
	Verdünnung:	1/50
GAPDH	Vorwärts:	5´-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3´
	Rückwärts:	5´-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3´
	Verdünnung:	1/100

Biomers.net:

β-Aktin	Vorwärts:	5´-TGTGGCATCCAACTAC-3´
	Rückwärts:	5´-GGAGCAATGATCTTCA-3´
	Verdünnung:	1/50

2.1.7 siRNA

Tabelle 8: *siRNA-Sequenzen*

Bezeichnung:	**Hersteller:**	**Sequenz:**
Kontroll-siRNA	Eurogenetec	nicht bekannt
IKK1-siRNA2	Eurogenetec	5´-GGAUGUUGGUGGAAAGAUA-3´
IKK2-siRNA1	Eurogenetec	5´-GGUUAGGGCUUCUGAACUA-3´
AR-siRNA1	Eurogenetec	5´-CGGGAAGUUUAGAGAGCUA-3´
AR-siRNA2	Eurogenetec	5´-GACCUACCGAGGAGCUUUC-3´
p52-siRNA	Qiagen	5´-CCCAGGUCUGGAUGGUAUUTT-3´
RelA-siRNA	Qiagen	5´-GGCCUAACUCCUCUUUGCAUU-3´
RelB-siRNA	Qiagen	5´-GCACAGAUGAAUUGGAGAU-3´
GSK-3-siRNA	Eurogenetec	5´-GGACAAGAGAUUUAAGAAU-3´
Bcl10-siRNA	Qiagen	5´-GUGCAUGACAAAGUGCUGUUA-3´
NKX3.1-siRNA1	Eurogenetec	5´-ACUAGCUCAACCUCUCCUU-3´
NKX3.1-siRNA2	Eurogenetec	5´-CGAUAUUCUGAUUCGCUUU-3´

2.1.8 Chemikalien

Tabelle 9: *Verwendete Chemikalien*

Bezeichnung:	**Hersteller:**
100bp DNA Ladder	Bio Labs
Acrylamid (40 %)	AppliChem
Agar Agar	Roth
Agarose low-melt	Roth
Agarose	Roth, Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumperoxylulfat (APS)	Roth
Ampuva-Wasser	Lonza, Fresenius Kabi
Aquatex	Merck
Biotinylierte Sekundärantikörper Immunhistochemie	Dako
Blotting-Milchpulver fettarm	Roth
Borsäure	Sigma Aldrich, Merck
Bradford Protein Assay	Bio Rad
Bromphenolblau	USB
Casein	Sigma
Citronensäure	Roth
Cloned AMV	Invitrogen
Coomassie Blau	Merck
Desoxycholsäure	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth

Dithiotreitol (DTT)	Merck
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
DNA-Midi, Micro, Mini-Kit	Qiagen
dNTP-Mix	Roche, Peqlab
Enhanced Chemiluminescence (ECL)	Therm Scientific
EDTA-Dinatrium-Salz	AppliChem
EGTA	Roth
Ethanol absolut	VWR
Ethidiumbromid	Merck
External Well Factor Solution	BioRad
FastStart Universal SYBR Green Master (qPCR-MasterMix)	Roche
Fötales bovines Serum (FBS)	Bio West
FBS aktivkohlebehandelt	Biochrom
Glycerol	Sigma Aldrich
Glycin	AppliChem
Hämalaun	Merck
HEPES	Roth
High Resolution Agarose	Roth
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Lonza
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
L-Cystein	Roth

L-Glutamin	Lonza
Lipofectamin LTX, Plus Reagenz	Invitrogen
Methanol	Sigma
Milchpulver (fettarm)	Roth
M-MLV RT	Invitrogen
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	AppliChem
Natriumchlorid	Sigma Aldric
Natriumfluorid	Fluka
Natriumhydrogenphosphat	AppliChem
Nonidet P-40 (NP-40)	AppliChem
PBS	Lonza
Penicillin-Streptomycin	Lonza
Pepton	Roth
Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF)	Sigma
Random Primer	Roche
RED	Dako
RNAse-Inhibitor RNase-OUT	Invitrogen
Roswell Park Memorial Institut Medium 1640 (RPMI 1640)	Lonza
Salzsäure (HCl)	Merck
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Roth
Streptavidin	Dako
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Tricin	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	AppliChem

Triton-X-100	Serva
Trypsin EDTA	Lonza
Trypton	AppliChem
Tween20	VWR
Xylol	Merck
β-Glycerophosphat (β-GP)	AppliChem
β-Mercaptoethanol (β-ME)	AppliChem

2.1.9 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: *Rezepte der verwendeten Puffer und Lösungen*

Blockierungslösung für Western-Blot	- 5 g Milchpulver (fettarm)
	- ad 50 ml TBS-Tween
LB-Medium (lysogeny broth) 1X	- 10 g Trypton
	- 5 g Hefe-Extrakt
	- 10 g NaCl
	- ad 1 l dH_2O
	- pH 7 mit NaOH
	- Sterilisation durch Autoklavieren

PBS (Phospatgepufferte Salzlösung) 1X	- 27,3 ml 5 M NaCl - 10 ml Na_2HPO_4 - 2,6 ml 1 M KCl - 1,8 ml KH_2PO_4 - ad 1 l dH_2O (958,2 ml) - pH 7,4 mit HCl
Puffer A (hypoton für zytoplasmatische Extrakte)	- 1 mM DTT - 0,1 mM EDTA - 0,1 mM EGTA - 10 mM HEPES pH 7.9 - 10 mM KCl - 0,5 mM PMSF
Puffer C (hyperton für nukleäre Extrakte)	- 1 mM DTT - 1 mM EDTA - 1 mM EGTA - 20 mM HEPES pH 7,9 - 0,4 M KCl - 1 mM PMSF

SDS Gel-Lade-Puffer 2X	- 20 ml 10 % SDS
	- 7,5 ml Glycerol
	- 3,13 TRIS-HCl 1 M (pH 6,8)
	- 25 mg Bromphenolblau
	- ad 50 ml dH_2O (19,37 ml)
SDS Transfer-Puffer 10X	- 58 g TRIS
	- 29 g Glycin
	- 18,5 ml 20% SDS
	- ad 1 l dH_2O
Zum Gebrauch 1X	- 100 ml 10X Transfer-Puffer
	- 100 ml Methanol
	- ad 1 l dH_2O
Stripping-Lösung	- 0,2 M NaOH
	- TBS-T
TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) 1X	- 4,84 g TRIS
	- 1,142 ml Essigsäure 100%
	- 0,372 g EDTA
	- ad 1 l dH_2O

TBE 1X	- 10,8 g TRIS - 5,5 g Borsäure - 4 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) - ad 1 l dH_2O
TBS-T (Western-Blot Waschpuffer)1X	- 30 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) - 30 ml 5 M NaCl - 1,5 ml Tween20 (0,05%) - ad 3 l dH_2O (2938,5 ml)
TNT++ Zell-Lyse-Puffer	- 1 ml 20 mM TRIS-HCl (pH 8,0) - 2 ml 200 mM NaCl - 0,5 ml Triton X100 (1%) - ad 50 ml dH_2O (46,5 ml) + 50 μl 2 mM Leupeptin + 50 μl 1 M DTT + 1 ml 1 M NaF + 1 ml 1 M β-Glycerophospat + 500 μl 0,1 M PMSF
Tris-HCl 1 M	- 121,14 g TRIS in 800 ml dH_2O - pH 8,0 mit HCl - ad 1 l dH_2O

2.1.10 Western-Blot-Gele

Tabelle 11: *Rezepte der hergestellten Western-Blot-Gele*

Laufgel, 10% (Rezept für ca. 3 Gele):	12 ml H_2O
	10 ml Acrylamid (40%)
	7,5 ml TRIS-Puffer pH 8,8
	300 μl SDS (10%)
	150 μl APS (10mg/ml)
	15 μl TEMED
Sammelgel	9,15 ml H_2O
	2 ml Acrylamid (40%)
	3,25 ml TRIS-Puffer pH 6,8
	150 μl SDS (10%)
	75 μl APS (10mg/ml)
	15 μl TEMED

2.1.11 Kits

Tabelle 12: *Liste der verwendeten Kits*

DNS-Extraktion:		
Quiagen	DNA Mini-Kit	Cat-No: 51304
Plasmid-Transfektion:		
Invitrogen	Lipofectamine LTX und Plus-Reagenz	
RNA-Extraktion:		
Qiagen	RNeasy Plus Mini-Kit	Cat-No: 79656
Qiagen	QiaShredder	Cat-No: 74104

siRNA-Transfektion:

Lipocalyx	Viromers Trial Kit

2.1.12 Größenstandards

Tabelle 13: *Verwendete Größenstandards*

DNS:	BioLabs DNA-Ladder N3231L	Lot: 0881106
Proteine:	BioLabs Color Plus Prestained Protein Ladder	Lot: P7711S

2.1.13 Verbrauchsgüter

Tabelle 14: *Verbrauchsgüter und Hersteller*

1,5 ml Tubes, 0,5 ml Tubes, 8er Strip-Tubes	Sarstedt, Eppendorf
12-Napf-Platten	Sarstedt
15 ml, 50 ml Tubes	Sarstedt
24-Napf-Platten	Sarstedt
6-Napf-Platten für adhärente Zellen	Nunc, Sarstedt
96-Napf-Platten für qPCR	Thermo Scientific
Blotting Papier	VWR
Deckplättchen	Thermo Schientific
Einmal-Pasteur-Pipetten	Braun
Filme	Fujifilm
Frischhaltefolie	Toppits
Handschuhe	Semper-Care, Hartmann
Kulturflaschen 25 ml	Sarstedt
Kultur-Tubes	Corning
Küvetten	Sarstedt

Nadeln	Braun
Nitrozellulose-Membran	GE Whatman
Objektträger	Thermo Scientific
Optisch klare Deckel	Sarstedt
Petrischalen	Nunclon
Pipettenspitzen	Biosphere, Sarstedt
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark
QiaShredder	Qiagen
Skalpell-Klingen	Braun
Spritzen	Terumo

2.1.14 Geräte

Tabelle 15: *Benutzte Gerätschaften*

Abzugshauben/Sterilarbeitsplätze	LaminAir HLB 2448	Heraeus
	Classa II Type A/B3	SterilGard
Belichtungskassetten	Hyperkassette	AmershamBio
Blotting-Vorrichtung	Blotter	H. Hölzle
Drucker	LQ-BSO+	Epson
Eismaschine	AT 80	Scotsman
Elektrophorese-Vorrichtungenen	Electrophoresis System #B2	Easy Cast
	Electrophoresis System #B1A	Easy Cast
	Sepatarion Systems	Owl
Eppi-Heizplatte		Liebizch
Glasküvetten	1 ml - 20 ml	Sarstedt

Heizplatte	Spiroheater	Amroh
	RTC-Basic	IKALabtechnik
Hub-Pumpe	Seripettor	Brand
Inkubator	S 4500	NAPCO
Kleine Zentrifugen	Mini-Centrifuge	Nat.-Labnet
	Labofuge GL	Heraeus
	Microzentrifuge	Roth
Kühlraum		Viessmann
Kühlschränke	Premium	Liebherr
	Cooler	Bosch
	Comfort	Liebherr
	-80°C	Heraeus
Luminometer	FB12 Luminometer	Berthold
Magnetrührplatte		Heidolph
Mikroskope	Anxiovert 25	Zeiss
	BX51	Olympus
Mikrowellenofen	SMR 550 Microwave-Oven	MacromProf
Mix-Heizplatte	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Mixer/Zentrifuge	Combi-Spin FVL-2400	Peolab
Ofen mit Drehfunktion	400HY	Bachofer
PCR-Maschinen	Primus 96plus	MWG Biotech
pH-Meter	PH530	WtW
Pipetten	Reference	Eppendorf
Pipettierhilfen	Express	Falcon

qPCR-Maschine	iCycler	Bio-Rad
Reaktionsgefäßeständer	Micro Test Tube Rack	Brand
Schnellkochtopf		Silit
Schwenktisch	Mini Rocker	Hartenstein
	Schwenker	Heidolph
Spectralphotometer	Ultrospec 2100pro	AmershamBio
Stromversorgungsgeräte	EPS 300	Pharm.Biotech
	EPS 301	Pharm.Biotech
	EV243	Sigma-Aldrich
	Consort EV231	Hartenstein
	GPS 200	Pharm.Biotech
	GPS 400	Pharm.Biotech
UV-Arbeitsplatz	Clene Lab	Herolab
UV-Fotokammer	Alpha Imager EP	AlphaInnotech
UV-Gelschneidefläche		BIOS Corp.
Vortexer/Mixer	Vortex-Genie 2	Sc.-Industries
	Vortexer	Heidolph
	VZUSIO VTX-3000L	LMS
Waage	EMB 1200-I	Kern
Western-Blot-Laufkammer		CBS Scientific
Zentrifugen	1-14K	Sigma
	Centrifuge 5417C	Eppendorf
	Centrifuge 5417R	Eppendorf

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen (in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO, 90% FBS)) wurden zunächst in handwarmem Wasser aufgetaut, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und anschließend mit entsprechendem Medium in Minutenabständen langsam verdünnt (0,1 ml → 0,12 ml → 0,15 ml → 0,19 ml → 0,26 ml → 0,36 ml → 0,52 ml → 0,86 ml → 1,69 ml → 4,75 ml), um einem osmotischen Schock vorzubeugen. Die Zellsuspension wurde danach 2 min bei 800 rpm zentrifugiert um das DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in neuem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche gegeben.

2.2.1.2 Führen der Zellkultur

Die Zellen wurden in ca. 6 ml der entsprechenden Medien (siehe 2.1.2) bei 5% CO_2 und 37 °C in einem Inkubator in Kulturflaschen oder unterschiedlichen Gewebekultur-Platten gehalten. Je nach Linie wurden die Zellen nach 2-4 Tagen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, einmal mit 1ml Trypsin-EDTA gespült und danach mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C und 5% CO_2 bei 5 min inkubiert. Anschließend wurde mit 9 ml Medium auf 10 ml aufgefüllt und die gewünschte Menge zum weiteren Gebrauch entnommen oder verworfen. Der verbleibende Rest in der Flasche (i.d.R 1-2 ml) wurde mit Kulturmedium wieder auf 6 ml aufgefüllt und unter Standardbedingungen weiter geführt.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Um Zellen einzufrieren, wurden Einfrierröhrchen (Cryotubes) entsprechend beschriftet. Von den einzufrierenden Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt. Anschließend wurden sie mit 2,5 ml Trypsin bei 5 min 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. 2,5 ml Medium wurden danach zugegeben und 4 ml der Suspension in ein 15 ml Röhrchen überführt. Nachdem dieses bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert wurde, wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit 1 ml Einfriermedium versetzt und anschließend in das vorgelegte Einfrierröhrchen übertragen. Dieses wurde langsam auf -80 °C gekühlt und später in einen Stickstofftank zur Langzeit-Aufbewahrung gegeben.

2.2.1.4 Stimulation von Zellen

Um ein Stimulationsexperiment durchzuführen, wurde zunächst eine dicht bewachsene Kulturflasche gewählt und nach Absaugen des Mediums 1 ml Trypsin EDTA zugegeben. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2 wurden 90% der Zellen geerntet und in einen 50 ml Tube gegeben. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-improved Zählkammer gezählt und je nach Bedarf verdünnt. Die Zellsuspension wurde nun auf 6-, 12- oder 24-Napf-Platten ausgesät und je nach Größe der Näpfe auf 2, 1 oder 0,5 ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Je nach Dichte der Aussaat waren die Zellen nach 1-3 Tagen dicht gewachsen und konnten für Stimulationsexperimente verwendet werden. Wenn bei Stimulationsexperimenten Inhibitoren oder andere Medien verwendet wurden, wurden diese 30-60 min vor Stimulation zugegeben. Dies ist jedoch bei den jeweiligen Experimenten detailliert erwähnt.

2.2.2 Western-Blot

2.2.2.1 Zellen ernten, Zelllyse und Proteinaufreinigung aus Gesamtzellextrakten

Um Gesamtzell-Proteinextrakte aus den Zellen zu isolieren, wurde zuerst das Medium aus den 6-Napf-Platten abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zum Waschen mit 1 ml eisgekühltem PBS versetzt und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach zwei Minuten Zentrifugation bei 8000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Zellsediment zur Lyse mit 80 μl eisgekühltem TNT resuspendiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Diese Suspension wurde anschließend bei 14000 rpm und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand stellt das Zelllysat inkl. zelluläre Proteine dar und wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Messung der Proteinkonzentration wurden 2 μl der Protein-Lösung nach dem Bradford-Test Verfahren in 1 ml CBBG-Lösung (Coomassie-Brillant-Blau G-250) gegeben und nach kurzem Mischen im Photospektrometer bei 595 nm gemessen. Zur Weiterverwendung für eine Analyse mittels Western-Blot wurde das Volumen der Protein-Lösung, welches 25 μg Proteine enthält errechnet. Dieses wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 8 μl Western-Blot-Ladepuffer versetzt.

2.2.2.2 Nukleäre und zytoplasmatische Extrakte

Zur Gewinnung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen wurden Zellsedimente in eisgekühltem PBS gewaschen und anschließend in 150 μl des hypotonen Puffer A resuspendiert. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis, während der die Zellen schwellen, wurden zu der Suspension 7 μl NP-40 (1%) zugegeben, 3-4 min bei RT inkubiert

und für 15 s auf dem Vortexer gemischt. Die zytoplasmatischen Extrakte wurden nach Zentrifugation bei 4 °C und 8000 rpm für 2 min im Überstand entnommen. Für die nukleären Proteine wurde das verbleibende Sediment zuerst mit 100 μl Puffer A gewaschen (Resuspension und anschließende Zentrifugation für 2 min bei 8000 rpm und 4 °C) und der Überstand verworfen. Zu dem verbleibenden Sediment wurden 40 μl Puffer C gegeben und die Reaktionsgefäße für 45 min bei 4 °C auf einen Rüttler gestellt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C wurden die im Überstand befindlichen nukleären Proteine in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die zytoplasmatischen sowie die nukleären Proteine wurden danach bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 SDS Gelelektrophorese und Transfer auf Nitrozellulose-Membranen

Zur Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) wurden die Proben vor der Elektrophorese 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend in das vorbereitete Gel (siehe 2.1.10) pipettiert. Die Laufkammern wurden zuvor mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proteine wurden mit einer Spannung von 120-130 V für ca. 100 min aufgetrennt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Lauf bei Erreichen des unteren Gelrandes durch die Lauffront abgebrochen wird. Danach wurde das Gel auf eine beschriftete Nitrozellulose-Membran zwischen jeweils vier in SDS-Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren gelegt und die Proteine wurden bei 60 mA für 75 min auf die Nitrozellulose-Membran transferiert.

2.2.2.4 Blocken, Antikörperinkubation und Detektion

Nach dem Transfer wurden die Membranen entnommen, kurz bei Raumtemperatur getrocknet (nur falls Ziegen-Antikörper für den nachfolgenden Westenblot verwendet wurden) und anschließend für 1,5 Stunden in die Blockierungslösung (10% Magermilchpulver in TBS + Tween 20) gegeben, um eine unspezifische Bindung des Primär- oder des Sekundärantikörpers an die Membran zu verhindern. Nach Entnehmen aus der Blockierungslösung wurden die Membranen drei Mal für 10 min in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der Primärantikörper zugegeben (Konzentrationen siehe 2.1.3.1) und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen erneut drei Mal für 10 min in TBS-T gewaschen bevor für 60 min der Sekundärantikörper bei Raumtemperatur zugegeben wurde. Nach einem dritten Waschschritt in TBS-T (3 mal 10 min) wurden von den ECL-Lösungen 1 und 2 je 400 μl auf die Membranen gegeben und für 1 min darin belassen. Die Membranen wurden anschließend in Frischhaltefolie eingewickelt und mit Klebestreifen in Entwicklungskassetten fixiert.

Je nach Signalstärke wurden nun Filme in der Dunkelkammer unterschiedlich lange mit den Membranen belichtet. Die Filme wurden danach in einem Tischentwickler entwickelt und anschließend beschriftet und eingescannt.

2.2.3 Luciferase-Reporter-Assay

2.2.3.1 Transfektionsvorbereitung

Zur Analyse spezifischer Genaktivitäten in LNCaP-Zellen mittels des Dual-Luciferase-Assays wurden am ersten Tag die erforderlichen Zellen auf 24-Napf-Platten ausgesät. Nach Transfektionsprotokoll mit dem kommerziell erhältlichen Lipofectamin LTX Transfektionsreagenz wurden mindestens 7×10^4 Zellen pro Napf benötigt. Die Zellen wurden nach Trypsinierung unter Verwendung der Neubauer-improved Zählkammer gezählt und daraus das erforderliche Volumen der Zellsuspension errechnet. Zur Aussaat wurde die erforderliche Anzahl an Zellen mit 0,5 ml LNCaP-Medium in die Näpfe gegeben. Die Zellen wurden anschließend über Nacht für 24 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.3.2 Transfektion

Nach dem Lipofectamin LTX-Transfektionsprotokoll wurde am zweiten Tag das Medium gewechselt und die Transfektionsansätze wie folgt vorbereitet: Pro Napf wurden in einem sterilen 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß 200 ng zu transfizierender DNA, 100 μl DMEM ohne Zusätze, 100 ng Renilla, 1,2 μl Plus-Reagenz gegeben und gut vermischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2,4 μl LTX-Reagenz zugegeben, vermischt und anschließend 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Napf wurden nun 100 μl des hergestellten Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben. Nachfolgend wurden die Zellen über Nacht für 24 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Zur Stimulation wurde am dritten Tag das Stimulanz (z.B. 20 ng/ml BCA-1) zugegeben und abermals für 24 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert.

2.2.3.3 Messung der Luziferaseaktivität und statistische Auswertung

Vor der Messung wurden am vierten Tag pro zu messenden Napf 30 μl Luziferase-Substrat und 30 μl Stop&Glow-Substrat in separate 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße vorbereitet und aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Substrate in Alufolie eingewickelt auf Eis gestellt. Aus der 24-Napf-Platte wurde anschließend das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 0,5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden zur Lyse pro Napf 80 μl TNT zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert.

Zur Messung wurden nun 30 μl des Luziferase-Substrats mit 20 μl Zelllysat gemischt und im Luminometer gemessen. Nach der ersten Messung wurden 30 μl Stop&Glow-Substrat zugegeben und der Ansatz wurde erneut im Luminometer gemessen. Die erhaltenen Daten (in Form von Relativen Lichteinheiten (RLU)) wurden anschließend in Excel-Tabellen überführt und ausgewertet. Hierzu wurden zunächst die RLU´s nach Stop&Glow Zugabe mittels der niedrigsten gemessenen RLU normalisiert. Anschließend wurden die ermittelten Luziferase-RLU´s mit den zuvor ermittelten Faktoren verrechnet und aus den jeweils mehrfachen Ansätzen der statistische Mittelwert gebildet. Teilt man nun die Mittelwerte der stimulierten Ansätze durch die der unstimulierten, erhält man die n-fache Veränderung der Luziferaseaktivität der jeweiligen verwendeten Reporter. Um die Ergebnisse der zu untersuchenden Reporter zu interpretieren wurden sie nun noch anhand der Ergebnissen der Kontrollreporter normalisiert und in Tabellen gefasst.

2.2.4 RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und Real-Time-PCR

2.2.4.1 RNA-Extraktion und Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Extraktion von RNA wurden Zellen von Sechs-Napf-Platten kultiviert. Die Zellen wurden nach Trypsinierung geerntet, mit eisgekühltem PBS gewaschen und für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment nach dem Protokoll des Qiagen Shredders mit 350 μl RLT resuspendiert. Diese Suspension wurde nun auf den Shredder gegeben und 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss, welcher nun das homogenisierte Material enthält, wurde mit 350 μl Ethanol (70%) versetzt, auf die RNeasy-Säule (Qiagen) gegeben und für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurden 350 μl RW1 auf die Säule gegeben und erneut 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Um die DNA zu entfernen wurden anschließend 10 μl DNase und 80 μl RDD auf die Säulen gegeben und 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschritte mit 350 μl RW1 und 2x 500 μl RPE, um die RNA auf der Säule zu reinigen. Es wurde für 30 s, 30 s, 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss jeweils verworfen. Zur Gewinnung der aufgereinigten RNA wurde die Säule bei 14000 rpm für 2 min zur Trocknung zentrifugiert und in beschriftete 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gestellt. Zur Elution der RNA wurden 30-50 μl RNase freies Wasser zugegeben und für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert (RW1, RPE und RDD jeweils Eigennamen und Bestandteile des verwendeten RNeasy-Mini-Kits von Qiagen). Zur Bestimmung der Konzentration der RNA wurden 3 μl der zu bestimmenden RNA-Lösung auf eine Spezialküvette

pipettiert. Diese wurden anschließend im Spektralphotometer bei 260, 280 und 320 nm gemessen (Verdünnungsfaktor: 10; Optische Weglänge: 10 mm). Als Referenz wurde RNase freies Wasser verwendet.

2.2.4.2 cDNA Synthese aus RNA

Zur Synthese von cDNA aus der gewonnenen RNA wurde die Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) von Invitrogen mit entsprechendem Protokoll genutzt. Es wurden je nach Konzentration 200-500 ng RNA verwendet. Zu der RNA wurden 1 μl oligo dT-Primer (500 μg/ml) und 2 μl dTNP (10 mM) gegeben. Anschließend wurden die Proben mit DEPC H_2O auf 12 μl aufgefüllt. Nach kurzem Mischen wurde die Probe für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Nun wurden 4 μl 5X-First-Strand-Puffer, 2 μl 0,1 M DTT und μl RNaseOUT (40 U/μl Rekombinanter Ribonuclease Inhibitor) zugegeben, erneut gemischt und bei 37 °C für 2 min inkubiert. Schließlich wurde 1 μl (200 u) M-MLV RT zugegeben und nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 50 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch 15 min Erhitzen auf 70 °C inaktiviert und die erhaltene cDNA bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.3 Durchführung der Real-Time-PCR

Je nach Konzentration der cDNA-Proben (10-25 ng/μl) wurden sie vor Verwendung 1:1 bis 4:1 mit Ampuva-H_2O verdünnt um eine entgültige cDNA Konzentration von 5 ng/μl zu erhalten. Für die quantitative Real-Time-PCR wurden 20 μl Ansätze und 96-Napf-Platten verwendet. Für die Konzentration der jeweiligen Primer siehe 2.1.6. 20 μl Ansätze:

- 1 μl Rückwärts-Primer
- 1 μl Vorwärts-Primer
- 2 μl cDNA (5 ng/μl)
- 6 μl Ampuva-H_2O
- 10 μl qPCR-Mix

Als Referenz wurde vor der Quantifizierung eine 96-Napf-Platte mit der Referenzlösung Ëxternal Well Factor Solutionëingesetzt. Nach Durchlaufen des Referenzzyklus (1x 95 °C für 5 min) wurde die zu messende Platte eingesetzt, welche dann 40 Zyklen nach folgendem Muster durchlief. Während diesen Zyklen fand parallel auch die Datenerfassung durch das Gerät statt.

- 95 °C für 30 s
- 58 °C für 45 s
- 74 °C für 15 s

Nach den 40 Zyklen wurden die Proben erneut für eine Minute auf 95 °C und anschließend eine weitere Minute auf 55 °C gehalten. Als letzter Schritt folgte nun eine ansteigende Erwärmung von 55 °C auf 90 °C in Schritten von 0.5 °C währenddessen die Daten für die Schmelzkurven gesammelt wurden. Anschließend wurden die Proben in der Maschine bei 20 °C gehalten.

2.2.5 Immunhistochemie

2.2.5.1 Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Nach der Anfertigung von 2 μm dicken Schnitte aus Paraffinblöcken mittels eines Mikrotoms wurden diese zunächst entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger folgendermaßen behandelt:

- 3x für je 5 min in Xylol geben
- Spülen in Ethanol (abs.)
- 1x in Ethanol (abs.) für 5 min
- 1x in Ethanol (90%) für 5 min
- 1x in Ethanol (70%) für 5 min
- Spülen in destilliertem Wasser

2.2.5.2 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Je nach gewünschter Färbung wurden die entparaffinierten Schnitte auf den Objektträgern im Schnellkochtopf (SKT), Steamer (St.) oder der Mikrowelle vorbehandelt. Die genauen jeweiligen Angaben und Lösungen sind der Tabelle in 2.1.3.3 zu entnehmen. Nach der Vorbehandlung wurden die Schnitte/Objektträger bis zur Färbung in PBS gelagert.

2.2.5.3 Färbung der Gewebeschnitte

Vor Beginn der immunohistochemischen Färbungen wurden die Objektträger um das Gewebe herum getrocknet und eine geschlossene Linie mit einem wasserabweisenden

PAP-Stift um den Gewebeschnitt herum gezogen. Anschließend wurden der Primärantikörper in der jeweiligen Konzentration (siehe 2.1.3.3) zugegeben bis der Schnitt komplett benetzt war (ca. 100 μl). Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur (RT) wurde der Objektträger kurz in PBS gespült und 100 μl des biotinylierten Sekundärantikörpers zugegeben, welcher erneut 30 min bei Raumtemperatur zur Inkubation belassen wurde. Danach wurde nach erneutem spülen in PBS 100 μl Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Konjugate auf den Schnitt gegeben, wieder für 30 min bei RT inkubiert und dieses wiederum in PBS abgespült. Anschließend wurden 100 μl der RED-Lösung auf das Gewebe gegeben, für 16 min bei RT inkubiert und in PBS gespült. Zuletzt wurden 100 μl Hämalaun auf den Schnitt gegeben, für 5 min bei RT inkubiert und schließlich in Wasser gespült. Der fertig gefärbte Schnitt konnte nun mit Aquatex eingedeckt, und das Deckglas mit dem zugehörigen Klebstoff angebracht werden. Nach dem Trocknen konnten die Schnitte unter dem Mikroskop beurteilt werden.

2.2.5.4 Auswertung der immunohistochemischen Färbungen

Zur Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mittels eines Olympus BX51 Scanmikroskops und der Scansoftware OlyVia zunächst virtuelle Schnitte in zehn- bis zwanzigfacher Vergrößerung angefertigt, um sie am Computer besser beurteilen zu können.
Vor der Auswertung wurden alle Schnitte von einem erfahrenen Pathologen hinsichtlich neoplastisch-veränderter Areale und Verwendbarkeit überprüft. Nun wurden pro Schnitt die größten CD3, CD20 bzw. CD68 positiven, AMACR negativen Herden ausgewählt und die luminalen Epithelzellen aller direkt angrenzenden Drüsenabschnitte ausgezählt. Befanden sich AMACR positive PIN-Läsionen in den Proben, so wurden diese nach gleichem Schema separat ausgezählt. Für die Angaben des Normalgewebes wurden zufällige Koordinaten generiert und diese in den Scans aufgesucht. Es wurden abschließend alle luminalen Epithelzellen ausgezählt, welche sich im sichtbaren Bereich befanden. Ergab die Position der zufälligen Koordinaten reines Stroma, lag außerhalb des Schnittes oder zeigte ein Signal in der AMACR Färbung, so wurden neue Koordinaten generiert.
Für die Intensität der Zellen wurden nur deutlich positive und deutlich negative Zellen gewählt. Alle Zellen, die keiner der beiden genannten Gruppen klar zugeordnet werden konnten, wurden als intermediär gefärbt gewertet. Die grafische Darstellung erfolgte letztendlich als prozentualer Anteil, wobei die Summe positiver, intermediär gefärbter und negativer Zellen immer als 100% gewählt wurde.

2.2.6 siRNA-Experimente

2.2.6.1 Transfektion von PCa-Zelllinien mit siRNA

Für die Transfektion von siRNA in LNCaP-Zellen wurden das Viromer-Kit und das zugehörige Protokoll von Lipocalyx verwendet. Hierbei wurden die gewünschten siRNA Proben zunächst mit dem mitgelieferten Puffer F auf 11 μM verdünnt. Parallel wurde das gewünschte Viromer (BLUE oder GREEN) 1:100 ebenfalls mit dem Puffer F angesetzt. Nun wurden 11 μl der siRNA-Lösung 1:10 mit dem angesetzten Viromer verdünnt und die Proben anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Je nach Größe der Näpfe wurde nun die siRNA-Lösung auf die Zellen gegeben, bei welchen zuvor das Medium gewechselt wurde.

Art der Platte	**Menge der siRNA-Lösung**
6-Napf-Platte	200μl
12-Napf-Platte	100μl
24-Napf-Platte	50μl

Die Zellen wurden nach der Transfektion für 48-72 Stunden bei 5% CO_2 und 37 °C inkubiert.

2.2.6.2 Stimulation, Ernten und weitere Verwendung

Nach erfolgter Transfektion und Inkubation wurde das Medium erneut gewechselt und jeweils eine der Proben mit 100 ng/ml EGF über Nacht stimuliert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Auf- und Abpipettieren abgelöst und in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Je nach weiterer Verwendung wurden von den Zellsuspensionen Sedimente angefertigt und für Western-Blot-Analysen Proteine (Vorgehen siehe 2.2.2.1) und für quantitative Real-Time-PCR-Analysen RNA extrahiert (Vorgehen siehe 2.2.4.1).

2.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurden t-Tests der jeweils zu vergleichenden Gruppen durchgeführt. Hieraus wurden die entsprechenden p-Werte errechnet von welchen Werte unter 0,05 als signifikant betrachtet wurden. P-Werte: p>0,05 = ns (nicht signifikant);

$p<0{,}05$ = *; $p<0{,}01$ = **; $p<0{,}001$ = ***; $p<0{,}0001$ = ****.
Für die graphische Darstellung wurden der Mittelwert mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten gleichen Aufbaus verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss verschiedener Zytokine und Entzündungsmediatoren auf die NKX3.1 Expression

Hinsichtlich des Ziels der Arbeit eine Verknüpfung zwischen Prostatitis und NKX3.1-Verlust herzustellen, wurden zuerst anhand von Literatur und bekannten Induktoren des NKX3.1-Verlusts verschiedene Zytokine/Chemokine und Wachstumsfaktoren ausgewählt. Mit den ausgewählten Zytokine/Chemokine und Wachstumsfaktoren wurde eine Reihe von Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP, LNCaP C4.2, 22Rv1) behandelt, um ihren Einfluss auf die NKX3.1 Expression zu untersuchen. Ausgewählt wurden:

- IL-1α (Interleukin-1α)
- TNF-α (Tumornekrosefaktor-α)
- EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)
- TWEAK (ein Mitglied der TNF-Liganden Superfamilie, auch: TNFSF12)
- BCA-1 (ein B-Lymphozyten Chemotaktikum, auch: CXCL-13)

In folgenden Experimenten wurden LNCaP- und LNCaP C4.2-Zellen ausgesät und über Nacht mit den verschiedenen Stoffen stimuliert. Die resultierenden Gesamtzellextrakte wurden in Western-Blot-Analysen weiter untersucht. Hierbei zeigten sich unterschiedliche Auswirkungen der Stimulantien auf die NKX3.1-Proteinspiegel, welche folgend näher beschrieben werden. Interleukin 1α (Abb.3, Spur 1 und Abb.4, Spur 2) sowie TNF-α (Abb.3 und Abb.4 je Spur 3) zeigten sowohl in LNCaP- als auch in LNCaP C4.2-Zellen eine Erniedrigung der NKX3.1-Proteinspiegel. TWEAK und BCA-1 zeigten beide eine relativ geringe Beeinflussung des NKX3.1-Proteingehalts. In LNCaP-Zellen scheint der Proteinspiegel unverändert bis leicht gesteigert, in C4.2-Zellen leicht erniedrigt (Abb.3 und Abb.4, je Spuren 5 und 6). Den größten Einfluss auf den NKX3.1 Proteingehalt zeigte sich jedoch sowohl in LNCaP als auch in C4.2-Zellen nach Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor(EGF) (Abb.3 und Abb.4 je Spur 4). Hier war in beiden Zelllinien der größte Verlust an NKX3.1 zu beobachten. EGF wurde aus diesem Grund

ausgewählt, um in folgenden Experimenten und Stimulationsanalysen den NKX3.1-Verlust näher zu charakterisieren und die beteiligten Mechanismen und Signalwege zu untersuchen. Um zu überprüfen, ob die Veränderungen des NKX3.1-Gehaltes auch auf

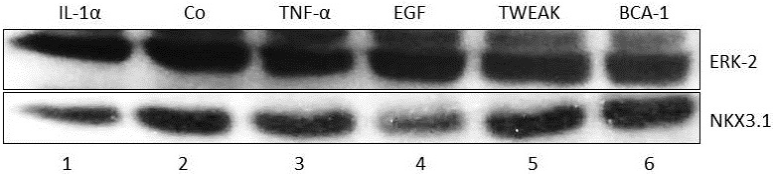

Abb. 3: ***Stimulation von LNCaP-Zellen mit IL-1α, TNF-α und EGF führt zu einer Verminderung, Stimulation mit TWEAK und BCA-1 zu einer Erhöhung der NKX3.1-Proteinspiegel.*** *Western-Blot-Analyse von LNCaP-Gesamtzellextrakten nach 18 h Stimulation mit 20 ng/ml IL-1α, 45 ng/ml TNF-α, 50 ng/ml EGF, 45 ng/ml TWEAK und 20 ng/ml BCA-1 (CXCL-13). Anti-Erk2-Bande bei 42 kD, anti-NKX3.1-Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, TWEAK = TNF-verwandter schwacher Apoptoseinduktor, BCA = B-Lymphozyten Chemoattraktant, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

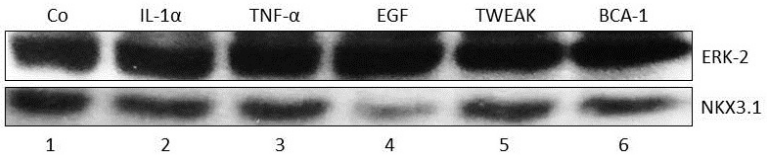

Abb. 4: ***Stimulation von LNCaP C4.2-Zellen mit verschiedenen Zytokinen führt zu einer Veränderung des NKX3.1 Gehalts auf Proteinebene wie z.B zu einem deutlichen Verlust bei Stimulation mit EGF.*** *Western-Blot-Analyse von LNCaP C4.2 Gesamtzellextrakten nach Stimulation mit 20 ng/ml IL-1α, 45 ng/ml TNF-α, 50 ng/ml EGF, 45 ng/ml TWEAK und 20 ng/ml BCA-1 (CXCL-13) über 18 h. NKX3.1-Bande bei 26 kD, ERK-2 Bande bei 42 kD.*
Co = Kontrolle, IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, TWEAK = TNF-verwandter schwacher Apoptoseinduktor, BCA = B-Lymphozyten Chemoattraktant, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

mRNA-Ebene zu beobachten sind wurde aus den geernteten LNCaP-Zellen die RNA extrahiert und die NKX3.1-mRNA Mengen mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Hier bestätigte sich der bereits im Western-Blot sichtbare Verlust von NKX3.1 nun auch auf mRNA-Ebene (nach Stimulation mit IL-1α, TNF-α und EGF). Analog zu den zuvor in den Western-Blot-Analysen beschriebenen Veränderungen war auch hier ein geringer Verlust von 30-60% der mRNA bei Stimulation mit IL-1α und TNF-α zu beobachten, wohingegen eine Stimulation mit EGF zu einem noch größeren Verlust der NKX3.1 mRNA (60-80%) führte. (Abb.5) Die eher neutralen Ergebnisse nach

Stimulation mit TWEAK und BCA-1 ließen sich auch auf mRNA-Ebene bestätigen (Abb.5), sodass keine weiteren Untersuchungen hinsichtlich des NKX3.1-Verlusts mit diesen beiden Stoffen durchgeführt wurden. Wie zuvor erwähnt ist in der Literatur

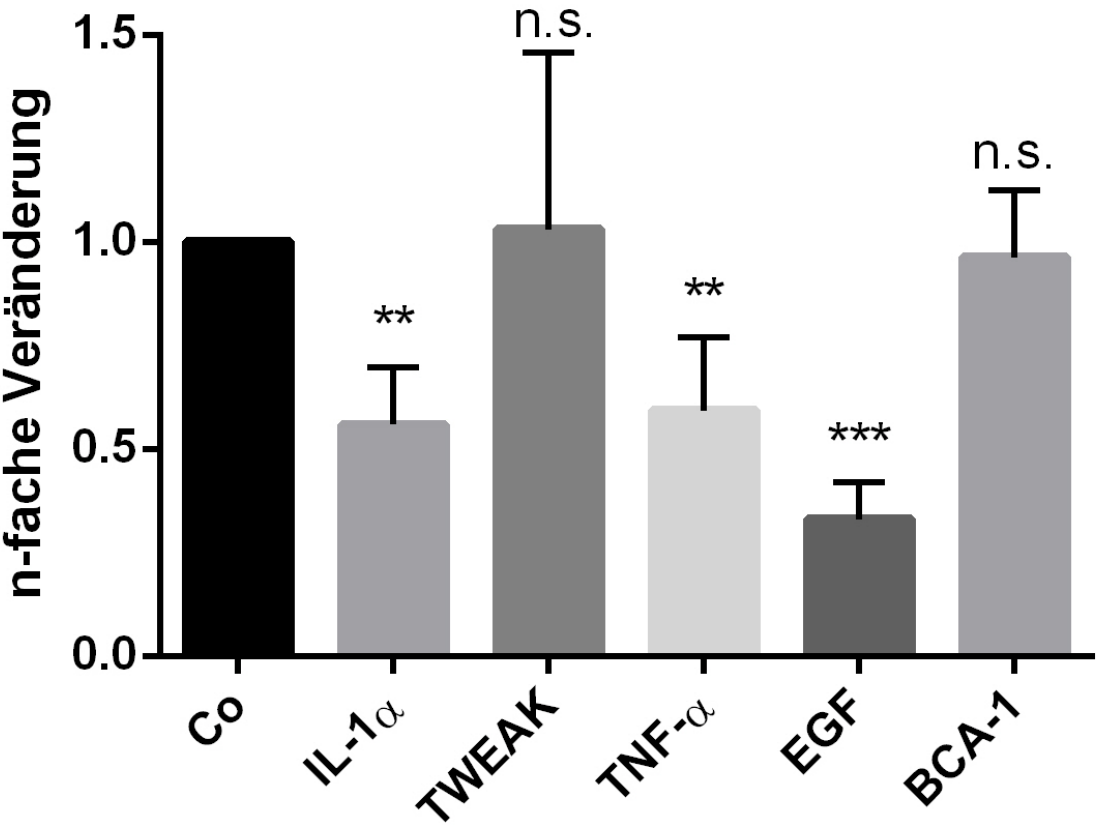

Abb. 5: ***Stimulation von LNCaP-Zellen mit verschiedenen Zytokinen führt zu einer Veränderung des NKX3.1-mRNA-Gehalts.*** *Real-Time-PCR-Analyse aus LNCaP RNA-Extrakten nach Stimulation mit 20 ng/ml IL-1α, 45 ng/ml TNF-α, 50 ng/ml EGF, 45 ng/ml TWEAK und 20 ng/ml BCA-1 (CXCL-13) über 18 h. cDNA-Synthese aus 500 ng RNA, Referenzgen: GAPDH.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. Co = Kontrolle, IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, TWEAK = TNF-verwandter schwacher Apoptoseinduktor, BCA = B-Lymphozyten Chemoattraktant.*

bereits beschrieben, dass eine Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF-α und Interleukin-1β einen NKX3.1-Verlust in Prostatakarzinomzellen induzieren kann. Als zugrundeliegender Mechanismus ist dabei eine proteasomale Degradation nach spezifischer Phosphorylierung und Ubiquitinierung von NKX3.1 postuliert. Eine Erniedrigung des NKX3.1-Spiegels durch EGF Stimulation ist bisher nicht beschrie-

ben worden, weshalb die weitere Arbeit sich auf die Klärung der zugrundeliegenden Prozesse konzentriert.

3.2 Der EGF-induzierte Verlust von NKX3.1 ist ein genereller Regulationsmechanismus in PCa Zelllinien

Um zu bestimmen, ob es sich bei dem zuvor (Abb.3 und Abb.4) bereits sichtbaren Verlust von NKX3.1 nach Stimulation von LNCaP-Zellen mit EGF um ein Zelllinien-spezifischen Effekt handelt, oder ob es sich um einen generellen Mechanismus zu Regulation der NKX3.1-Spiegel in allen PCa-Zelllinien handelt, wurde die NKX3.1 Konzentration in den Zelllinien LNCaP, LNCaP C4.2 und 22Rv1 nach sechs Stunden EGF-Stimulation verglichen. Hier zeigte sich in allen Linien ein ähnlicher Verlust von NKX3.1 (Abb.6).

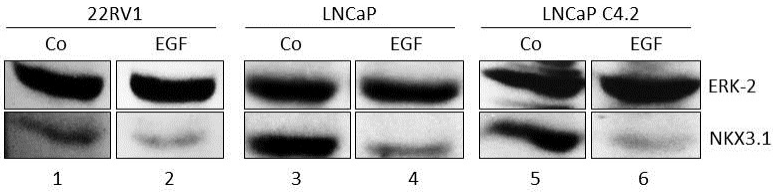

Abb. 6: ***Stimulation mit EGF führte in allen verwendeten PCa-Zelllinien zu einem Verlust von NKX3.1 auf Proteinebene.*** *Western-Blot-Analyse aus Gesamtzellextrakten verschiedener AR- und NKX3.1-positiver PCa-Zelllinien. Spur 1 und 2: Stimulation von 22RV1-Zellen mit 100 ng/ml EGF über 6 h. Spur 3 und 4: Stimulation von LNCaP-Zellen mit 40 ng/ml EGF über 6 h. Spur 5 und 6: Stimulation von C4.2-Zellen mit 50 ng/ml EGF über 6 h. NKX3.1-Bande bei 26 kD, ERK-2-Bande bei 42 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

Um für weitere Experimente die besten Bedingungen zu schaffen, wurde durch Stimulation von LNCaP-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen EGF zuerst die optimale Dosis für den induzierten Verlust von NKX3.1 ermittelt. Hierfür wurden LNCaP-Zellen für 15 Stunden mit EGF-Konzentrationen von 0.1; 1; 10; 100 und 1000 ng/ml stimuliert und die resultierenden Gesamtzellextrakte für Western-Blot-Analysen verwendet. Es zeigte sich hierbei ein deutlicher Effekt erst ab einer EGF-Konzentration von 100 ng/ml (Abb.7 Spur 5, Abb.8 Balken 5).

Dieses Ergebnis ließ sich in einer Real-Time-PCR-Analyse der gleichen Proben auch

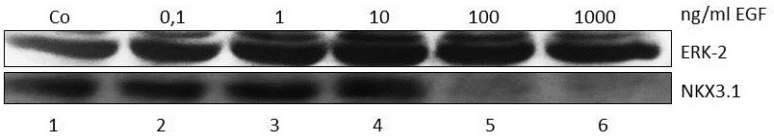

Abb. 7: ***Der NKX3.1-Verlust auf Proteinebene in LNCaP-Zellen nach EGF-Stimulation ist deutlich sichtbar ab einer EGF-Konzentration von 100 ng/ml.*** *Western-Blot-Analyse mit LNCaP-Gesamtzellextrakten nach Stimulation mit 0.1; 1; 10; 100 und 1000 ng/ml EGF über 15 Stunden. NKX3.1-Bande bei 26 kD, ERK-2-Bande bei 42 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

auf mRNA-Ebene bestätigen (Abb.8).

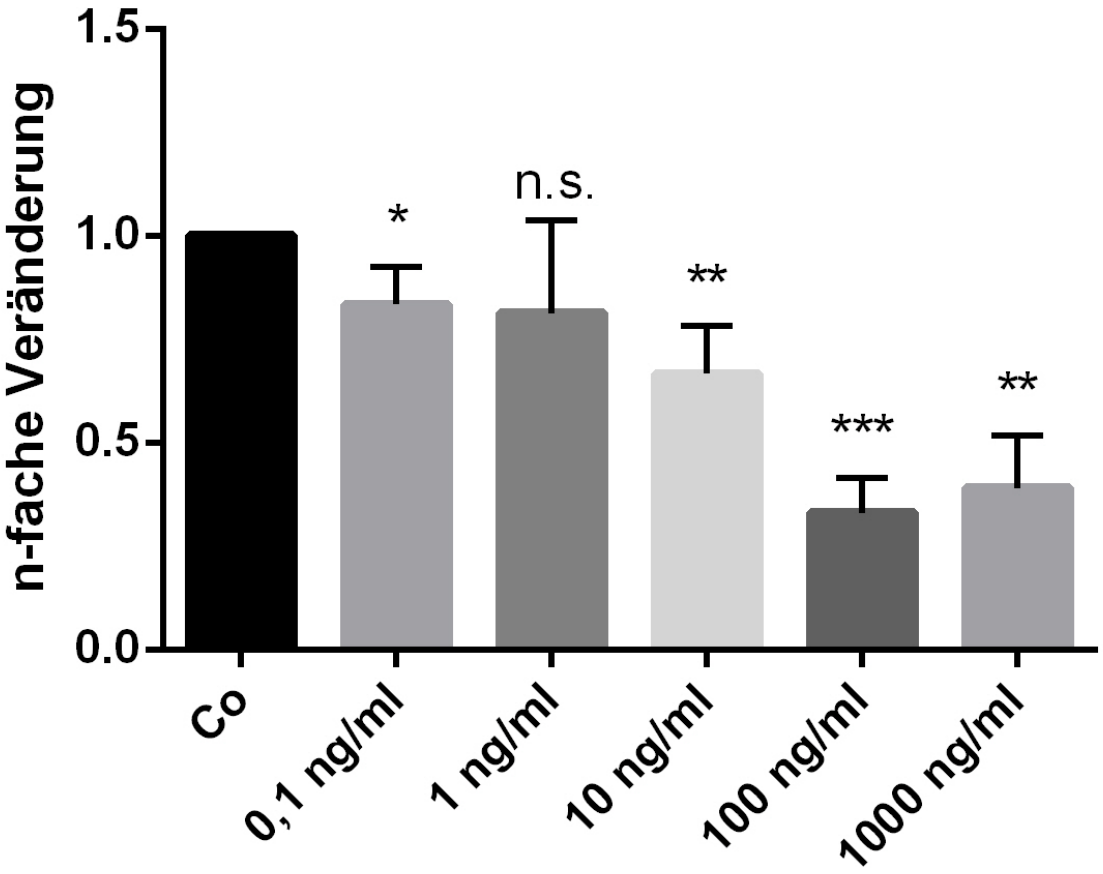

Abb. 8: ***Der Verlust von NKX3.1-mRNA in LNCaP-Zellen nach Stimulation mit EGF ist konzentrationsabhängig und am deutlichsten bei Stimulation mit einer EGF-Konzentration von 100 ng/ml.*** *Quantitative Real-Time-PCR-Analyse aus LNCaP RNA-Extrakten nach Stimulation mit 0.1; 1; 10; 100; und 1000 ng/ml EGF über 15h. Referenzgen: GAPDH. NKX3.1-mRNA-Gehalt relativ zur unstimulierten Kontrolle (Co) gesetzt.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor.

3.3 Ko-Stimulation von Prostatakarzinomzelllinien mit PMA und Ionomycin führt zu verminderten NKX3.1-Proteinspiegeln

In Vorarbeiten der AG Marienfeld (Institut für Pathologie, Universität Ulm) konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine kombinierte Stimulation von LNCaP-Zellen mit dem PKC-Aktivator PMA (ein Strukturanalogon von DAG) und Ionomycin, welches das intrazelluläre Kalzium erhöht, negativ auf den Gehalt an NKX3.1 - sowohl auf Protein-, als auch auf mRNA-Ebene - auswirkt. Um dies auch in den in dieser Arbeit verwendeten Prostatakarzinomzelllinien zu zeigen, wurden die Zellen mit PMA in einer Konzentration von 20 ng/ml und Ionomycin in einer Konzentration von 500 ng/ml über verschiedene Zeiten stimuliert. Von den Zellen wurden Proteine und RNA extrahiert, welche anschließend mittels Western-Blot und Real-Time-PCR analysiert wurden. In der Western-Blot-Analyse zeigte sich in allen verwendeten PCa-Zelllinien eine hochgradige Senkung der NKX3.1-Proteinkonzentration nach Stimulation mit PMA und Ionomycin (Abb.9).
Um zu zeigen, dass ein NKX3.1-Verlust nach PMA + Ionomycin-Stimulation sich

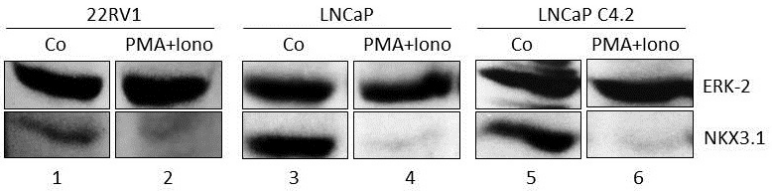

Abb. 9: ***Ko-Stimulation mit PMA und Ionomycin führte in allen verwendeten PCa-Zelllinien zu einem Verlust von NKX3.1 auf Proteinebene.*** *Western-Blot-Analyse aus Gesamtzellextrakten verschiedener PCa-Zelllinien. Stimulation mit je 20 ng/ml PMA, 500 ng/ml Ionomycin über je 6 Stunden. NKX3.1-Bande bei 26 kD, ERK-2-Bande bei 42 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

auch auf mRNA-Ebene zeigt, wurde nach Stimulation von LNCaP-Zellen eine RNA-Extraktion vorgenommen und nach cDNA-Synthese mittels Real-Time-PCR eine quantitative Analyse der NKX3.1-mRNA durchgeführt. Hier zeigten sich signifikante Verringerungen der NKX3.1-mRNA um über 90% gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Siehe Abb.9).

3.4 Stimulation von LNCaP-Zellen mit EGF und PMA + Ionomycin beeinflusst die Expression des Androgenrezeptors sowie der NKX3.1-Zielgene

Um die Auswirkungen der Stimulationen mit EGF bzw. PMA + Ionomycin auf Zielgene von NKX3.1, sowie auf den Androgenrezeptor zu betrachten, wurden LNCaP-Zellen über Nacht mit EGF oder PMA + Ionomycin stimuliert. Anschließend wurde der mRNA-Gehalt von NKX3.1 und dem Androgenrezeptor mittels quantitativer Real-Time-PCR bestimmt Nach Stimulation mit EGF zeigte sich eine NKX3.1-mRNA-Erniedrigung von 50-70%. Dieser Verlust war nach Stimulation mit PMA + Ionomycin mit über 90% sogar noch stärker ausgeprägt (Abb.10). Mit der Expression der Androgenrezeptor-mRNA verhielt es sich ähnlich, wenn auch nicht so drastisch, wie mit der NKX3.1-mRNA. Es war sowohl nach EGF als auch nach PMA + Ionomycin-Stimulation eine Erniedrigung der AR-mRNA zu beobachten. Diese war analog zu der Erniedrigung der NKX3.1-mRNA nach PMA + Ionomycin Stimulation jedoch stärker ausgeprägt (Abb.10).
Es stellte sich weiterhin die Frage, ob der verringerte Gehalt an NKX3.1 auch Auswirkungen auf NKX3.1-Zielgene hat. Um diese Frage zu klären wurde als NKX3.1-Zielgen das Receptor activity modifying protein 1 (RAMP1) ausgesucht, von dem bekannt ist, dass seine Expression in Prostatakarzinomzellen durch NKX3.1 unterdrückt wird. Die Analyse der RAMP-1-mRNA zeigte nach EGF sowie nach PMA + Ionomycin Stimulation einen Anstieg, welcher nach PMA + Ionomycin Stimulation etwas größer war als bei EGF Stimulation (Abb.11). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Repression der RAMP-1 Expression durch eine verminderte NKX3.1-Menge aufgehoben wird und dies somit zu höheren RAMP-1 mRNA Spiegeln führt. Der Befund, dass ein Verlust des NKX3.1-Proteingehalts nach EGF-Stimulation in allen verwendeten Prostatakarzinomzelllinien nachweisbar war, führte zu der Frage welche Signalkaskaden bzw. molekulare Mechanismen daran beteiligt sind. Wie bereits zuvor erwähnt, führte eine TNF-α- oder eine Interleukin-1β-Stimulation in LNCaP-Zellen zum proteasomvermittelten Abbau von NKX3.1. Des Weiteren zeigte sich ein NKX3.1-Verlust auch bei Aktivierung der PKC durch PMA und Ionomycin (Siehe 3.3 und Abb.9). Aufgrund der Tatsache, dass EGF über den EGF-Rezeptor (EGFR), eine membranständige Proteinkinase (Tyrosinkinase), wirkt, wurden die den Rezeptortyrosinkinasen nachgeschalteten Signalwege untersucht.

Um zu untersuchen, über welchen Signalweg der durch EGF induzierte NKX3.1-Verlust

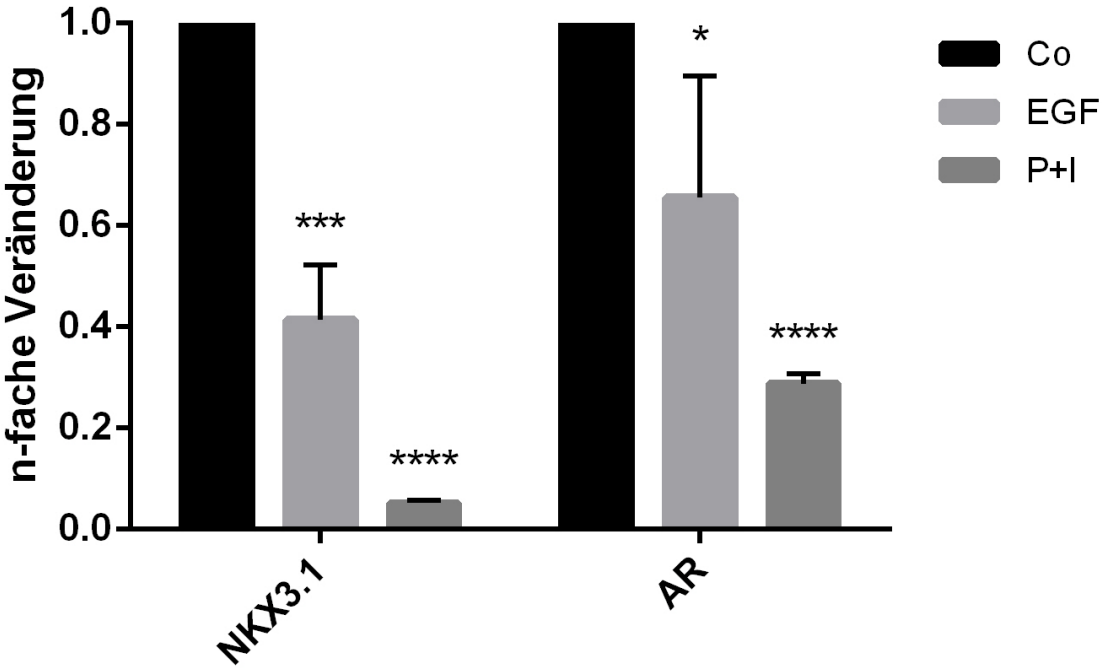

Abb. 10: ***Stimulation mit EGF oder mit PMA + Ionomycin führt in LNCaP-Zellen zu einer Erniedrigung sowohl der NKX3.1- als auch der Androgenrezeptor-mRNA.*** *Quantitative Real-Time-PCR-Analyse unter Verwendung von RNA aus LNCaP-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml EGF und 20 ng/ml PMA + 500 ng/ml Ionomycin über 15 Stunden. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, P+I = Phorbol-12-myristat-13-acetat + Ionomycin, AR = Androgenrezeptor.*

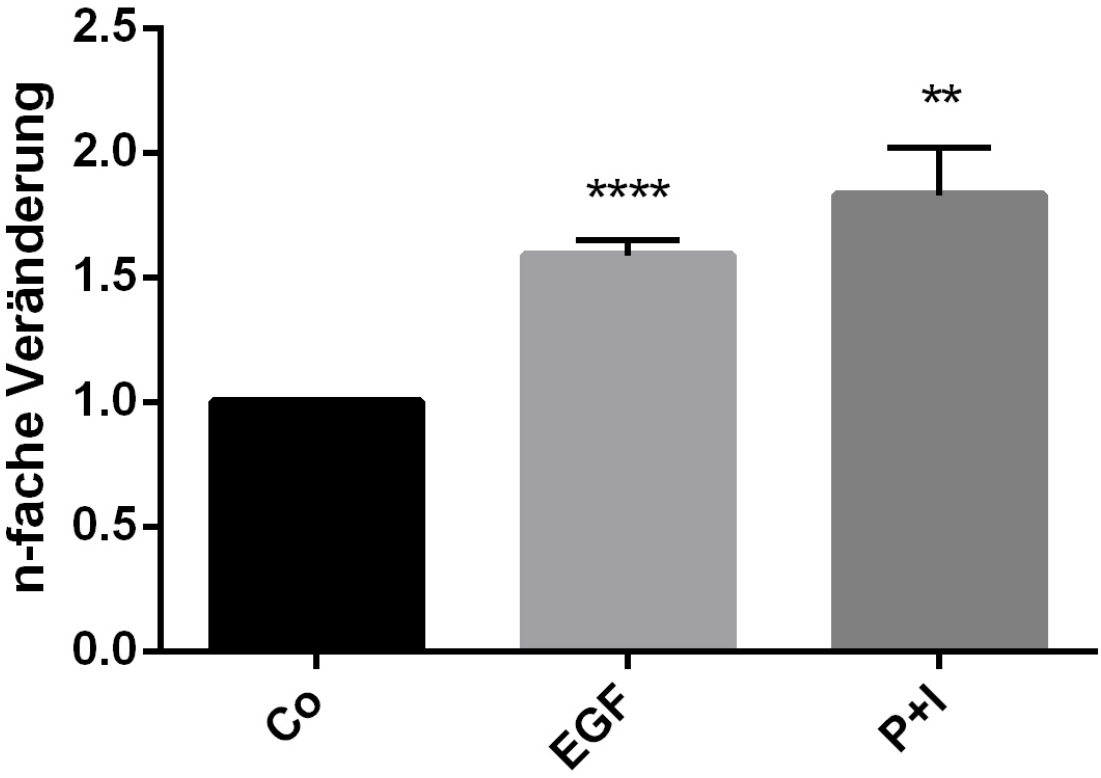

Abb. 11: ***Stimulation mit EGF und PMA + Ionomycin führt in LNCaP-Zellen zu einer Erhöhung der mRNA des NKX3.1 Zielgens RAMP-1.*** *Quantitative Real-Time-PCR-Analyse unter Verendung von cDNA aus LNCaP-Zellen stimuliert mit 100 ng/ml EGF oder 20 ng/ml PMA + 500 ng/ml Ionomycin über 15 Stunden. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Balken relativ zur Kontrolle (Co) gesetzt.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, P+I = Phorbol-12-myristat-13-acetat + Ionomycin.*

vermittelt wird, wurden mit unterschiedlichen Inhibitoren diverse Signalwege vor Stimulation mit EGF oder PMA + Ionomycin gehemmt. Deren Wirkung auf den Signal-induzierten NKX3.1-Abbau ist im Folgenden beschrieben.

3.5 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf den durch EGF und PMA + Ionomycin induzierten Verlust von NKX3.1

3.5.1 Einfluss von PKC-Inhibitoren auf den durch EGF und PMA + Ionomycin Stimulation induzierten NKX3.1-Verlust in LNCaP-Zellen

Da durch eine Ko-Stimulation der PKC mit dem DAG-Analogon PMA und Ionomycin in LNCaP-Zellen bereits ein starker induzierbarer NKX3.1-Verlust nachgewiesen werden konnte (siehe 3.3), wurde mit unterschiedlichen PKC-Inhibitoren versucht die Beteiligung dieser Proteinkinase-Familie auch formal zu prüfen. Hierzu wurden LNCaP-Zellen auf 6-Napf-Platten ausgesät und eine halbe Stunde vor Stimulation mit den PKC-Inhibitoren Gö 6976 oder Bisindolylmaleimide 1 (BIM-1) vorbehandelt.

Als erster PKC-Inhibitor wurde Gö 6976 getestet. Dieser Inhibitor blockiert selektiv die Isoformen PKC_{α}, $PKC_{\beta I}$ und PKC_{μ}. Nach Stimulation zeigte sich unter Inhibition mit Gö 6976 keine Verringerung des durch EGF (Abb.12, Spur 3 und 4) und PMA + Ionomycin (Abb.12, Spur 5 und 6) induzierten NKX3.1 Verlusts auf Proteinebene. Zu notieren ist hierbei, dass die EGF-Wirkung in diesem speziellen Experiment über die Stimulationszeit von 4 Stunden auf Proteinebene kaum sichtbar ist (Abb.12, vergleiche Spuren 1 und 3). Es wurden längere Stimulationen durchgeführt, in welchen sich Gö 6976 jedoch als toxisch für die verwendeten LNCaP-Zellen erwies.

Um auch andere Isoformen der PKC-Familie abzudecken, wurde zusätzlich ein Inhibitionsexperiment mit dem Inhibitor BIM-1 (Bisindolylmaleimide-1) durchgeführt. Dieser ist wie Gö 6976 ein Inhibitor für die PKC-Isoformen PKC_{α} und $PKC_{\beta I}$, hemmt aber zusätzlich noch die Isoformen PKC_{δ}, PKC_{ϵ} und PKC_{ξ}.

Im Gegensatz zur Stimulation mit Gö 6976 zeigte sich sowohl in LNCaP-Zellen als auch in C4.2-Zellen nun unter Stimulation mit PMA + Ionomycin ein deutlich verrin-

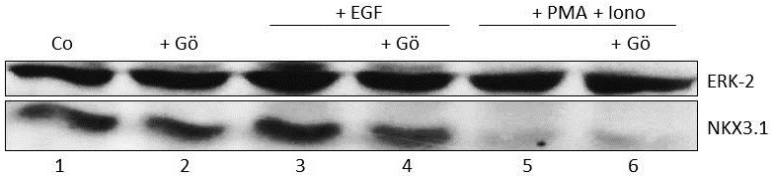

Abb. 12: ***Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor Gö 6976 hat keinen Einfluss auf den durch EGF oder PMA+Ionomycin-Stimulation induzierten Verlust von NKX3.1 auf Proteinebene in LNCaP-Zellen.*** *Western-Blot-Analyse von LNCaP-Gesamtzellextrakten nach 4 h Stimulation mit 50 ng/ml EGF (Spur 3 und 4) oder mit 20 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (Spur 5 und 6). Der PKC-Inhibitor Gö 6976 wurde 30min vor Stimulation in einer Konzentration von 25 ng/ml zugegeben (Spuren 2, 4 und 6). ERK-2 Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

gerter Verlust von NKX3.1 auf Proteinebene (Abb.13, Spur 5 und 6; Abb.14, Spur 5 und 6).

Der durch EGF hervorgerufene NKX3.1-Verlust konnte jedoch mit BIM-1 Vorbehand-

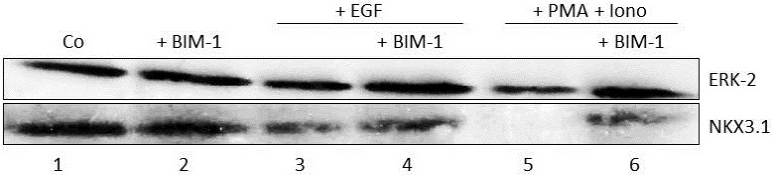

Abb. 13: ***Zugabe des PKC-Inhibitors BIM-1 verringert den durch EGF und PMA + Ionomycin Stimulation induzierten Verlust von NKX3.1 in LNCaP C4.2-Zellen auf Proteinebene.*** *Western-Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten von LNCaP C4.2-Zellen nach Stimulation mit 50 ng/ml EGF (Spur 3 und 4) bzw. 500 ng/ml Ionomycin + 20 ng/ml PMA (Spur 5 und 6) über 15 Stunden. Zu den Zellen der Spuren 2, 4 und 6 wurden zusätzlich 30 min vor Stimulation 20 ng/ml des PKC-Inhibitors BIM-1 hinzugegeben. Anti-ERK-2 Bande bei 42 kD, anti-NKX3.1 Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

lung deutlich weniger gehemmt werden. Dies lässt darauf schließen, dass der durch EGF-induzierte NKX3.1-Verlust weniger über die PKC vermittelt wird, wie der Verlust nach Ko-Stimulation mit PMA + Ionomycin.

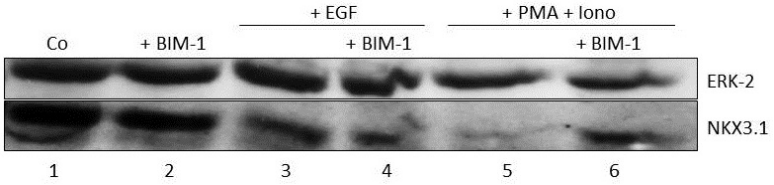

Abb. 14: ***Zugabe des PKC-Inhibitors BIM-1 verringert den durch PMA + Ionomycin Stimulation induzierten Verlust von NKX3.1 in LNCaP-Zellen auf Proteinebene.*** *Western-Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten von LNCaP - Zellen nach Stimulation mit 50 ng/ml EGF (Spur 3 und 4) bzw. 500 ng/ml Ionomycin + 20 ng/ml PMA (Spur 5 und 6) über 15 Stunden. Zu den Zellen der Spuren 2, 4 und 6 wurden zusätzlich 30 min vor Stimulation 20 ng/ml des PKC-Inhibitors BIM-1 hinzugegeben. Anti-ERK-2 Bande bei 42 kD, anti-NKX3.1 Bande bei 26 kD. Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.*

3.5.2 Einfluss von PI3-Kinase-Inhibitoren auf den durch EGF induzierten Verlust von NKX3.1 in Prostatakarzinomzellen

Aufgrund der bereits beschriebenen Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) -Aktivierung nach Ligandenbindung an dem EGF-Rezeptor (EGFR), stellte sich die Frage, ob der PI3K-Signalweg an der Regulation des NKX3.1-Verlustes nach EGF-Stimulation beteiligt ist. Um dies zu überprüfen, wurde der PI3-Kinase-Inhibitor NVP-BEZ235 30 Minuten vor EGF-Stimulation zu LNCaP-Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Proteine der Gesamtzellextrakte mittels Western-Blot analysiert. Es zeigte sich hierbei keine sichtbare Veränderung zwischen EGF-Stimulation mit oder ohne Vorbehandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor NVP-BEZ235. (Siehe Abb.15, Spur 2, 3 und 4)

Wortmannin stellt als kovalenter Inhibitor einen anderen PI3-Kinase-Inhibitor dar. Auch hier wurden wiederum LNCaP-Zellen 30 Minuten vor EGF-Stimulation mit 50 ng/ml Wortmannin vorbehandelt. Nach anschließender Proteinisolation und Western-Blot-Analyse zeigte sich auch bei diesem PI3-Kinase-Inhibitor keine Verminderung des durch EGF-Stimulation induzierten Verlusts von NKX3.1.
Auch die NKX3.1-Abnahme nach PMA + Ionomycin Ko-Stimulation wurde nicht beeinflusst (Abb.16).

Die Stimulation wurde hier nur über sechs Stunden durchgeführt, da bei vorhergegangenen längeren Stimulationen Wortmannin in der benötigten Konzentration eine

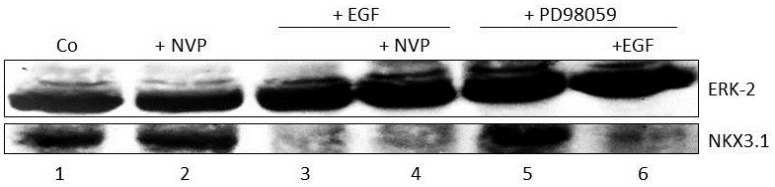

Abb. 15: ***Vorbehandlung mit dem PI3-Kinase-Inhibitor NVP-BEZ235 oder dem MEK-1-Inhibitor PD98059 hat keinen Einfluss auf den durch EGF-Stimulation induzierten Verlust des NKX3.1-Proteins in LNCaP-Zellen.*** *Western-Blot-Analyse aus LNCaP Gesamtzellextrakten nach 15 h Stimulation mit 100 ng/ml EGF (Spur 3 und 6). Die Inhibitoren NVP-BEZ235 (PI3-Kinase-Inhibitor) und PD98059 (MEK-1-Inhibitor) wurden je 30 min vor Stimulation mit EGF zugegeben. NVP-BEZ235 (Spur 2 und 4) in einer Konzentration von 10 ng/ml, PD98059 (Spur 5 und 6) in 20 ng/ml. ERK-2-Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

toxische Wirkung auf die verwendeten LNCaP-Zellen hatte.

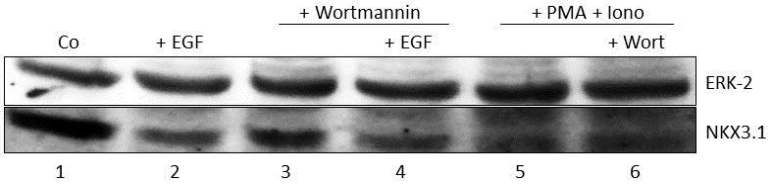

Abb. 16: ***Der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin hat keinen Einfluss auf den durch EGF- und PMA + Ionomycin-Stimulation induzierten Verlust des Tumorsuppressors NKX3.1 auf Proteinebene in LNCaP-Zellen.*** *Western-Blot-Analyse aus LNCaP-Gesamtzellextrakten nach Stimulation mit 100 ng/ml EGF (Spur 2+4) bzw. 20 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (Spur 5+6) für 6h. Der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml 30 min vor Stimulation zugegeben. ERK-2-Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

3.5.3 Einfluss eines MEK-1-Inhibitors auf den durch EGF induzierten Verlust von NKX3.1 in Prostatakarzinomzellen

Eine weitere Signalkaskade, die dem EGF-Rezeptor nachgeschaltet ist, verläuft über RAS/RAF und MEK zu den MAP-Kinasen. Um zu überprüfen, ob der Verlust von NKX3.1 nach EGF-Stimulation über diesen Signalweg erfolgt, wurde der MEK-1-

Inhibitor PD98059 eingesetzt.

Der MEK-1-Inhibitor PD98059 wurde eine Stunde vor Stimulation mit EGF zu den in 6-Napf-Platten ausgesäten LNCaP-Zellen gegeben. Anschließend wurden Proteinextrakte gewonnen, welche mittels Western-Blot analysiert wurden.

Es zeigte sich nach Stimulation mit EGF kein signifikanter Unterschied im NKX3.1-Gehalt zwischen der Probe mit und der Probe ohne dem zugegebenen MEK-1-Inhibitor (Abb.15, Spur 5 und 6). Dies deutet darauf hin, dass der MAPK-Signalweg nicht an der Regulation des NKX3.1-Verlusts beteiligt ist .

3.5.4 Auswirkung der Inhibition des IκB-Kinase-Komplexes (IKK) auf den durch EGF induzierten Verlust von NKX3.1 in Prostatakarzinomzellen

Der NFκB-Signalweg (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) ist aufgrund seiner Beteiligung an einer Vielzahl von zellulären Prozessen ein potentieller Regulator des EGF-induzierten NKX3.1-Verlustes. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass die IκB-Kinasen neben ihren primären Substraten aus der IκB-Familie auch eine ganze Reihe weiterer, nicht-IκB-Proteine phosphorylieren. Folglich wurde eine Beteiliguung dieses Signalweges an dem NKX3.1-Abbauprozess analysiert.

Um zu untersuchen, ob der durch EGF-induzierte NKX3.1-Verlust über die IKK-Signalkaskade vermittelt wird, wurde der kommerziell erhältliche IKK-Inhibitor BAY 11-7082, welcher IKK1 sowie IKK2 hemmt, in einem weiteren EGF-Stimulationsexperiment eingesetzt.

LNCaP-Zellen wurden hierzu auf 6-Napf-Platten ausgesät und 30 Minuten vor der Stimulation mit EGF mit 100 ng/ml des IKK-Inhibitors BAY 11-7082 vorbehandelt. Es zeigte sich hierbei keine Verminderung des NKX3.1-Verlustes unter IKK-Inhibition, jedoch verminderte die Stimulation mit BAY 11-7082 alleine schon die NKX3.1-Konzentration, sodass der Unterschied nach EGF-Stimulation schwer zu beurteilen war. (Abb.17).

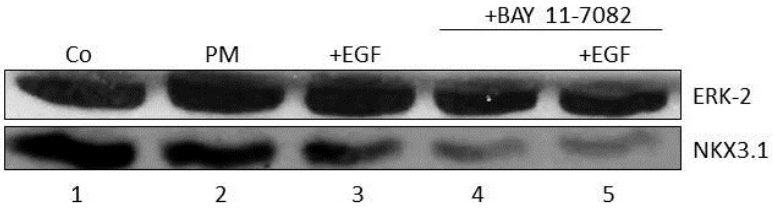

Abb. 17: ***IKK-Inhibition verhindert nicht den durch EGF induzierten NKX3.1 Verlust auf Proteinebene in LNCaP-Zellen.*** *Western.Blot.Analyse von LNCaP-Gesamtzellextrakten nach Stimulation mit 50 ng/ml EGF über 6 h (Spur 3 und 5). Ausgewählte Ansätze wurden 30 min vor der EGF-Stimulation mit 100 ng/ml des IKK-Inhibitors BAY 11-7082 vorbehandelt (Spur 4 und 5). Zur Bestätigung des Experimentes in Abb.22 wurde ein weiterer Ansatz mit Prostata-Medium behandelt, um einen rein durch Androgendefizienz hervorgerufenen NKX3.1 Verlust zu bestätigen (Spur 2). ERK-2 Bande bei 42 kD, NKX3.1 Bande bei 26 kD.*
IKK = IκB-Kinase, Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, PM = Prostata-Medium, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

3.5.5 Glykogen-Synthase-Kinase-3-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf den EGF -induzierten Verlust von NKX3.1 in Prostatakarzinomzellen

Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass durch Wachstumsfaktoren, wie EGF und PDGF die GSK-3-inaktivierende Kinase $p90^{RSK}$ durch MAP Kinasen stimulieren. Diese GSK-3-inaktivierende Kinase führt wiederum zu einer Phosphorylierung an Ser9 bzw. Ser21 von GSK-3 und somit zu deren Inaktivierung.

Um zu überprüfen, ob GSK-3 bei dem EGF-induzierten NKX3.1-Verlust eine Rolle spielt, wurden LNCaP-Zellen auf 6-Napf-Platten ausgesät und vor einer EGF-Stimulation eine Stunde lang mit den GSK-3-Inhibitoren SB-216763 und SB-415286 in einer Konzentration von je 50 ng/ml vorbehandelt. Die Zellen wurden anschließend geerntet und die resultierenden Gesamtzellextrakten wurden mittels Western-Blot analysiert.

Auch hier zeigte sich weder nach SB-216763- (Abb.18, Spur 3 und 4), noch bei SB-415286-Vorbehandlung (Abb.18, Spur 5 und 6) eine Verringerung des EGF-induzierten Verlustes von NKX3.1 im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor (Abb.18, Spur 2).

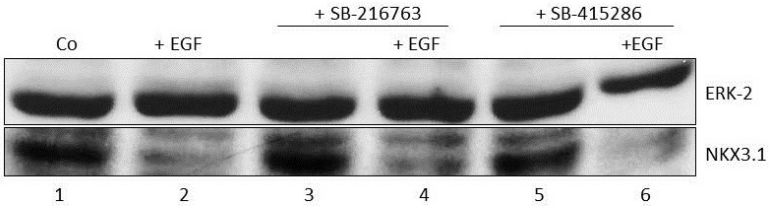

Abb. 18: ***Die Glykogen-Synthase-Kinase-3-Inhibitoren SB-216763 und SB-415286 verhindern nicht den durch EGF-induzierten NKX3.1-Verlust in LNCaP-Zellen.*** *Western-Blot-Analyse von LNCaP-Gesamtzellextrakten nach einstündiger Vorbehandlung der Zellen mit dem jeweiligen GSK-3-Inhibitor und anschließender Stimulation mit 100 ng/ml EGF über 15 h. SB-216763- und SB-415286- Konzentrationen je 50 ng/ml. ERK-2-Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

3.5.6 Der EGF- und PMA + Ionomycin-induzierte NKX3.1-Verlust ist Proteasom-abhängig

Früher publizierte Studien beschreiben bereits einen NKX3.1-Verlust nach Stimulation mit den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF-α und IL-1β. Der NKX3.1-Verlust erfolgte nach spezifischer Phosphorylierung in der C-terminalen-Domäne, anschließender Ubiquitinierung und proteasomaler Degradation. In LNCaP und LNCaP C4.2 Zellen konnte der NKX3.1-Proteinverlust zusätzlich auch für IL-1α gezeigt werden (Abb.3 und Abb.4).

Um zu überprüfen, ob nach EGF-Stimulation in ähnlicher Weise eine proteasomale Degradation von NKX3.1 erfolgt, wurden LNCaP und C4.2 Zellen mit Proteasom-Inhibitoren vorbehandelt und nachfolgend mit 100 ng/ml EGF stimuliert.

Zunächst wurde der potente und spezifische Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet. Dieser wurde je nach Experiment 30 Minuten vor EGF bzw. PMA + Ionomycin Stimulation in einer Konzentration von 20-50 ng/ml zu den in 6-Napf-Platten ausgesäten Prostatakarzinomzellen gegeben.

Es zeigte sich hierbei sowohl bei LNCaP-Zellen, als auch bei C4.2-Zellen nach EGF und PMA + Ionomycin Stimulation ein Verringerter Verlust von NKX3.1 auf Proteinebene in den mit MG132 vorbehandelten Proben (Abb.19, Abb.20).

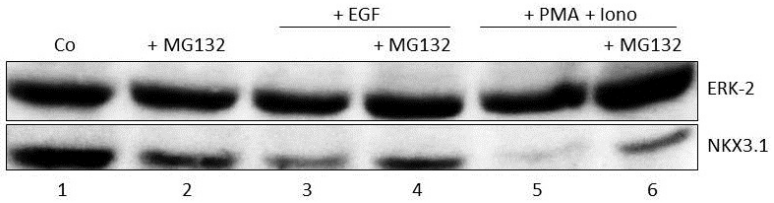

Abb. 19: ***Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 stabilisierte den NKX3.1-Proteinspiegel nach EGF und PMA + Ionomycin-Stimulation von LNCaP-Zellen.*** *Western-Blot-Analyse aus LNCaP Gesamtzellextrakten nach 6 h Stimulation mit 50 ng/ml EGF (Spur 3 und 4) und 6 h Stimulation mit 20 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (Spur 5 und 6). Der Proteasom-Inhibitor MG132 wurde 30 min vor Stimulation in einer Konzentration von 25 ng/ml zugegeben (Spur 2, 4 und 6). ERK-2 Bande bei 42 kD, NKX3.1 Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

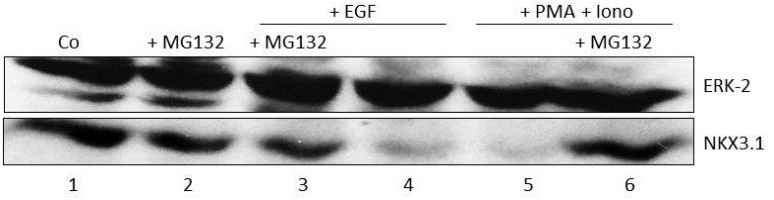

Abb. 20: ***Inhibition des Proteasoms mittels MG132 verringerte den EGF- oder PMA + Ionomycin-induzierten NKX3.1-Proteinverlust in LNCaP C4.2-Zellen.*** *Western-Blot-Analyse mit LNCaP C4.2 Gesamtzellextrakten nach 6 h Stimulation mit 50 ng/ml EGF (Spur 3 und 4) oder 6 h Stimulation mit 20 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin (Spur 5 und 6). Der Proteasom-Inhibitor MG132 wurde 30 min vor Stimulation in einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben (Spur 2, 3 und 6). ERK-2 Bande bei 42 kD, NKX3.1 Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

Des Weiteren wurde auch der zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassene Proteasom-Inhibitor Bortezomib auf seine Auswirkung auf den durch EGF- bzw. PMA + Ionomycin- induzierten Verlust von NKX3.1 untersucht. Hierzu wurden erneut LNCaP-Zellen auf 6-Napf-Platten ausgesät und 30 Minuten vor Stimulation mit EGF bzw. PMA + Ionomycin mit 50 ng/ml Bortezomib vorbehandelt.

Es zeigte sich auch hier eine Verringerung sowohl des durch EGF, als auch durch PMA + Ionomycin Stimulation induzierten Verlusts des NKX3.1-Proteinspiegels (Abb.21).

Um zu überprüfen, ob nach Inhibition mit Proteasom-Inhibitoren auch die NKX3.1-mRNA-Ebene stabilisiert werden kann, wurde von den Zellen der Experimente von Abb.19 und Abb.21 parallel RNA extrahiert und diese nach cDNA-Synthese mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert.

Es zeigten sich hier sowohl nach MG132- als auch nach Bortezomib-Vorbehandlung eine Reduktion der NKX3.1-mRNA. Zudem konnte auch keine Stabilisierung der NKX3.1-mRNA-Spiegel nach Vorbehandlung mit den Proteasom-Inhibitoren beobachtet werden (Abb.22, Abb.23).

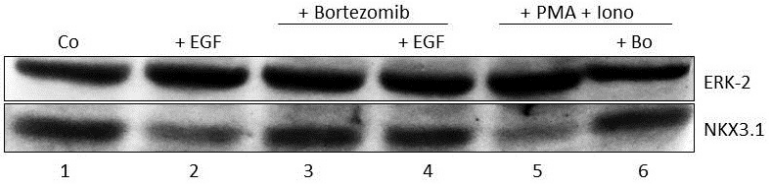

Abb. 21: ***Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Bo) verhindert sowohl den durch EGF-Stimulation, als auch den durch PMA+Ionomycin-Stimulation induzierten Verlust von NKX3.1 auf Proteinebene in LNCaP-Zellen.*** *Western-Blot-Analyse aus Gesamtzellextrakten von LNCaP-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml EGF und 20 ng/ml PMA + 50 ng/ml Ionomycin über 6 Stunden. Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib wurde 30 min vor Stimulation in einer Konzentration von 50 ng/ml. ERK-2-Bande bei 42 kD und NKX3.1-Bande bei 26 kD.*

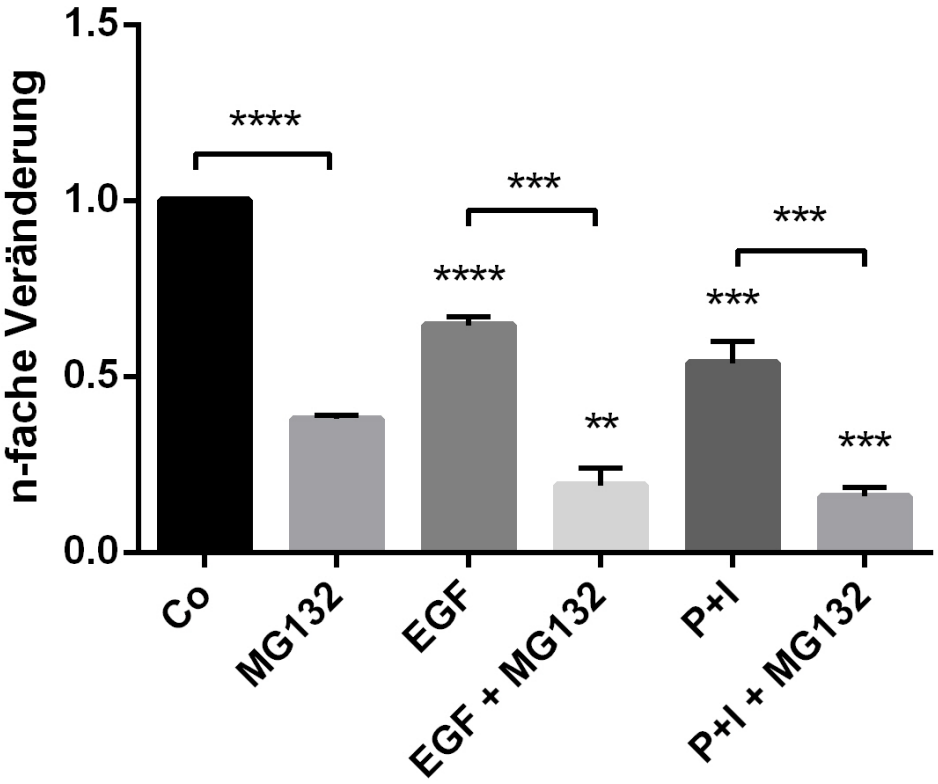

Abb. 22: ***Vorbehandlung von LNCaP-Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 vermindert die NKX3.1-mRNA-Spiegel und verstärkt den EGF- bzw. PMA + Ionomycin-induzierten NKX3.1-Verlust.*** *Quantitative Real-Time-PCR-Analyse von LNCaP-RNA-Extrakten. Für die cDNA-Synthese wurden 250 ng RNA verwendet. Referenzgen war GAPDH.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, P+I = Phorbol-12-myristat-13-acetat + Ionomycin.*

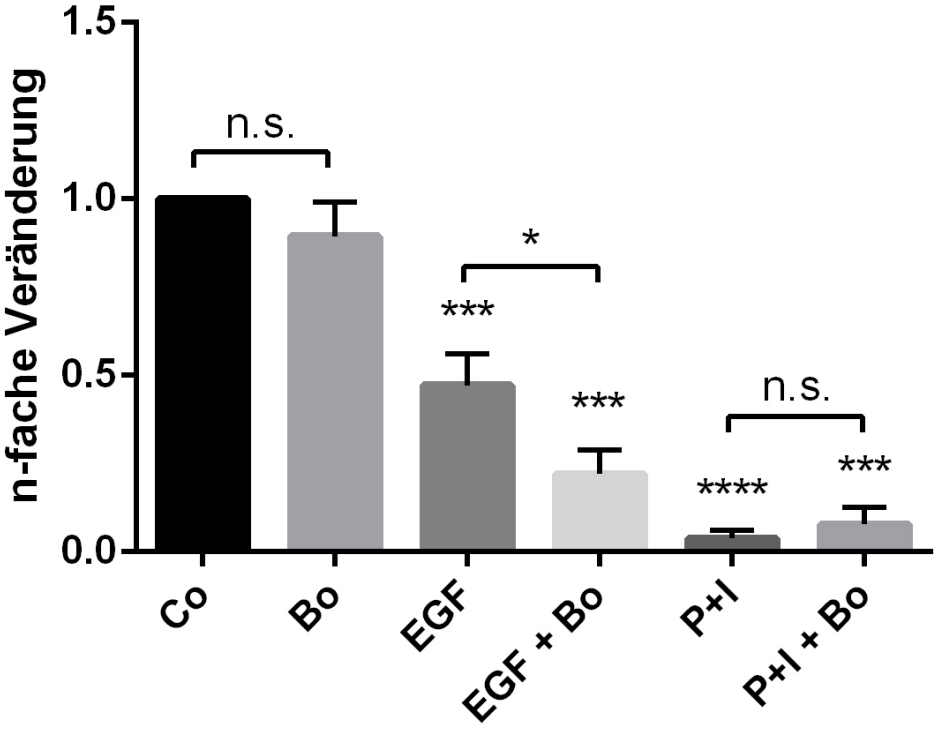

Abb. 23: ***Vorbehandlung von LNCaP-Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Bo) hat keinen stabilisierenden Effekt auf den EGF-induzierten NKX3.1-mRNA Verlust.*** *Der durch PMA + Ionomycin-Stimulierte Verlust zeigt nach Vorbehandlung mit Bortezomib eine leichte Stabilisierung. Quantitative Real-Time-PCR-Analyse von LNCaP-RNA-Extrakten. Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng RNA verwendet. Referenzgen war β-Aktin.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, P+I = Phorbol-12-myristat-13-acetat + Ionomycin, Bo = Bortezomib.*

3.6 Ein Entzug von Androgenen führt in LNCaP-Zellen zu einer Erniedrigung des NKX3.1-Proteinspiegels

Es ist bereits bekannt, dass NKX3.1 die Expression des Androgen-Rezeptors (AR) und umgekehrt Androgene durch Bindung an den AR die NKX3.1-Expression positiv beeinflussen.

Im folgenden Experiment wurde überprüft, welche Auswirkungen die Androgene auf den EGF-induzierten NKX3.1-Verlust in LNCaP-Zellen haben. Hierzu wurden die Zellen eine Stunde vor Stimulationsbeginn auf Prostatamedium (PM) statt in LNCaP-Medium gesetzt. Das Prostatamedium enthält im Gegensatz zum LNCaP-Medium ein Fötales Kälberserum (Fetal calf serum, FCS), das durch eine Vorbehandlung mit Aktivkohle von Steroidhormonen und ähnlichen Verbindungen befreit wurde. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen jeweils mit EGF alleine stimuliert oder zusätzlich 20 ng/ml Dihydrotestosteron (DHT) zugegeben. (Abb.24) Es zeigten sich hierbei wie

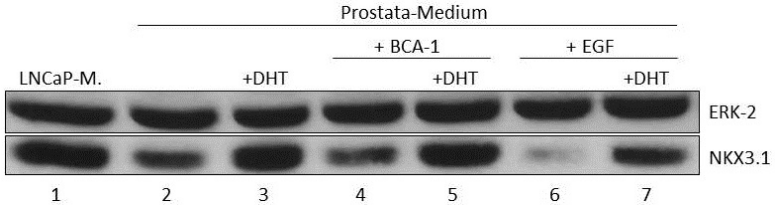

Abb. 24: ***Androgene modulieren die basale NKX3.1-Expression, haben aber keinen Einfluss auf den EGF-induzierte NKX3.1-Verlust.*** *Western-Blot-Analyse von LNCaP-Gesamtzellextrakten. Die Zellen wurden in normalem LNCaP-Medium belassen (Spur 1) oder 1 h vor Stimulation mit Androgen-freiem Prostata-Medium versetzt (Spuren 2-7). Nachfolgend wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen (Spur 2), mit 20 ng/ml DHT für 6 h stimuliert (Spuren 3, 5, 7), oder zusätzlich mit 20 ng/ml BCA-1 (CXCL13; Spuren 4+5)) oder mit 50 ng/ml EGF (Spuren 6+7) für 6 h stimuliert. ERK-2 Bande bei 42 kD, NKX3.1 Bande bei 26 kD.*
LNCaP-M. = LNCaP-Medium, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, BCA = B-Lymphozyten Chemoattraktant, DHT = Dihydrotestosteron, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase.

erwartet reduzierte basale NKX3.1-Proteinspiegel in den Zellen, welche mit Prostata-Medium vorbehandelt wurden (Abb.24, Spur 2). Dieser konnte durch eine nachfolgende Zugabe von 20 ng/ml DHT nahezu vollständig revertiert werden (vgl. Abb.24, Spuren 1 und 3). Unter Stimulation mit 50 ng/ml EGF ist hier sowohl bei der Probe ohne DHT (Abb.24, Spur 2 zu 6), als auch unter Androgen-Einfluss (Abb.24, Spur 3 zu 7) eine Senkung des NKX3.1-Proteingehalts zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass der

Verlust von NKX3.1 durch EGF-Stimulation unabhängig von Androgenen ist.

Um die Lokalisation von NKX3.1 in Prostatakarzinomzellen zu bestimmen, wurden parallel präparierte nukleäre und zytoplasmatische Protein-Extrakte ebenfalls mittels Western-Blot analysiert. Als Ladekontrolle für nukleäre Extrakte wurden Antikörper gegen die im Zellkern lokalisierte Histon-Deacetylase-1 (HDAC-1) verwendet, für zytoplasmatische Extrakte wurden Antikörper gegen ERK-2 verwendet.

Es zeigten sich hierbei im Western-Blot deutlich erhöhte NKX3.1-Proteinkonzentrationen in den nukleären Extrakten und wenig bis kein Signal in den zytoplasmatischen Extrakten. (Abb.25, Abb.26)

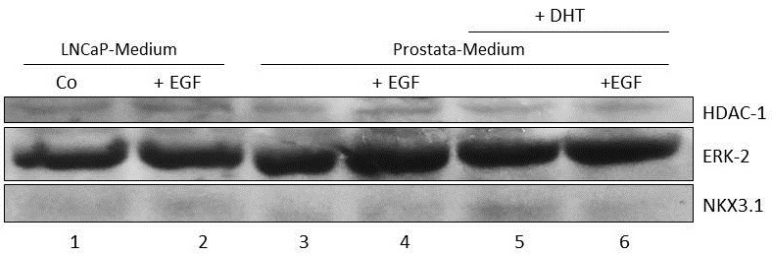

Abb. 25: ***Geringe NKX3.1-Konzentrationen in zytoplasmatischen Extrakten von LNCaP-Zellen.*** *Western-Blot-Analyse von zytoplasmatischen Extrakten aus LNCaP-Zellen. In den Proben 3 bis 6 wurde das LNCaP-Medium eine Stunde vor Stimulation gegen Prostata-Medium ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml EGF (Spur 2, 4 und 6) und 20 ng/ml DHT (Spur 5 und 6) über 15 h Stimuliert. ERK-2-Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD und HDAC-1-Bande bei 60 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase, HDAC = Histondeacetylase, DHT = Dihydrotestosteron.

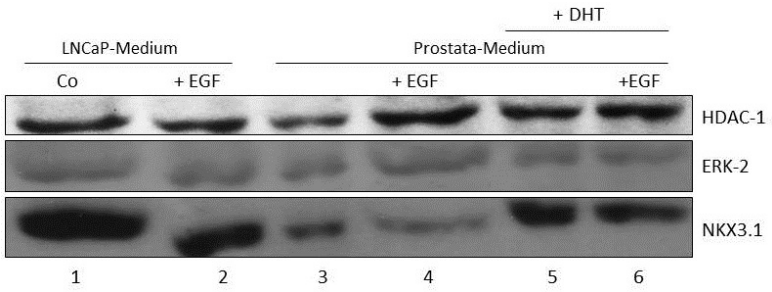

Abb. 26: ***In nukleären Extrakten von LNCaP-Zellen zeigt sich eine deutliche Verminderung der NKX3.1 Proteinkonzentration durch Androgen-Entzug.*** *Western-Blot-Analyse von zytoplasmatischen Extrakten aus LNCaP-Zellen. In den Proben 3 bis 6 wurden die Zellen eine Stunde vor Stimulation auf androgenfreies Prostata-Medium gesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/ml EGF (Spur 2, 4 und 6) und 20 ng/ml DHT (Spur 5 und 6) über 15 h stimuliert. ERK-2-Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD und HDAC-1-Bande bei 60 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase, HDAC = Histondeacetylase, DHT = Dihydrotestosteron.

3.7 Inhibition verschiedener Signalwege mittels siRNA und deren Einfluss auf den EGF vermittelten Verlust von NKX3.1

Um die Ergebnisse der diversen Inhibitionsexperimente (3.5.1 - 3.5.6) zu erweitern, wurde in weiteren Versuchen zusätzlich die Expression spezifischer Proteine, welche potentiell am EGF induzierten NKX3.1-Verlust beteiligt sein könnten, mittels siRNA reduziert. Verwendet wurden hierzu siRNA gegen:

- Untereinheiten des IκB-Kinase Komplexes: IKK-α und IKK-β (IKK1 und IKK2)
- Untereinheiten des NF-κB-Komplexes: NF-κB2 (p52), RelA (p65) und RelB
- Den Androgenrezeptor (AR)
- Die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3)
- Das B-Zell-Lymphom-Protein-10 (BCL10)

In einem ersten Experiment wurden mittels siRNA gegen IKK-α, IKK-β und p52 (NF-κB2) hauptsächlich Komponenten des NF-κB Signalwegs auf ihre Beteiligung am EGF-induzierten Verlust von NKX3.1 in LNCaP-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde aufgrund der zuvor erwähnten Tatsache der Koregulation von NKX3.1 und dem Androgenrezeptor noch siRNA gegen AR verwendet.

Es zeigte sich hierbei nach Reduktion der NF-κB-Komponenten keine Veränderung des NKX3.1-Verlustes auf Proteinebene, was eine Beteiligung dieses Signalweges unwahrscheinlich erscheinen lässt. Durch die Inhibition der Transkription des Androgenrezeptors zeigte sich jedoch wie erwartet eine Reduktion der basalen NKX3.1-Expression (Abb.27, Spur 7 und 8). Als Kontrolle der Transfektion wurden Antikörper gegen IKK-α verwendet (Abb.27).

Weitere Komponenten des NF-κB-Komplexes (RelA und RelB) sowie die GSK-3β und

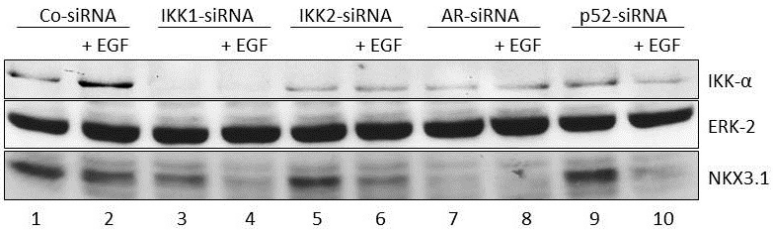

Abb. 27: ***Effekte der siRNA-vermittelten Reduktion von IKK- und NF-κB- Untereinheiten sowie des Androgenrezeptors auf die basale NKX3.1-Expression und den EGF-induzierten NKX3.1-Verlust.*** *Western-Blot-Analyse von LNCaP-Gesamtzellextrakten nach Transfektion der jeweiligen siRNA und Stimulation mit 100 ng/ml EGF für 15 Stunden. Die siRNA wurden nach Viromer-Protokoll transfiziert und anschließend für 48 Stunden inkubiert. siRNA-Konzentration: 100 nM. ERK-2-Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD und Ikk-α-Bande bei 85 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, IKK = IκB-Kinase, AR = Androgenrezeptor, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase, siRNA = small interfering RNA.

BCL10 wurden mithilfe von siRNA-Transfektion unterdrückt um ihren potentiellen Einfluss auf den EGF-vermittelten Verlust von NKX3.1 zu untersuchen. Hier wurden LNCaP-Zellen erneut nach dichtem Wachstum mit der jeweiligen siRNA transfiziert und nach 48 Stunden Inkubation mit EGF über Nacht stimuliert.

Die Repression keines der analysierten Faktoren bedingte eine Reduktion des EGF-induzierten NKX3.1-Verlustes. Durch eine Repression von BCL10 und der GSK-3β scheint der Verlust auf Proteinebene eher zugenommen zu haben (Abb.28). Zur Kontrolle der Transfektion wurden hier ein Antikörper gegen RelA (Abb.28, Spur 3 und 4). In einem weiteren Versuch wurde die Auswirkung der Inhibition von NKX3.1 selbst mittels siRNA mit und ohne Stimulation mit EGF untersucht. Dieses Experiment sollte auch zur Klärung der Frage beitragen ob der Verlust des Androgenrezeptors (Siehe

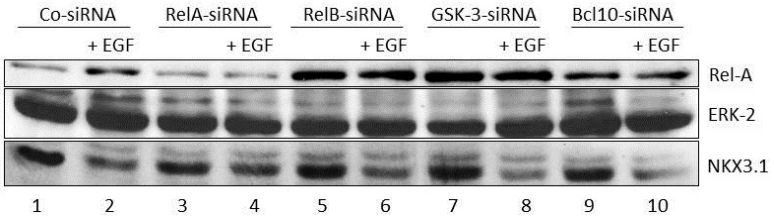

Abb. 28: ***Effekte der siRNA-vermittelten Reduktion spezifischer NF-κB-Untereinheiten sowie BLC10 oder GSK3β auf die basale NKX3.1-Expression und den EGF-induzierten NKX3.1-Verlust.*** *Western-Blot-Analyse von LNCaP-Gesamtzellextrakten nach Transfektion der jeweiligen siRNA und Stimulation mit 100 ng/ml EGF für 15 Stunden. Die siRNA wurde in einer Konzentration von 100 nM nach Viromer-Protokoll transfiziert und anschließend für 48 Stunden inkubiert. ERK-2-Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD und RelA bei 60 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, GSK = Glykogen-Synthase-Kinase, BCL10 = B-Zell-Lymphom-10, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase, siRNA = small interfering RNA.

Abb.10) durch den Verlust von NKX3.1 bedingt wird, oder ob EGF einen direkten Einfluss auf den Androgenrezeptor hat. Hierzu wurden zuerst zwei siRNA´s gegen NKX3.1 entworfen (Genaue Sequenzen siehe 2.1.7). Erneut wurden LNCaP-Zellen mit den siRNA´s transfiziert und nach 48 Stunden Inkubation mit EGF stimuliert. Zusätzlich wurde zum Vergleich auch der Androgenrezeptor inhibiert. Als Transfektionskontrolle dienten die Spiegel von NKX3.1.

Wie erwartet zeigte sich wieder eine reduzierte basale NKX3.1-Proteinexpression in LNCaP-Zellen, welche mit der AR-spezifischen siRNA transfiziert wurde. Auch hier induzierte die EGF-Stimulation einen weiteren Abfall der NKX3.1-Proteinspiegel (Abb.29, Spur 3 und 4). Verminderte NKX3.1-Proteinspiegel waren ebenfalls nach Transfektion der NKX3.1-siRNA1 zu beobachten, welche sich durch eine zusätzliche EGF-Stimulation nicht weiter reduzieren lies. Die NKX3.1-siRNA2 hingegen zeigte kaum Auswirkungen, was aufgrund gleicher Ergebnisse in Folgeexperimenten auf eine Funktionslosigkeit dieser siRNA hindeutet (Abb.29).

Von den Proben der Inhibition von NKX3.1 mittels siRNA wurde zusätzlich noch eine Analyse des mRNA-Gehalts mittels Real-Time-PCR durchgeführt, um die Frage zu klären, ob die siRNA-vermittelte NKX3.1-Reduktion für eine verminderte AR-Expression ausreichend ist.

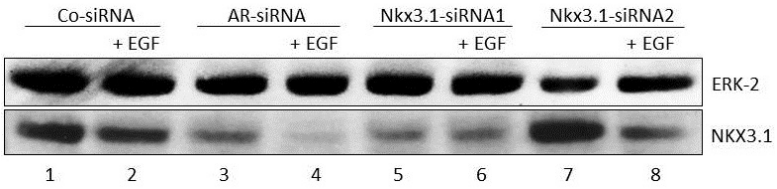

Abb. 29: ***Effektive Reduktion des zellulären NKX3.1-Proteingehalts bei Verwendung der NKX3.1siRNA1. NKX3.1-siRNA2 hat keinen Einfluss auf den NKX3.1-Proteingehalt.*** *Transfektion von 100 nM der jeweiligen siRNA nach Viromer-Protokoll, anschließend Inkubation über 48h. Danach Stimulation mit je 100 ng/ml EGF für 15 h. Western-Blot-Analyse aus den geernteten Gesamtzellextrakten. ERK-2-Bande bei 42 kD, NKX3.1-Bande bei 26 kD.*
Co = Kontrolle, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor, AR = Androgenrezeptor, ERK = Extrazelluläre signalregulierte Kinase, siRNA = small interfering RNA.

Die Veränderung der NKX3.1-mRNA-Konzentration spiegelten die im Western-Blot beobachteten Resultate wider (Abb.29). Nach Transfektion der AR-spezifischen siRNA ist eine deutliche Reduktion der NKX3.1-mRNA zu beobachten, welcher nach EGF-Stimulation noch deutlicher ausfällt. Auch hier sieht man nach Transfektion der NKX3.1-siRNA1 (N1, Abb.30) einen Verlust von NKX3.1-mRNA um ca. 80%, welcher durch zusätzliche EGF-Stimulation im Gegensatz zur Inhibition mit AR-siRNA nicht weiter erniedrigt werden konnte. Die Transfektion mit NKX3.1-siRNA2 (N2) hatte auch hier keinen signifikanten Einfluss auf den NKX3.1-mRNA-Gehalt in LNCaP-Zellen.

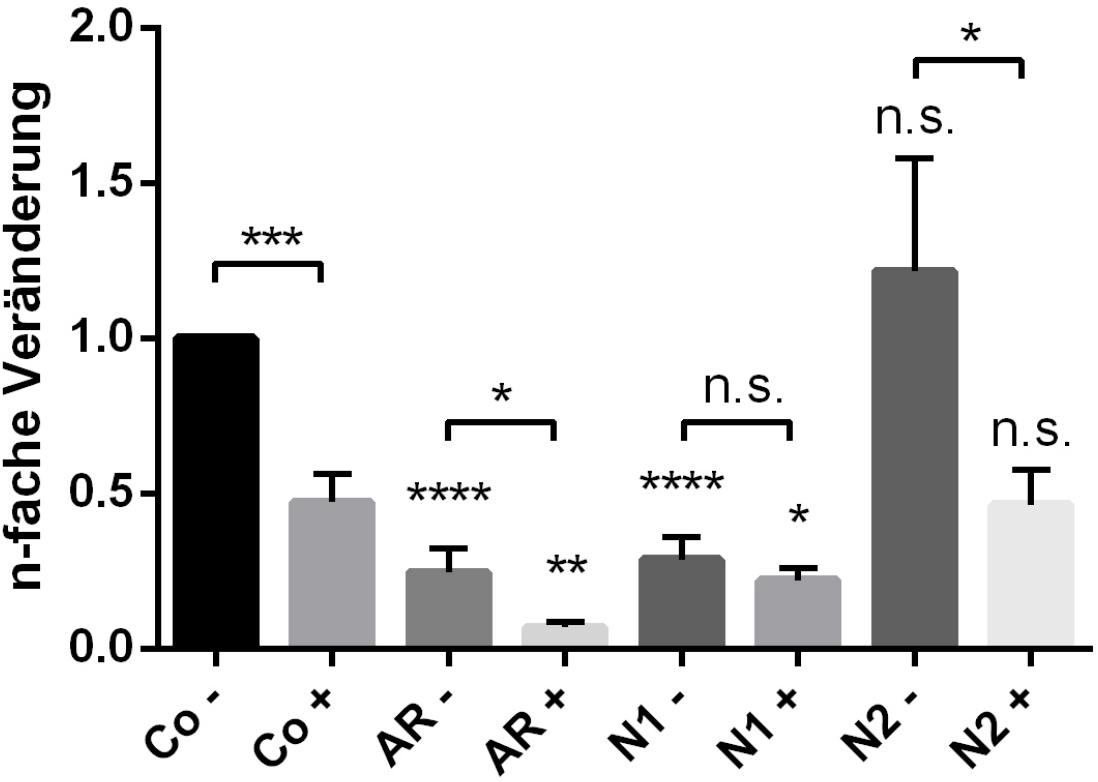

Abb. 30: ***Transfektion von LNCaP-Zellen mit AR- und NKX3.1-siRNA1 führt zu einer Verminderung des NKX3.1-Gehalts auf mRNA-Ebene.*** *Real-Time-PCR-Analyse aus RNA-Extrakten von LNCaP-Zellen. Transfektion jeweils mit 100 nM siRNA und Inkubation über 48 Stunden. Anschließend Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml EGF über 15 Stunden. Als Referenzgen wurde β-Aktin verwendet, zur cDNA-Synthese 500 ng RNA. AR = AR-siRNA, N1 = NKX3.1-siRNA1, N2 = NKX3.1-siRNA2, -/+ = ohne/mit 100 ng/ml EGF, Co = Kontrolle.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001.*

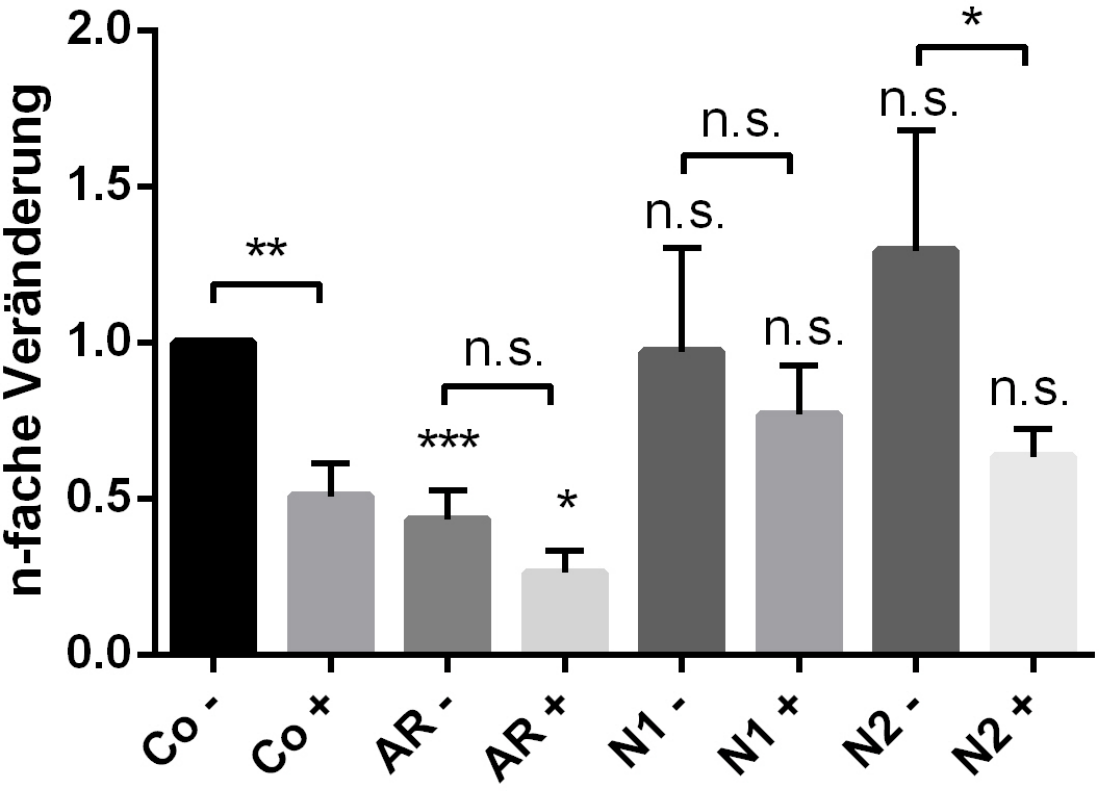

Abb. 31: ***Transfektion von LNCaP-Zellen mit NKX3.1-siRNA führt alleine zu keiner signifikanten Verringerung des AR-Gehalts auf mRNA-Ebene.*** *Real-Time-PCR-Analyse aus RNA-Extrakten von LNCaP-Zellen. Transfektion jeweils mit 100 nM siRNA und Inkubation über 48 Stunden. Anschließend Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml EGF über 15 Stunden. Als Referenzgen wurde β-Aktin verwendet, zur cDNA-Synthese 500 ng RNA. AR = AR-siRNA, N1 = NKX3.1-siRNA1, N2 = NKX3.1-siRNA2, -/+ = ohne/mit 100 ng/ml EGF, Co = Kontrolle. n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001.*

3.8 Einfluss von IL-1α, TNF-α und EGF auf das Wachstum von LNCaP-Zellen

Als Wachstumsfaktor hat EGF über seinen Rezeptor (EGFR) auch einen proliferativen Einfluss auf seine Zielzellen (z.B. auf Endothel- und Stromazellen aber auch auf verschiedene Krebsarten, wie Arten von Brustkrebs, Lungenkrebs und Kolorektalkarzinomen). Um zu vergleichen, welchen Einfluss inflammatorische Zytokine und EGF auf LNCaP-Zellen haben, wurden LNCaP-Zellen in einer Konzentration von 8×10^4 Zellen/ml ausgesät und nachfolgend mit den diversen Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Nach 48 Stunden Inkubation unter Standardbedingungen wurde die Proliferation in den verschiedenen Ansätzen mittels Zellzählung unter Zuhilfenahme einer Neubauer-improved-Zählkammer bestimmt.

Nach 48 Stunden Inkubation zeigte sich in dem Kontroll-Ansatz ohne Wachstumsfaktor-Zusatz eine Zell-Vermehrung um etwa das 1.5-fache. Unter Stimulation mit sowohl TNF-α als auch IL-1α zeigte sich im Mittel keine signifikante Veränderung der Proliferation. Die ermittelten Werte unter TNF-α-Stimulation schwankten teilweise sehr, was zu einer relativ großen Standardabweichung führte. Nach Stimulation mit EGF zeigten sich jedoch in allen Proben eine signifikant gesteigerte Proliferation auf das über 2.5-fache (Abb.32).

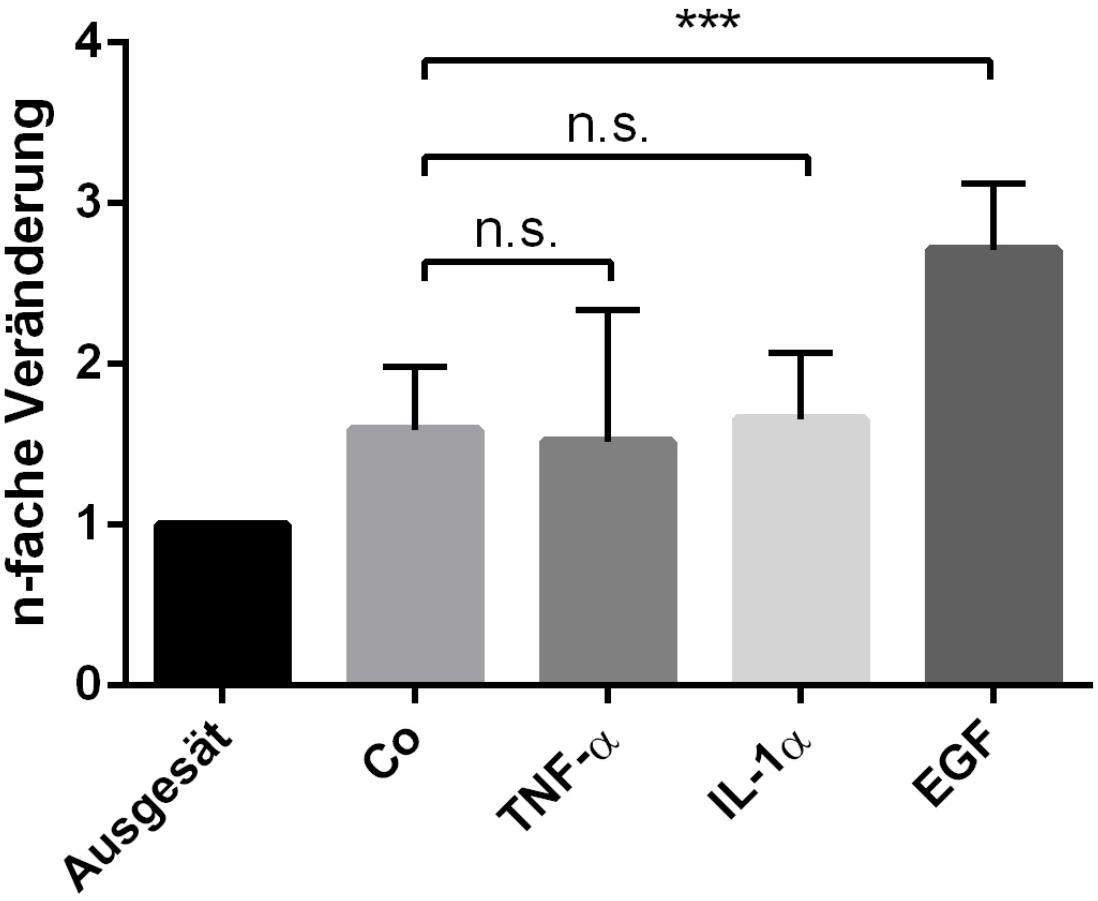

Abb. 32: ***Stimulation von LNCaP-Zellen mit EGF führt zu einer signifikant erhöhten Proliferation.*** *LNCaP-Zellen wurden in einer Dichte von 8×10^4 Zellen/ml ausgesät und über 48 Stunden stimuliert. Verwendete Konzentrationen: 50 ng/ml TNF-α, 20 ng/ml IL-1α, 100 ng/ml EGF.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. Co = Kontrolle, IL = Interleukin, TNF = Tumornekrosefaktor, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor.*

3.9 Einfluss von PMA + Ionomycin oder EGF auf die Aktivität des NKX3.1-Promotors und den 3´UTR Bereiche des NKX3.1-Gens

Durch siRNA-Transfektion und Verwendung pharmakologischer Inhibitoren wurde bereits die Beteiligung einer Reihe von intrazellulären Signalkaskaden an der Regulation des NKX3.1-Verlustes untersucht. Es stellte sich nun die Frage, ob die Veränderung der NKX3.1-mRNA -Mengen auf eine Modulation der Aktivität der Kontrollregionen im NKX3.1-Gen zurückzuführen ist.

Um dies zu untersuchen, wurden Reportergen-Analysen verwendet. Hierzu wurden Luciferase-Reorterkonstrukte verwendet, die entweder ohne zusätzliche Kontrollregion vorlagen (pGL3), oder die entweder durch unterschiedliche Abschnitte des humanen NKX3.1-Promotors -2062 Basenpaare vor Transkriptionsstart (-2062pb NKX3.1) oder -200pb Basenpaare vor Transkriptionsstart (-200pb NKX3.1) bzw. durch einen Bereich aus der 3´-UTR kontrolliert wurden. Diese Firefly-Luciferase-Kontrukte wurden generell mit einem Renilla-Luciferase-Reporterkontrukt unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin-Promotors in LNCaP-Zellen transfiziert. Der Ubi-Renilla-Vektor dient im Dual-Lucifearse-Assay zur Normalisierung, um unterschiedliche Transfektionseffizienzen abzubilden.

Nach Stimulation der Zellen mit PMA + Ionomycin über 15 h zeigten im Falle des 3´UTR eine signifikante Verringerung der gemessenen Luciferase-Aktivität. Die Werte in der Promotorregion sind in diesem Experiment nicht interpretierbar, da in den gemessenen Werten große Schwankungen zu sehen waren. (Abb.33)
Mit einem analogen Versuch wurde auch der Einfluss von EGF auf die Aktivität der NKX3.1-Promotorregionen und der 3´UTR-Kontrollregion untersucht. Auch hier wurden LNCaP-Zellen nach Transfektion stimuliert und die Aktivität der Reporter-Konstrukte mittels Messung der Relativen Lichteinheiten (RLU´s) relativ zur unstimulierten Kontrolle gemessen.

Nach Stimulation mit EGF zeigten sich in der -2062bp Promotor-Region und der 3´UTR von NKX3.1 eine leichte Steigerung des Signals. In der -200bp Promotor-Region ist aufgrund großer Schwankungen keine Interpretation möglich. Im Ganzen betrachtet zeigten sich auch nach mehrmaliger Durchführung des Versuchsaufbaus keine nennenswerten Aktivitätsänderungen in den untersuchten Bereichen (Abb.34).

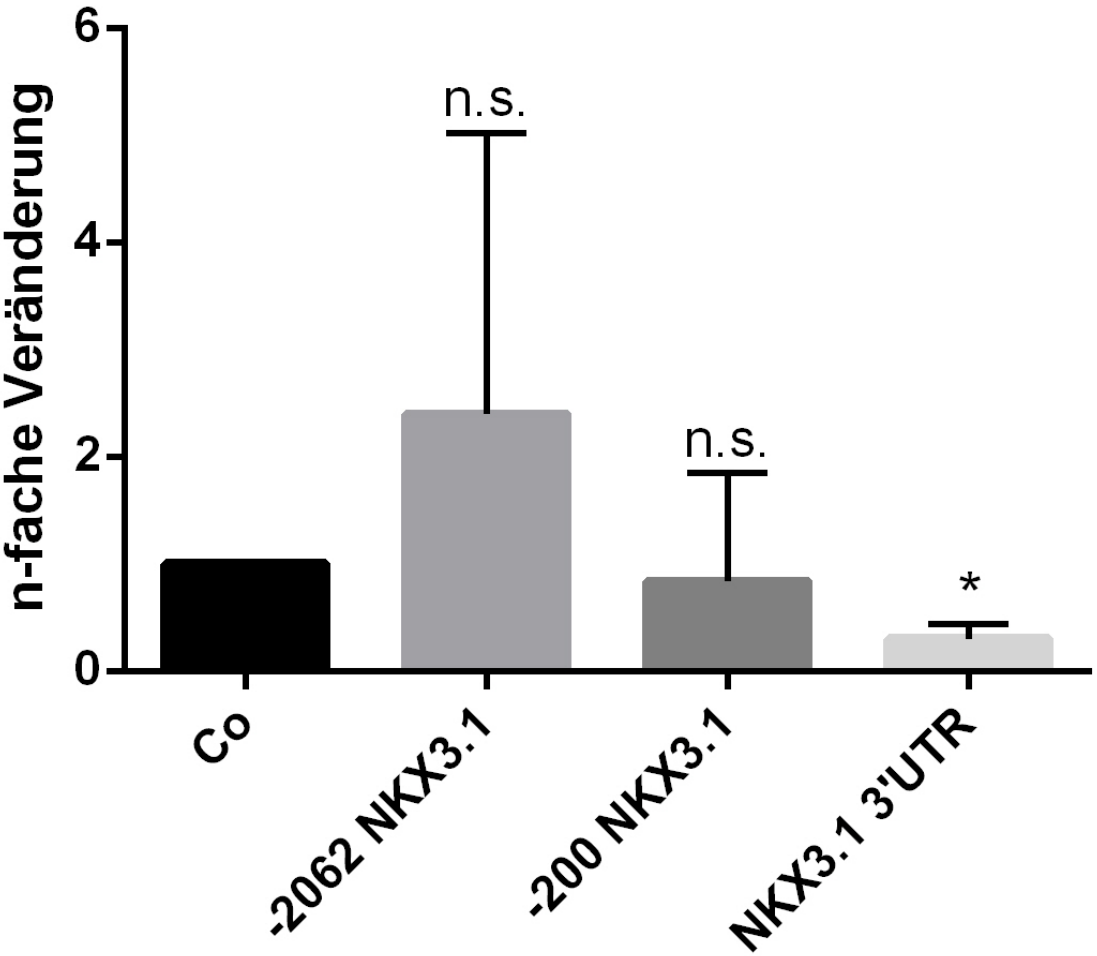

Abb. 33: ***PMA + Ionomycin-Stimulation induziert eine Reduktion in der Aktivität des 3´-UTR-Reporterkonstruktes in LNCaP-Zellen.*** *Reporter-Assay-Analysen mit LNCaP-Zellen. Transfektion von je 200 ng Reporter-DNA und 100 ng Renilla pro Napf einer 24-Napf-Platte (ca. 5×10^4 Zellen/Napf LNCaP). Stimulation mit 500 ng/ml Ionomycin und 20 ng/ml PMA über 15 h. Auf der x-Achse ist die relative Veränderung zur unstimulierten Kontrolle (Co) eingetragen.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. Co = Kontrolle, UTR = Untranslatierte Region, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Iono = Ionomycin.*

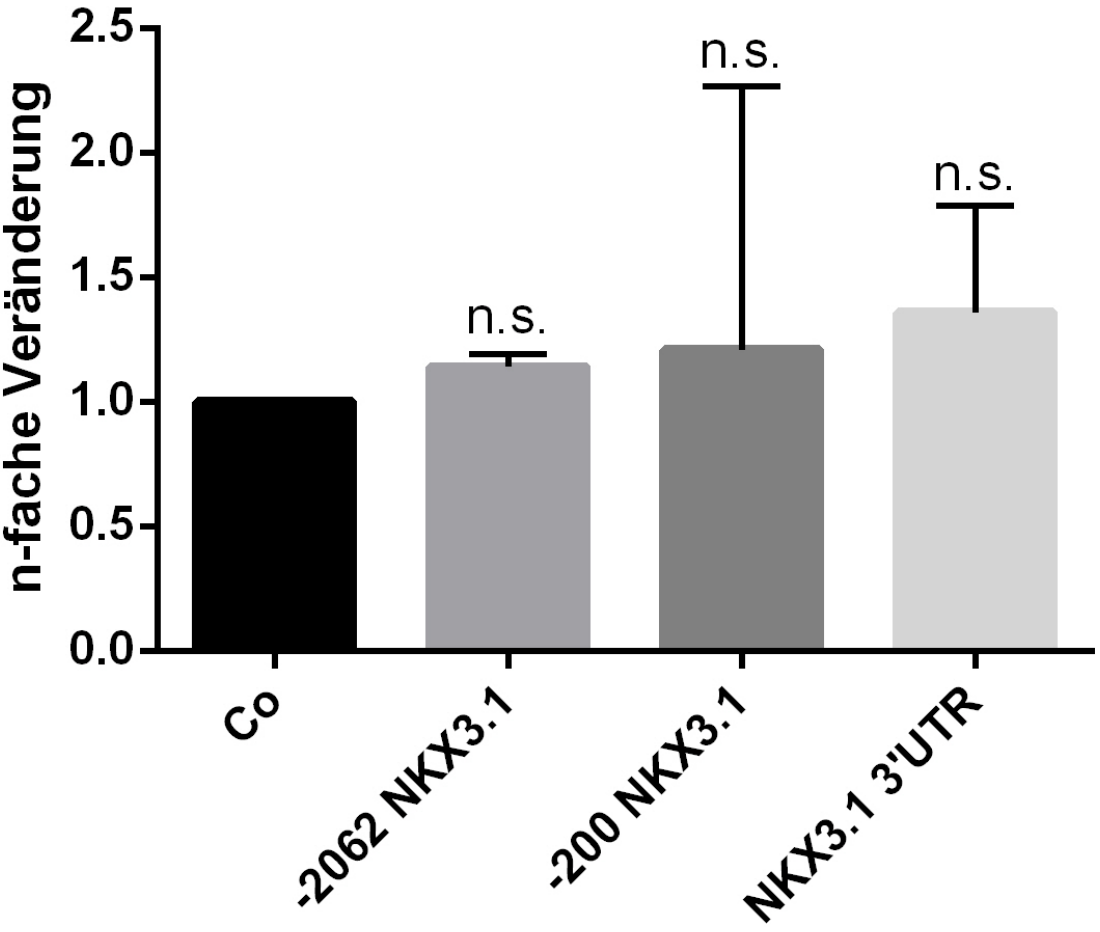

Abb. 34: ***Nach Stimulation mit EGF zeigte sich in LNCaP-Zellen ein leicht erhöhtes Signal im -2062bp-Bereich des NKX3.1 Promotors.*** *Reporter-Assay-Analysen aus LNCaP-Zellen. Transfektion von je 200 ng Reporter-DNA und 100 ng Renilla pro Napf einer 24-Napf-Platte (ca. 4×10^4 Zellen LNCaP). Stimulation mit 100 ng/ml EGTF über 15 h. Auf der x-Achse ist die relative Veränderung zur unstimulierten Kontrolle (Co) eingetragen.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. Co = Kontrolle, UTR = Untranslatierte Region, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor.*

3.10 Der Verlust von NKX3.1 nach EGF Stimulation resultiert nicht aus einer Herunterregulation des Androgenrezeptors

Wie bereits dargestellt handelt es sich bei NKX3.1 um ein Ziel-Gen des Androgenrezeptors, (siehe 3.6 Abb.24 und 3.7 Abb.27). Es ist zu sehen, dass sowohl die basalen NKX3.1-Protein- als auch mRNA-Spiegel sowohl nach Inhibition des Androgenrezeptors durch siRNA als auch durch Androgendepletion in LNCaP-Zellen sinken. Hieraus stellte sich die Frage, ob durch EGF möglicherweise primär die Androgenrezeptor-Aktivität negativ beeinflusst wird und die NKX3.1-Reduktion nur sekundär erfolgt.
Hierzu wurde mittels Reportergen-Analysen der Einfluss von EGF auf die Aktivität des Androgenrezeptores untersucht. Ausgewählt wurden Reporterkonstrukte, die durch die Promotoren des PSA- (Prostataspezifisches Antigen), des MMTV- und des Probasin-Gens kontrolliert werden. Die unterschiedlichen Luciferase-Reporterkonstrukte wurden hierzu in Kombination mit dem Ubi-Renilla-Reporterkonstrukt in LNCaP-Zellen transfiziert, und die Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit EGF analysiert. Die Stimulation wurde über 6 Stunden durchgeführt, da nach EGF-Zugabe hier erstmals ein Verlust von NKX3.1 sowohl auf Protein, als auch auf mRNA-Ebene zu beobachten war (siehe exemplarisch Abb.6 für Western-Blot bzw. Abb.22 für mRNA-Analyse).

Es zeigte sich nach Stimulation bei den PSA und MMTV-Reportern keine signifikante Erniedrigung der AR-abhängigen Reporterkonstrukte. Am ehesten war noch eine Verminderung der Aktivität des Probasin-Reporterkonstruktes zu beobachten, dieses Ergebnis ließ sich jedoch auch nach mehrmaligem Versuchsaufbau nicht als ausreichend signifikanter Faktor darstellen (Abb.35). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Auswirkungen von EGF auf die Aktivität des Androgenrezeptors nicht in einem ausreichenden Ausmaß zu beobachten waren sodass hier ein primäre Beeinflussung eher unwahrscheinlich ist.

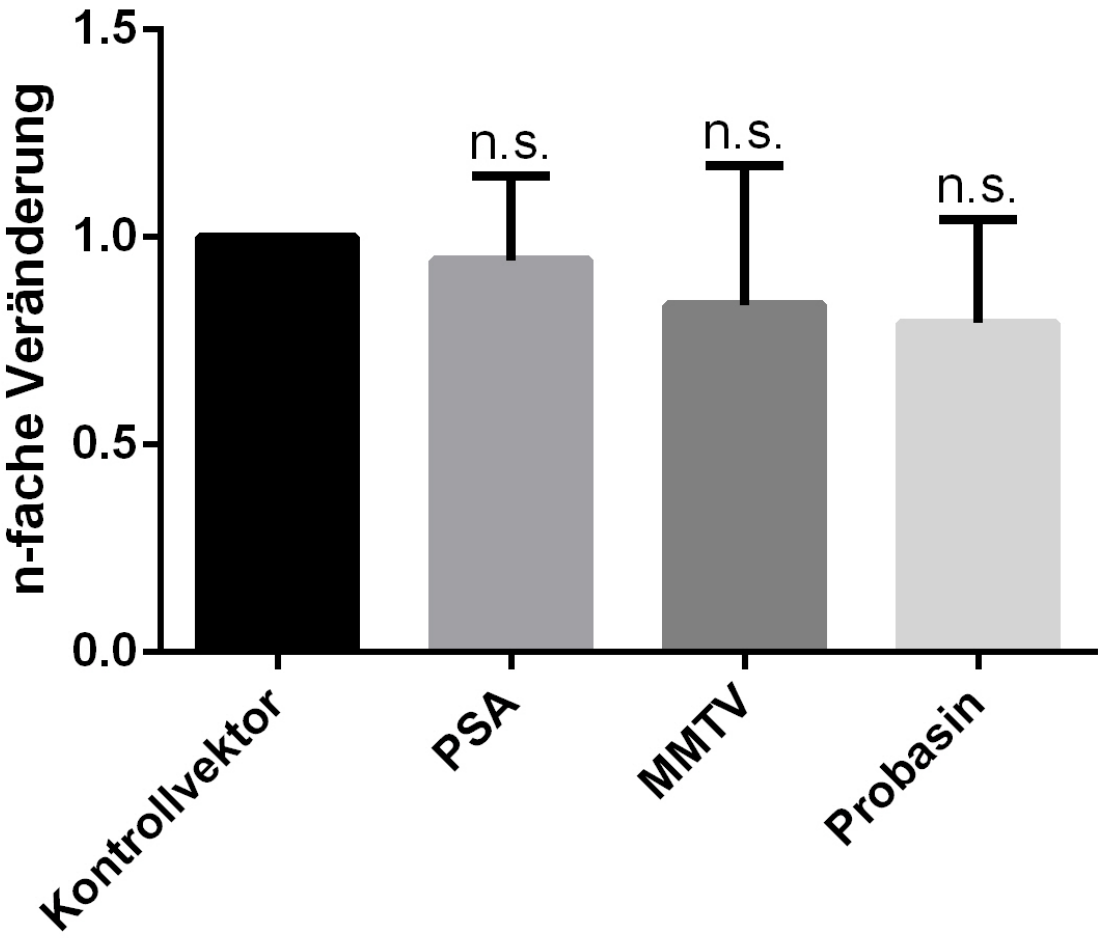

Abb. 35: ***Stimulation mit EGF zeigt in LNCaP-Zellen nach sechs Stunden keine signifikanten Auswirkungen auf die Aktivität unterschiedlicher AR-abhängiger Luciferase-Reporterkontrukte.*** *Dual-Luciferase-Assays aus LNCaP-Zellen. Transfektion mit je 200 ng Firefly-Luciferase-DNA und 100 ng Ubi-Renilla je 4×10^4 Zellen. Inkubation nach Transfektion über 24 h, anschließend Stimulation mit 100 ng/ml EGF über 6 h. Balken relativ zur Veränderung des Kontrollvektors gesetzt.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001. PSA = Prostataspezifisches Antigen, MMTV = Maus-Mamma-Tumorvirus, EGF = Epidermaler Wachstumsfaktor.*

3.11 NKX3.1 Gehalt in gesunden, entzündlich infiltrierten und präneoplastisch veränderten Bereichen humaner Prostatae

Um den mit PIN-Läsionen und entzündlichen Infiltraten vergesellschafteten Verlust von NKX3.1 in luminalen Prostataepithelzellen darzustellen, wurden immunhistochemische Färbungen von humanem Prostata-Gewebe angefertigt und ausgewertet. Dass in PIN-Läsionen ein Verlust von NKX3.1 zu beobachten ist, wurde bereits beschrieben, soll aber auch in dieser Arbeit exemplarisch gezeigt werden. Für die Färbungen wurden Antikörper gegen folgende Proteine verwendet:

- CD3 als Marker für T-Lymphozyten
- CD20 als Marker für B-Lymphozyten
- CD68 als Marker für Monozyten/Makrophagen
- AMACR als Biomarker für prä-/neoplastische Areale
- NKX3.1

Ausgewählt wurden Sektionspräparate von Prostatae, die mit Verdacht auf Prostata-Karzinom entnommen wurden. Vor Beurteilung wurden alle Schnitte von erfahrenen Pathologen beurteilt und komplett tumorös-veränderte Proben verworfen. In Proben, in denen wenig Tumorgewebe enthalten war, wurden nur Teile beurteilt, die noch nicht metaplastisch verändert waren.

In den gefärbten Schnitten wurden, abgesehen von neoplastischen Arealen, verschiedene Areale hinsichtlich der NKX3.1-Expression in den luminalen Epithelzellen untersucht. Diese waren:

- Normales Prostatagewebe (CD20, CD68 und AMACR negativ)
- CD3 positive Areale (T-Zell-Marker)
- CD20 positive Areale (B-Zell-Marker)
- CD68 positive Areale (Makrophagen-Marker)
- PIN Läsionen ohne und mit CD20/CD68 positiven Zellen

Exemplarisch werden folgend nun Abbildungen der erwähnten Gebiete zur besseren Veranschaulichung dargestellt.

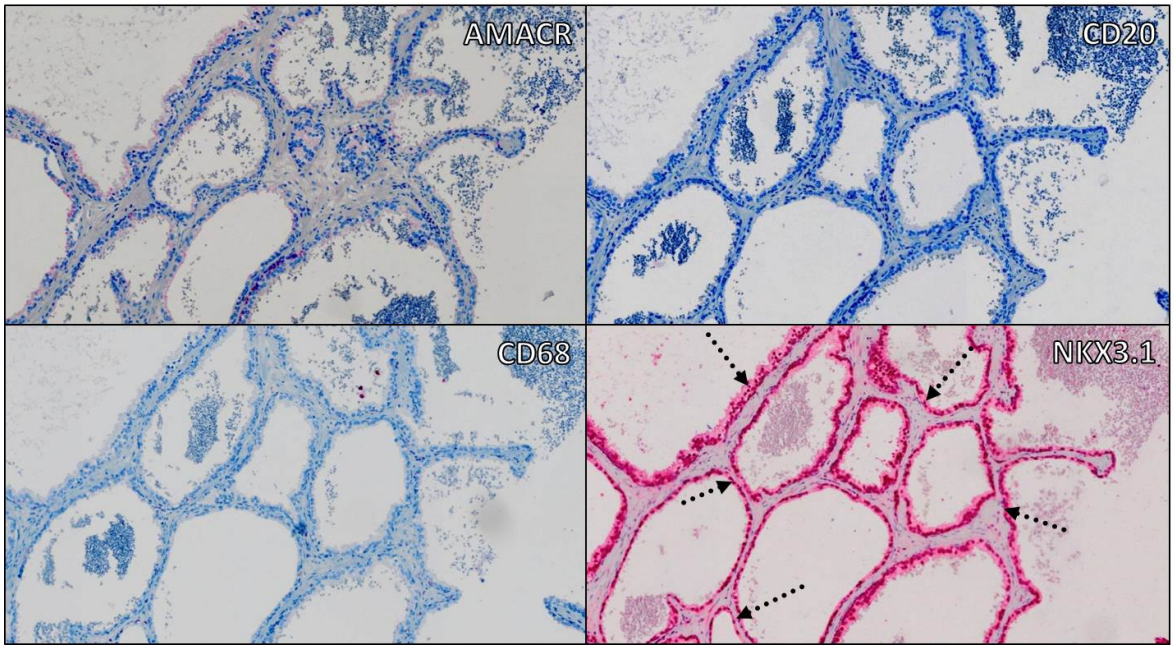

Abb. 36: ***Normales Prostatagewebe (CD20, CD68 und AMACR negativ)***

In AMACR, CD68, CD3 und CD20 negativen Bereichen der gefärbten Schnitte ist eine große Anzahl an NKX3.1-positiven luminalen Epithelzellen der Prostatadrüsen zu beobachten (Abb.36). Hier kann man im ganzen Bildausschnitt der NKX3.1-Färbung eine homogene Verteilung von NKX3.1-positiven Zellen (Abb.36, gepunktete Pfeile) beobachten. Die Färbungen gegen CD20 und AMACR sind negativ, in der CD68-Färbung erkennt man vereinzelt Makrophagen, welche in dieser Anzahl physiologisch sind.

Hier dargestellt ist eine PIN-Läsion, welche sich hier durch lokal begrenzte, AMACR positive intraepitheliale Bereiche auszeichnet (Abb.37, Stern). In der Aufnahme wurde auf der linken Bildhälfte ein noch unveränderter Bereich mit dargestellt. Im Vergleich der jeweils linken und rechten Seiten der vier Aufnahmen kann man die Veränderungen durch die PIN Läsion erkennen. So finden sich im AMACR gefärbten Feld rechts deutliche AMACR positive Bereiche (Abb.37, Stern). Vergleicht man diese nun mit der Färbung gegen NKX3.1, so erkennt man eine bereits in der Übersicht erkennbare schwächere Färbung in der rechten NKX3.1-Hälfte (Abb.37, gestrichelte Pfeile) gegenüber der linken Bildhälfte (Abb.37, gepunktete Pfeile). Diese bereits beschriebenen Veränderungen stellen als PIN-Läsionen einen Risikofaktor für die Entstehung eines Prostatakarzinoms dar. CD20 und CD68 sind hier negativ.

Eine weitere bisweilen in den gefärbten Schnitten zu beobachtende Entität stellt die Vergesellschaftung von CD68, CD20 und AMACR positiven Bereichen dar (Abb.38).

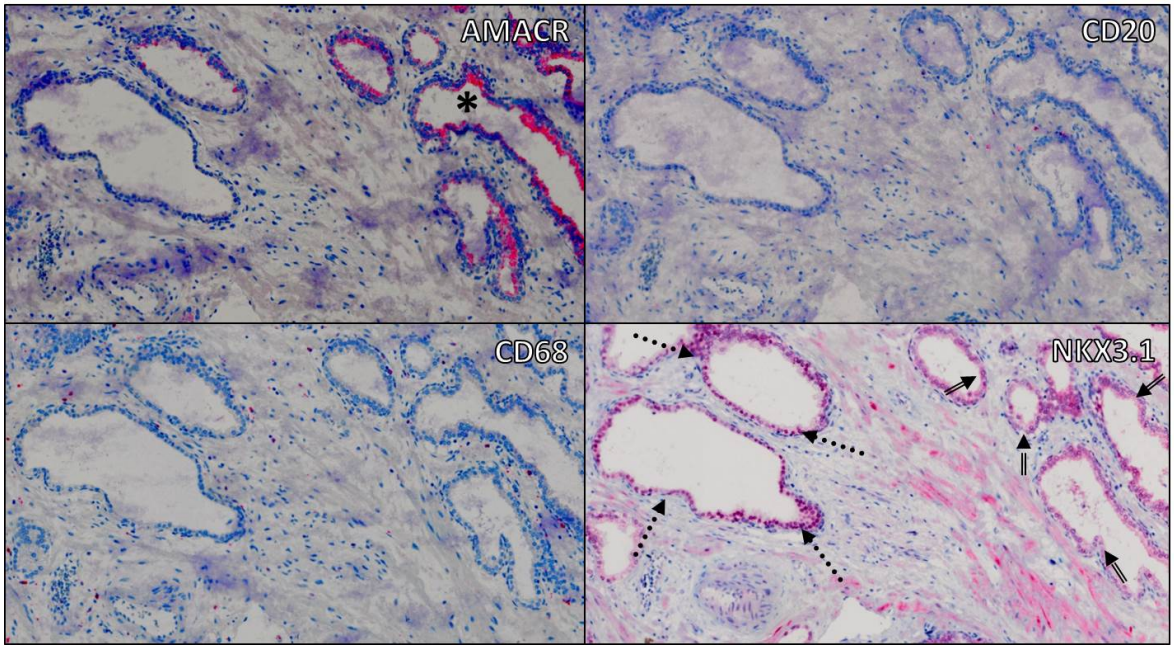

Abb. 37: ***PIN-Läsion (AMACR positive, lokal begrenzte, intraepitheliale Veränderung)***. *Stern: AMACR positive intraepitheliale Läsion. Gepunktete Pfeile: NKX3.1 positive Epithelzellen. Gestrichelte Pfeile: NKX3.1 negative Epithelzellen.*

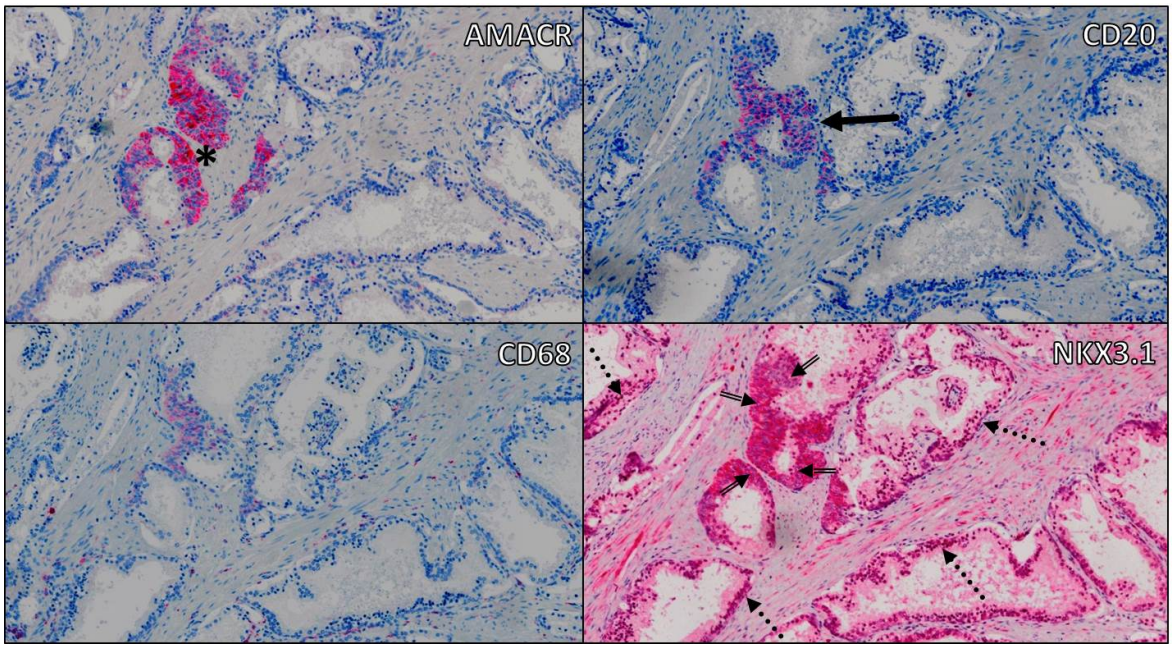

Abb. 38: ***PIN-Läsion mit CD20 und CD68 positiver Beteiligung.*** *Stern: AMACR positive intraepitheliale Läsion. Durchgezogener Pfeil: CD20 positive Zellen. Gepunktete Pfeile: NKX3.1 positive Epithelzellen. Gestrichelte Pfeile: NKX3.1 negative Epithelzellen.*

In diesem exemplarisch dargestellten Bild ist eine PIN Läsion zu sehen, welche sich am besten durch den lokalen AMACR positiven Bereich erkennen lässt (Abb.38, Stern). In diesem Bereich ist hierbei sowohl in der CD20-Färbung (Abb.38, durchgezogener Pfeil) als auch in der CD68-Färbung ein -wenn auch schwaches- Signal zu beobachten. Der Bereich der PIN scheint in diesem Fall in der NKX3.1 Färbung positiver (Abb. 38, gestrichelte Pfeile) als die umgebenden Epithelien (Abb. 38, gepunktete Pfeile), was widersprüchlich zu den bisherigen Annahmen ist. Dies wäre hier jedoch eher mit einer Verlagerung von NKX3.1 in das Zytoplasma vereinbar.

Bei stärkerer Vergrößerung ist zu sehen, dass die Zellkerne in dem Bereich der AMACR positiven PIN im Vergleich zum umgebenden Gewebe (Abb.39, gepunktete Pfeile) vermehrt negativ sind (Abb.39, durchgezogene Pfeile). Hier lässt sich auch deutlicher das im Extrazellularraum lokalisierte NKX3.1 erkennen (Abb.39, Sterne).

Bereiche der untersuchten Prostatae, die Ansammlungen von Entzündungszellen auf-

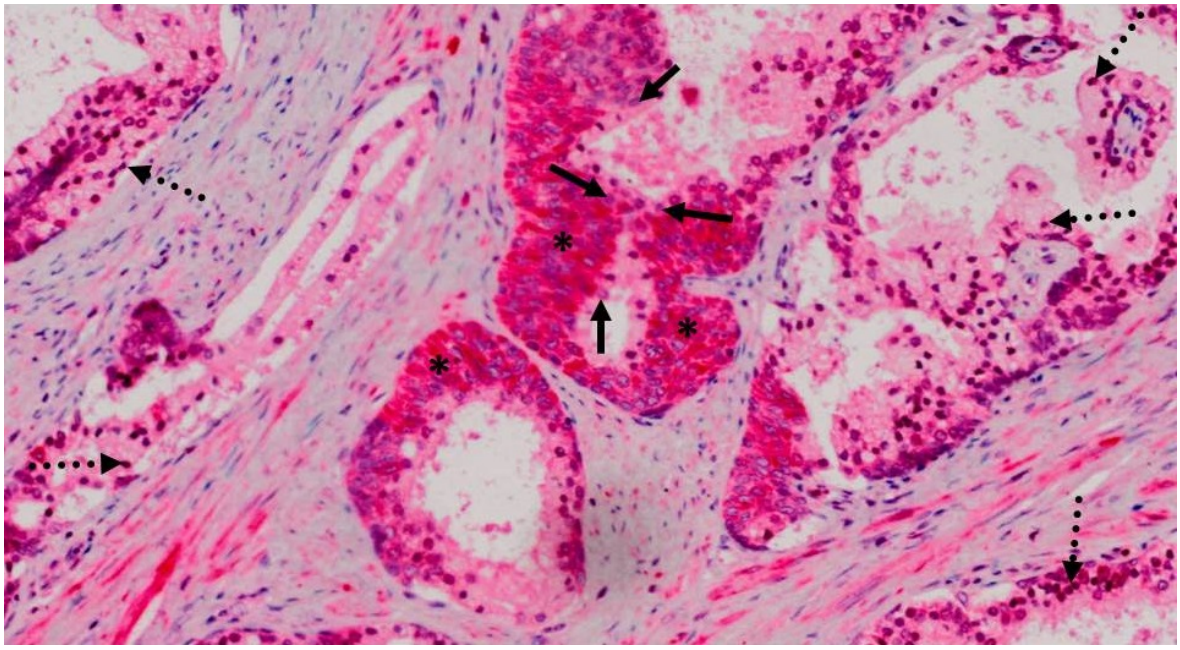

Abb. 39: ***Verlagerung von NKX3.1 vom Zellkern in das Zytoplasma in einer PIN-Läsion.*** *Vergrößerte Aufnahme der NKX3.1 Färbung der PIN-Läsion von Abb.38. Sterne: Extrazellulär lokalisiertes NKX3.1. Durchgezogene Pfeile: NKX3.1 negative Epithelzellen. Gepunktete Pfeile: NKX3.1 positive Epithelzellen.*

wiesen, wurden ebenfalls getrennt beobachtet. Nachfolgend wird exemplarisch ein Fokus einer Ansammlung von CD20 positiven Zellen (B-Lymphozyten) und ein Fokus CD68 positiver Zellen (Makrophagen/Monozyten) dargestellt.

In Abbildung 40 ist zentral eine Ansammlung von Zellen zu sehen, die unter anderem

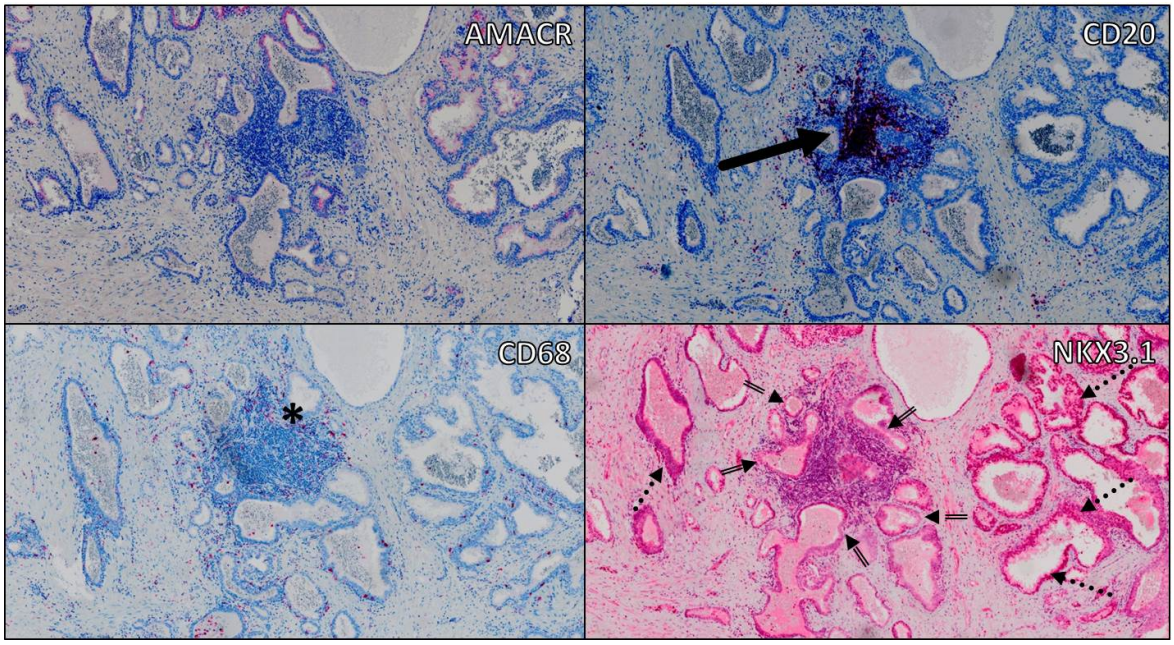

Abb. 40: ***Fokus mit CD20 positiven Zellen und angrenzenden Drüsenabschnitten.*** *Durchgezogener Pfeil: CD20 positiver Fokus. Gestrichelte Pfeile: NKX3.1 negative Epithelzellen. Gepunktete Pfeile: NKX3.1 positive Epithelzellen.*

ein starkes CD20 Signal (Abb.40, durchgezogener Pfeil) und eine im Vergleich zum umliegenden Gewebe leicht vermehrte Anzahl an CD68 positiven aufweist (Abb.40, Stern). In der NKX3.1 Färbung lässt sich erkennen, dass Drüsenabschnitte, welche dem CD20 positiven Fokus angrenzen, ein deutlich schwächeres NKX3.1 Signal aufzeigen (Abb.40, gestrichelte Pfeile), während weiter distal des Herdes das NKX3.1 Signal deutlich stärker ist (Abb.40, gepunktete Pfeile).

Eine weitere untersuchte Veränderung in den histologischen Schnitten stellt die Ansammlung von CD68 positiven Zellen dar. Diese ist hierbei vor allem auch hinsichtlich der bereits beschriebenen Wirkung von EGF auf den Tumorsuppressor NKX3.1 vor großer Bedeutung. Nachfolgend ist in Abb. 41 exemplarisch ein CD68 positiver Fokus dargestellt.

In Abbildung 41 lässt sich zentral ein Drüsenabschnitt erkennen, welcher viele CD68 positive Zellen, wie z.B. Monozyten und Makrophagen, enthält (Abb.41, Stern). Der Bereich ist für AMACR negativ und leicht positiv für CD20 (Abb.41. durchgezogener Pfeil). Hier lässt sich auch erkennen, dass die Intensität der NKX3.1 Färbung hier deut-

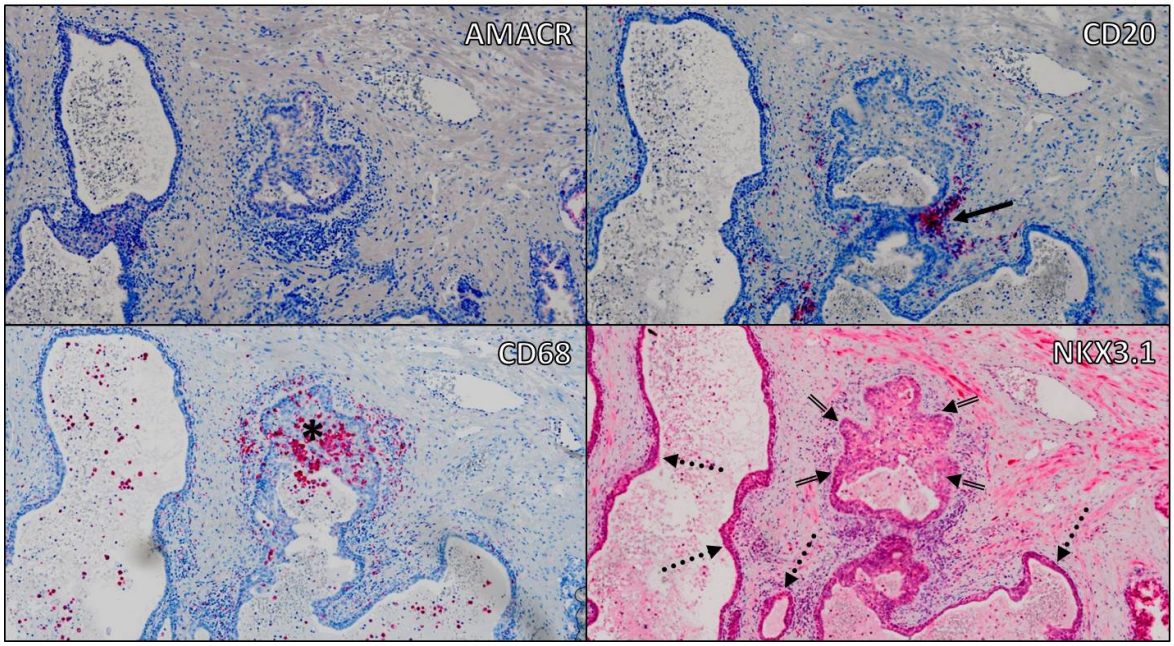

Abb. 41: ***Fokus mit CD68 positiven Zellen und angrenzenden Drüsenabschnitten.*** *Stern: CD68 positiver Fokus. Durchgezogener Pfeil: CD20 positive Zellen. Gestrichelte Pfeile: NKX3.1 negativer Bereich. Gepunktete Pfeile: NKX3.1 positive Epithelzellen.*

lich weniger ausgeprägt ist (Abb.41, gestrichelte Pfeile), als in umliegenden Bereichen (Abb.41, gepunktete Pfeile), in welchen keine CD68-positiven Infiltrate erkennbar sind.

Zuletzt ist in Abbildung 42 eine CD3 positive Infiltration gezeigt. Hier kann man in der Gegenüberstellung auf der unaffektierten linken Seite, der NKX3.1 gefärbten oberen Hälfte eine homogene Expression von NKX3.1 in den luminalen Epithelzellen erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt sich in den angrenzenden Drüsenabschnitten des CD3 positiven Fokus (Abb. 42, rechts) ein deutlich schwächeres bis negatives NKX3.1 Signal.

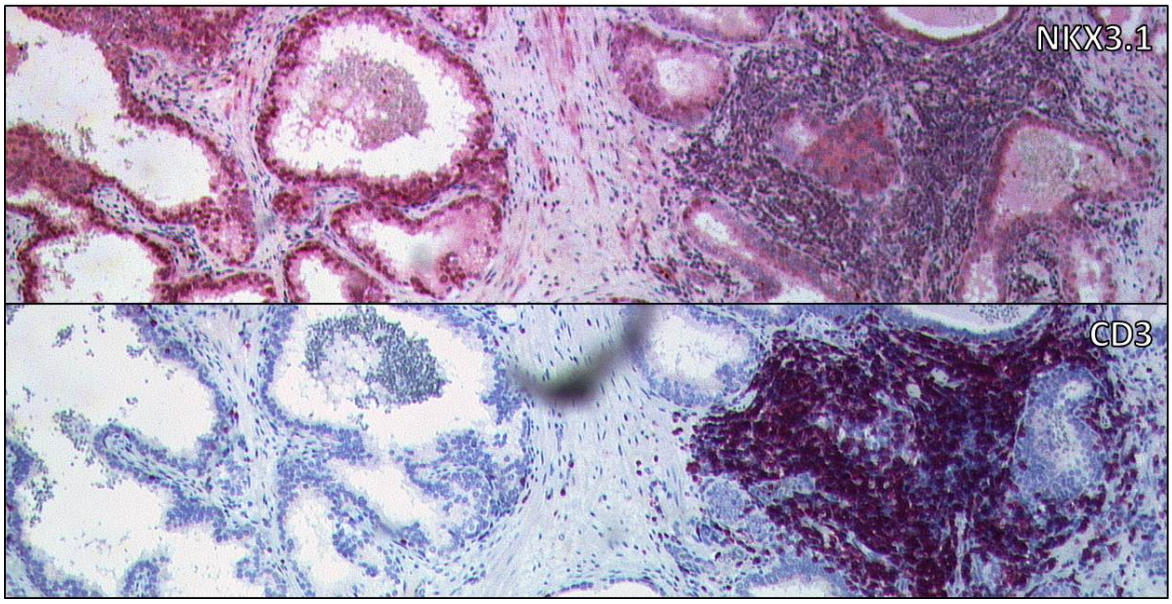

Abb. 42: ***Fokus mit CD3 positiven Zellen und angrenzenden Drüsenabschnitten.***

3.12 Verteilung von NKX3.1 positiven Zellen in verschiedenen pathologisch veränderten Bereichen der Prostata

Wie zuvor in 3.11 gezeigt wurde, waren in Bereichen der Prostata mit Ansammlungen von CD3, CD20 und CD68 positiven Zellen sowie PIN-Läsionen eine deutlich sichtbare Intensitätsminderung des NKX3.1 Signals zu beobachten. Um dies genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden je Schnitt die 2-3 größten Herde von CD3, CD20 und CD68 positiven Zellen ausgewählt und in den angrenzenden Drüsenabschnitten alle luminalen Epithelzellen auf ihre NKX3.1 Expression untersucht. Die ausgewählten, zumeist rundlich begrenzten Foci wiesen alle einen Radius von mindestens 150 μm auf. Die Auswahl der untersuchten Normalgewebe wurde wie in 2.2.5.4 beschrieben in zufällig generierten Bereichen der Proben durchgeführt, welche wie auch die CD3, CD20 und CD68 positiven ausgewählten Bereiche negativ für AMACR sein mussten und morphologisch keinen Anhalt für eine metaplastische Veränderung zeigen durften. Die quantitative Analyse ist im Folgenden grafisch dargestellt.

Es zeigten sich in allen ausgezählten Epithelabschnitten, welche direkt an einen CD3, CD20 oder CD68 positiven Herd angrenzten, eine deutlich verminderte Anzahl an NKX3.1 positiven Zellen (Abb.43). Wie auch schon in den exemplarischen Übersichtsaufnahmen in 3.11 zu erkennen waren in den entzündlich veränderten Bereichen ein im

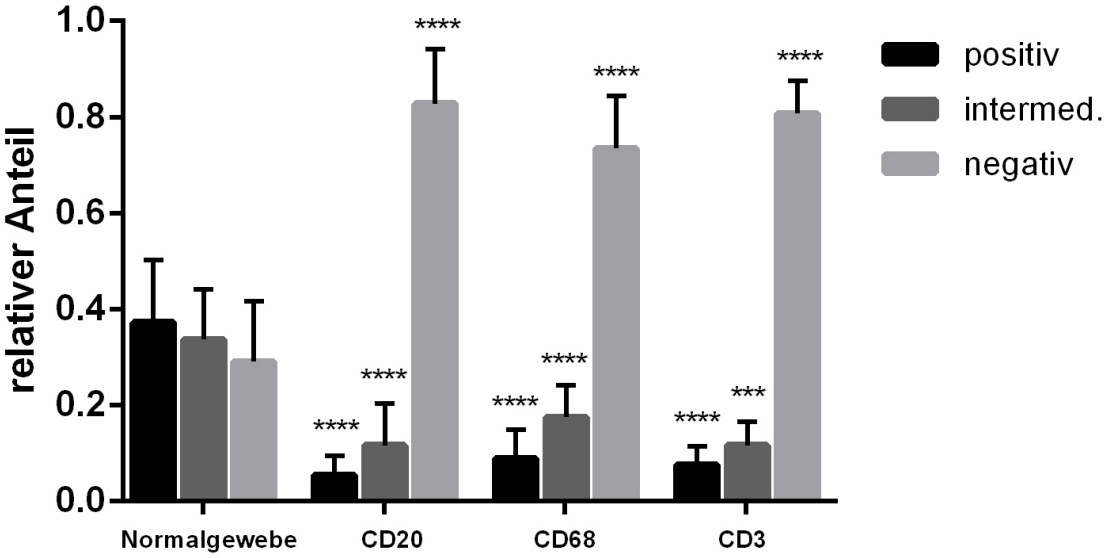

Abb. 43: ***Prozentuale Verteilung von unterschiedlichen NKX3.1 Intensitäten in den verschiedenen untersuchten pathologisch veränderten Bereichen der Prostata.*** *CD20 = Foki mit überwiegend CD20 positiven Zellen (B-Lymphozyten), n = 20. CD68 = Foki mit überwiegend CD68 positiven Zellen (Monozyten und Makrophagen), n = 20. CD3 = Foki mit überwiegend CD3 positiven Zellen. Normalgewebe = Gewebe, welches für AMACR, CD3, CD20 und CD68 negativ war und auch sonst keine Morphologischen Auffälligkeiten aufwies, n = 25.*
*n.s. = nicht signifikant, * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001.*

Vergleich zum Normalgewebe deutlich höherer Anteil an NKX3.1 negativen Zellen zu beobachten. Die Expression von NKX3.1 zeigte sich, wie in Abb.43 zu sehen, in den drei untersuchten pathologisch veränderten Bereichen in etwa gleich. So zeigten sich in den Drüsenabschnitten, die den Zellfoki direkt angrenzten eine signifikante Abnahme der NKX3.1 positiven Zellen um ca. 77% bei CD68 positiven Foki, ca. 80% bei CD3 positiven Foki und bis zu 85% bei CD20 positiven Infiltraten.

4 Diskussion

4.1 Zusammenhang zwischen Prostatakarzinom und Prostatitis

Die Frage, ob eine Entzündung der Prostata als Risikofaktor zur Entstehung eines Prostatakarzinoms zu sehen ist, wird bis heute kontrovers diskutiert. Bei einer globalen Prävalenz von 2,2 bis 9,7% (je nach zugrundeliegenden Kriterien) wäre eine abschließende Klärung dieser Frage von großer Bedeutung (Krieger et al. 2008).

Metaanalysen verschiedener Studien haben gezeigt, dass Männer mit einer erfolgten Prostatitis ein erhöhtes Risiko von 60-80% gegenüber Männern ohne Prostatitis haben, jedoch konnte auf keine gesicherte Kausalität geschlossen werden (Dennis et al. 2002). Aktuell stößt man bei Recherche im Internet unter anderem auf Aussagen wie: "Die chronische Prostatitis betrifft Männer aller Altersstufen [...]. Sie ist ungefährlich, oft schwierig zu behandeln, steht aber in keinem Zusammenhang mit der Entstehung des Prostatakrebses"(Schueller und Laux 2013). Aufgrund der Tatsache, dass bei vielen anderen Krebsarten eine vorausgegangene Entzündung ein wichtiger Risikofaktor für die maligne Entartung darstellt, wurden von mehreren Arbeitsgruppen bereits kausale Verknüpfungen zwischen der Prostatitis und dem Prostatakarzinom gesucht.

Es ist bereits bekannt, dass ein histologischer Wechsel der mit chronischer Prostatitis assoziierten proliferativ-entzündlichen Atrophie (PIA) zu PIN-Läsionen und von PIA zur Entstehung eines Prostatakarzinoms möglich ist (Marzo et al. 1999; Marzo et al. 2007). Des Weiteren wurde bereits beschrieben, dass ein Verlust des Tumorsuppressors NKX3.1 sowohl in PIA als auch in PIN-Läsionen zu beobachten ist (Bethel et al. 2006) und, dass im Maus-Modell ein Ausschalten von NKX3.1 zur Entstehung von PIN-Läsionen führt (Abdulkadir et al. 2002). Es wurde auch ein Mausmodell erstellt, in welchem zu beobachten war, dass bakterielle Entzündungsvorgänge zu einem Verlust von NKX3.1 und einer gesteigerten Zellproliferation führen. Khalili et al. 2010 stellten hieraus die Hypothese auf, dass eine Entzündung der Prostata ein lokales Milieu

schafft, welches zu einer Steigerung des epithelialen Zellwachstums führt und durch die verminderte Expression von NKX3.1 eine potentielle Verbindung zwischen Entzündung und Karzinogenese darstellt.

Für mich ergab sich hieraus die übergeordnete Fragestellung, ob die zuvor beschriebene Hypothese als richtig zu erachten ist. Somit sollte in morphologisch normalen aber entzündlichen Bereichen der menschlichen Prostata bereits ein Verlust von NKX3.1 zu sehen sein, der aus lokalen Milieu-Änderungen erfolgt. Weiterhin ist es daraus resultierend von Interesse, welche Stoffe bzw. Signale diesen Verlust induzieren können und über welche Mechanismen sie dies tun.

4.2 Welche Stoffe führen im Entzündungsmilieu zu einem Verlust von NKX3.1

Der von Khalili und Kollegen beschriebene induzierte Verlust von NKX3.1 durch Prostatitis und das postulierte potentielle dafür verantwortliche lokale Entzündungsmilieu warfen die Frage auf, ob Zytokine oder Wachstumsfaktoren in Entzündungen für den Verlust von NKX3.1 verantwortlich sein könnten (Khalili et al. 2010). Es ist bereits bekannt, dass entzündliche Zytokine, wie TNF-α und IL-1β, durch eine Phosphorylierung, Ubiquitinierung und anschließenden proteasomalen Abbau den Gehalt von NKX3.1 in humanen Prostatakarzinom-Zelllinien auf Proteinebene senken (Markowski et al. 2008).

Diverse Untersuchungen zeigten speziell in entzündlich veränderten Prostatae neben TNF-α und IL-1β auch eine erhöhte Expression anderer Stoffe. Zu diesen gehören unter anderem das Chemokin BCA-1/CXCL13 und der Wachstumsfaktor EGF (Sherwood und Lee 1995; Nadler et al. 2000; Myers et al. 1993; Ammirante et al. 2010).
Wie in Abb.3 und Abb.4 zu sehen ist, wählte ich deshalb das B-Lymphozyten-Chemoattraktant BCA-1 (auch CXCL-13), welches nach Rezeptorbindung eine Aktivierung der Phospholipase C erwirkt und nach Freisetzung von DAG und IP3 die Proteinkinase C aktiviert. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Rolle von EGF bei der Beteiligung an Proliferation und Reperaturprozessen, untersuchte ich hier auch den Einfluss von EGF auf den NKX3.1-Gehalt. Vor allem auch deshalb, weil EGF in anderen Untersuchungen terminal differenzierten Epithelzellen einen Wiedereintritt in den Zellzyklus ermöglichte (Leotoing et al. 2007). Interleukin-1α und TNF-α, welche u.a. von Makrophagen produziert werden, wurden zur Bestätigung von bereits in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen verwendet.

Dieses Panel an Zytokinen und dem Wachstumsfaktor EGF testete ich zunächst hinsichtlich deren Einfluss auf NKX3.1 in den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und LNCaP C4.2.
In der nun zuerst durchgeführten Western-Blot-Analyse des zuvor beschriebenen Experiments zeigte sich eine Verminderung des NKX3.1-Proteingehalts nach Stimulation mit TNF-α (bereits bekannt), IL-1α und EGF (Siehe 3.1; Abb.3 und Abb.4). Diese Senkung zeigte sich nach einer Analyse mittels Real-Time-PCR auch auf mRNA-Ebene, wobei nach Stimulation mit EGF mit über 50% der größte Verlust von NKX3.1 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zu beobachten war (Siehe 3.1; Abb.5). Es bestätigten sich hiermit nun die Ergebnisse von Markowski et al. 2008 und es wurde zudem gezeigt, dass auch IL-1α und der Wachstumsfaktor EGF einen Einfluss auf den Tumorsuppressor NKX3.1 haben. Der verhältnismäßig starke Verlust von NKX3.1 nach EGF-Stimulation im Vergleich zu den anderen Zytokinen führte dazu, dass ich mich nachfolgend hauptsächlich auf die Mechanismen der EGF-Wirkung auf Prostatakarzinomzellen beschränkte.

EGF wird physiologisch und unter imflammatorischen Stimuli vermehrt von Stromazellen der Prostata sezerniert (Leotoing et al. 2007). Weiterhin wird EGF auch von Makrophagen vom Typ M2 sezerniert, welche als alternativ aktivierte Makrophagen den Aufbau von Normalgewebe und die Auflösung von chronisch entzündlichen Prozessen mithilfe von Wachstumsfaktoren und Stoffen zum Matrix-Umbau unterstützen (Edin et al. 2012). Durch entzündliche Veränderungen der Prostata entsteht also ein Mikromilieu, welches sich in seiner Zytokin- und Wachstumsfaktorexpression erheblich von normalem Gewebe unterscheidet. Stoffe wie EGF, die in diesen Bereichen vermehrt exprimiert werden, könnten hinsichtlich ihrer senkenden Auswirkungen auf NKX3.1 und ihrer mitotischen Einflüsse somit eine Grundlage für die Entstehung präneoplastischer Läsionen und draus potentiell resultierender malignen Entartung bieten.

Aufgrund des beobachteten Verlusts von NKX3.1 unter dem mitogenen Einfluss von EGF stellte ich die Überlegung auf, ob mitogene Stimuli generell einen Einfluss auf die Expression von NKX3.1 haben. Deshalb untersuchte ich daraufhin zusätzlich die Auswirkungen von der stark mitogenen Kombination aus PMA und Ionomycin auf die gleichen Zelllinien. PMA führt als Strukturanalogon des DAG zusammen mit Ionomycin, welches das intrazelluläre Calcium erhöht, zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Unter dieser nun angewendeten Ko-Stimulation zeigte sich ein sogar noch größerer Verlust von NKX3.1, sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene. Dies könnte ein

Hinweis darauf sein, dass mitogene Signale im Allgemeinen einen Einfluss auf NKX3.1 haben, was eine wichtige Erkenntnis in der Entstehung (prä-)neoplastischer Läsionen in entzündlichen Bereichen der Prostata sein könnte.

4.3 Welche Signalwege liegen dem induzierten Verlust von NKX3.1 zugrunde

Als nächste Frage stellte sich mir, auf welchen Mechanismen der durch EGF bzw. PMA + Ionomycin induzierte Verlust von NKX3.1 beruht. Hierzu bediente ich mich der Literatur, um einen Überblick darüber zu erhalten, welche möglichen Signalkaskaden z.B. der Interaktion von EGF mit seinem Rezeptor nachgeschaltet sein können. In Abb.2 sind die untersuchten Signalwege zur besseren Übersicht in einer Grafik stark vereinfacht zusammengefasst.

Die Wirkung der Ko-Stimulation mit PMA + Ionomycin wurde in 4.2 bereits beschrieben. Aufgrund dieser Tatsachen untersuchte ich zuerst, ob der EGF vermittelte NKX3.1-Verlust auch über die Proteinkinase C vonstatten geht. Hierzu verwendete ich PKC-Inhibitoren wie Gö 6976 und BIM-1, um den Signalweg über die PKC zu unterbrechen. In der Auswertung der Proteinanalysen mittels Western-Blot zeigte sich wie erwartet in der Probe der PKC-inhibierten Zellen eine Stabilisierung von NKX3.1 nach PMA + Ionomycin Stimulation, sowohl bei Inhibition mit Gö 6976 als auch mit BIM-1 (Siehe Abb.12, Abb.13 und Abb.14). Die negativen Auswirkungen der EGF-Stimulation auf NKX3.1 konnten auf diese Weise jedoch nicht maßgeblich verhindert werden, sodass man lediglich nach Vorbehandlung von LNCaP C4.2 Zellen mit BIM-I eine minimale Stabilisierung von NKX3.1 vermuten könnte (Siehe Abb.13). Hieraus schloss ich, dass die PKC nach EGF-Stimulation nicht - bzw. wenn, dann nur in einem kleinen Teil - am Verlust von NKX3.1 beteiligt ist, oder dass möglicherweise eine andere, hier nicht untersuchte PKC-Isoform, dies vermittelt.

Im Anschluss an dieses Experiment überlegte ich nun, welche anderen Signalwege EGF über Ligandenbindung mit Rezeptoren, wie z.B. dem EGFR, in Gang setzen kann. Hieraus stellte ich eine Gruppe aus möglichen Signalkaskaden und daraus folgenden potentiellen Angriffsstellen dieser zusammen. In weiteren Versuchen inhibierte ich deshalb unter anderem:

- IKK1 und IKK2 mit BAY 11-7082

- PI3-Kinase mit NVP-BEZ235 und Wortmannin
- MEK-1 mit PD9859
- GSK-3 mit SB-216763 und SB-415286

In den Western-Blot Auswertungen der Gesamtzellextrakte nach den jeweiligen Stimulationen zeigte sich nach mehrmaligem Wiederholen der Experimente bei keiner der aufgelisteten Inhibitionen eine nennenswerte Stabilisation von NKX3.1 (3.5.1 bis 3.5.5).

Nach der erfolgten Inhibition mittels chemischer Inhibitoren unternahm ich unter Verwendung von siRNA´s einen weiteren Schritt in Richtung der Identifikation der verwendeten Signalwege (genaue Auflistung siehe 3.7).

Leider zeigten sich auch in diesen Experimenten kaum eine auffällige Beeinflussung des NKX3.1 Verlusts durch die verwendeten siRNA´s. Lediglich die Verwendung von Androgenrezeptor- und IKK1-siRNA zeigten die Besonderheit, dass sie den NKX3.1-Spiegel schon ohne Zugabe von EGF senkten. Hierauf soll jedoch später genauer eingegangen werden.

Sowohl in meinen Versuchen mit chemischen Inhibitoren, als auch in solchen mit siRNA legte ich unter anderem großen Wert auf den Signalweg des Transkriptionsfaktors NFκB. Dies untersuchte ich, da bereits mehrere Publikationen vorliegen, welche eine Aktivierung von NFκB durch den EGF-Rezeptor beschreiben. Diese Aktivierung ist auch in anderen Krebsarten, wie z.B. bei Brustkrebs bekannt (Biswas und Iglehart 2006; Habib et al. 2001).
Spezifisch für das Prostatakarzinom ist eine NFκB vermittelte Aktivierung der Expression des prostataspezifischen Antigens (PSA) beschrieben. Die gleiche Arbeitsgruppe beschrieb in späteren Stadien von androgenresistenten Prostatakarzinomen eine Hochregulierung von NFκB (Chen und Sawyers 2002).
Nicht zuletzt wäre eine Beteiligung des NFκB-Signalwegs am EGF induzierten NKX3.1-Verlust von Bedeutung, da NFκB auch als Bindeglied zwischen Entzündung und Krebsentstehung gesehen wird. Hierzu wurde beschrieben, dass eine NFκB-Aktivierung zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und somit zu der Entstehung eines spezifischen Mikroenvironments führt (M. 2009).
Zusammengefasst würde dies meine These unterstützen, dass entzündliche Veränderungen der Prostata mit den dort vermehrt sezernierten Zytokinen und promitotischen Faktoren zur Entstehung eines lokal veränderten Mikromilieus führen, in wel-

chem NKX3.1 herunterreguliert wird. Dies könnte in der Folge, wie bereits durch den NKX3.1-Knock-Out im Mausversuch gezeigt, zu einem erhöhten Risiko von PIN-Entstehung und maligner Entartung führen.
Leider konnte ich durch die von mir untersuchten Komponenten des NFκB-Signalwegs eine Beteiligung nicht nachweisen. Man hätte die Liste der potentiellen Signalwege und Interaktionsstellen natürlich noch um eine Vielzahl erweitern können. Dies war hier jedoch auch aufgrund zeitlicher Begrenzungen leider nicht möglich.

Aufgrund der von mir untersuchten Signalkaskaden und den beobachteten weithin negativen Ergebnissen, verließ ich diese Art der Untersuchung und widmete mich weiteren Möglichkeiten des vermittelten NKX3.1-Verlusts. Dies schließt eine Beteiligung der untersuchten Signalwege jedoch nicht aus, da über Kollateralkaskaden oder nicht-inhibierte Isoformen der untersuchten Proteine eine Beteiligung durchaus möglich wäre.

Als weitere Möglichkeit des Verlusts stand noch der Weg über Ubiquitinierung und anschließendem proteasomalen Abbau von NKX3.1 zur Debatte. Dies war zudem von Bedeutung, da bereits Markowski et al. 2008 nach Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit inflammatorischen Zytokinen wie TNF-α und IL-1β einen proteasomalen Abbau von NKX3.1 beobachteten. Hierzu wurden mit Bortezomib und MG132 zwei potente Inhibitoren des Proteasoms vor Stimulationsbeginn mit EGF bzw. PMA + Ionomycin zu den zu untersuchenden LNCaP und LNCaP C4.2 Zellen gegeben, um eine proteosomale Degradation weitestgehend zu inhibieren. In der Auswertung des Proteingehalts mittels Western-Blot beobachtete ich eine deutliche Stabilisierung von NKX3.1, sowohl bei EGF Stimulation als auch bei Ko-Stimulation mit PMA + Ionomycin (Siehe 3.5.6; Abb.19 - Abb.21). Dies deutet darauf hin, dass auch der EGF-getriggerte Verlust von NKX3.1 unter anderem auf einen proteasomalen Abbau des NKX3.1 Proteins beruht.

Mich interessierte zudem die Veränderungen von NKX3.1 auf mRNA Ebene, welche ich mittels Real-Time-PCR untersuchte. Hierbei zeigte sich hinsichtlich der Stimulation mit EGF im Gegensatz zur Proteinebene keine Stabilisierung der NKX3.1 mRNA nach Behandlung mit den Proteasom-Inhibitoren. Die Inhibitoren führten sogar zu einer noch größeren Senkung der NKX3.1 mRNA, was jedoch auch bei der alleinigen Behandlung mit den Inhibitoren (stark ausgeprägt bei MG132) bereits zu beobachten war (Siehe 3.5.6; Abb.22). Der durch PMA und Ionomycin induzierte Verlust von NKX3.1-mRNA zeigte ebenfalls eine potentielle, wenn auch geringe Stabilisierung bei

Vorbehandlung mit Bortezomib. Aufgrund des Schwerpunktes auf die Wirkung des physiologischeren EGF wurde hierauf jedoch nicht genauer eingegangen.

Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass der NKX3.1 Verlust durch den Einfluss von EGF auf ähnliche Weise wie durch den Einfluss von TNF-α und IL-1β über Ubiquitinierung und Proteasomabbau vonstattengeht. Da durch eine Inhibition des Proteasom der NKX3.1-Verlust jedoch nicht vollständig zu verhindern war, ist eine Beteiligung anderer, bisher nicht bekannter Signalwege durchaus zusätzlich in Betracht zu ziehen.

Als weitere Möglichkeiten der Interaktion stellte sich mir auch die Frage, ob EGF einen möglichen direkten Einfluss auf regulatorische Elemente des NKX3-1 Gens hat, worauf unter anderem die erniedrigten mRNA-Spiegel in den Real-Time-PCR-Analysen hindeuteten. Hierzu wurden Reporter-Assays unter Verwendung von Luciferase-Reporterkonstrukten unter Kontrolle verschiedener regulatorischer Elemente des NKX3-1 Gens durchgeführt. Untersucht wurden -2062bp, -200bp und die 3´untranslatierte Region, welche regulatorische Elemente des NKX3-1 Gens beinhalten. In der Auswertung der Reporter-Assays zeigten sich am ehesten noch in der 3´UTR- und -2062pb-Region eine leichte Steigerung des Signals (Siehe 3.9; Abb.34). Diese ist jedoch so gering, dass die Veränderungen, welche auf mRNA-Ebene zu beobachten sind, nicht ausschließlich dadurch zu erklären sind. Eine gleichartige Analyse der Auswirkungen einer PMA + Ionomycin Ko-Stimulation zeigte lediglich eine signifikante Verringerung des 3´UTR-Signals von NKX3.1 (Siehe 3.9, Abb.33).

Zusammenfassend ist zu den Reporter-Assays zu sagen, dass hinsichtlich des verstärkten Signals der 3´UTR nach EGF Stimulation die Ergebnisse nach PMA + Ionomycin Stimulation widersprüchlich sind, da dort eine Erniedrigung des 3´UTR Signals zu beobachten war. Letztendlich sind die Änderungen nach den Stimulationen jedoch sehr gering, weshalb keine zuverlässige Aussage hinsichtlich der Wirkung von EGF bzw. PMA + Ionomycin auf regulatorische Elemente des NKX3.1 Gens gemacht werden konnte.

4.4 Wechselwirkungen von Androgenen, dem Androgenrezeptor und NKX3.1

NKX3.1 steht unter strenger androgener Kontrolle, welche über die 3´UTR von NKX3.1 reguliert wird. Es wurden bereits drei Regionen identifiziert, die in der Androgenrezep-

tor exprimierenden PCa-Zelllinie LNCaP durch DHT transaktiviert werden (Thomas et al. 2010). NKX3.1 reguliert rückwirkend auch die Expression des Androgenrezeptors und gemeinsam beeinflussen sie als wichtige Regulatoren der Prostatakarzinomprogression die Expression verschiedener Gene, welche für Proteintransport und die Tumorprogression verantwortlich gemacht werden können (Tan et al. 2012). In anderen Arbeiten der AG Marienfeld konnte bereits gezeigt werden, dass eine Ko-Stimulation von LNCaP-Zellen mit PMA + Ionomycin nicht nur zu dem bereits ausführlich beschriebenen Verlust von NKX3.1, sondern auch zu einem Verlust des Androgenrezeptors führt. Hierbei ist es wichtig zu beachten, dass der Verlust des Androgenrezeptors zeitlich versetzt nach dem Verlust von NKX3.1 eintritt. Dies hat vor allem auch aufgrund der wechselseitigen Beziehung der beiden „Spieler“ eine große Bedeutung. Dies möchte ich im Folgenden näher erläutern.

Durch das Ausschalten des Androgenrezeptors mittels einer Transfektion von Androgenrezeptor-siRNA konnte gezeigt werden, dass daraus auch ohne EGF Stimulation ein starker Verlust von NKX3.1 resultiert (3.7, Abb.27, Spur 7 und 8 und Abb.29, Spur 3 und 4). Dies ist durch die bereits erwähnte gegenseitige Regulation zu erklären, wodurch der positive Einfluss des AR auf NKX3.1 entfällt und folgend auch der NKX3.1-Spiegel sinkt. In LNCaP-Zellen, die in einem Medium ohne FBS (und somit ohne Androgene und andere im Serum enthaltene Stoffe) gehalten wurden, beobachtete ich einen deutlichen Verlust von NKX3.1, sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene (3.6, Abb.24, Spur 2). Diesen Verlust von NKX3.1 konnte ich in diesem Experiment durch eine Zugabe von EGF sogar noch verstärken (3.6, Abb.24, Spur 2 zu Spur 6).

Der hier beobachtete primäre Verlust des Androgenrezeptors führte sekundär zu einem Verlust von NKX3.1. Hieraus stellte sich für mich die Frage, ob nicht auch EGF eine primäre Wirkung auf den Androgenrezeptor hat und nur infolge dessen einen Verlust von NKX3.1 bedingt, oder ob, wie nach der Ko-Stimulation mit PMA + Ionomycin, der Verlust des Androgenrezeptors sekundär dem Verlust von NKX3.1 folgt. Um dies näher zu untersuchen, erstellte ich ein Reporter-Assay unter Verwendung von Luciferase-Reportern für diverse Gene, die durch Androgeneinflüsse maßgeblich reguliert werden (PSA, MMTV und Probasin). Es wurde hierzu ein kürzerer Stimulationszeitraum von nur sechs Stunden gewählt, da die EGF Wirkung auf NKX3.1-Protein, NKX3.1-mRNA sowie die Wirkung auf NKX3.1-nachgeschaltete Gene nach diesem Zeitraum schon deutlich beobachtbar ist.

Es zeigte sich hierbei keine signifikante Veränderung der untersuchten Gene (Siehe 3.10, Abb.35). Dieses Ergebnis wurde auch anhand von durchgeführten Real-Time-PCR Analysen von RNA Extrakten nach Stimulation mit sowohl EGF als auch PMA + Ionomycin über 15 Stunden bestätigt. Hier sah ich analog zu PMA + Ionomycin auch bei EGF einen deutlich geringeren Verlust des Androgenrezeptors im Vergleich zu NKX3.1 (Siehe 3.4, Abb.10). Diese Resultate deuten darauf hin, dass nach Stimulation mit EGF NKX3.1 vor dem Androgenrezeptor verloren geht und es sich nicht um einen sekundären Verlust von NKX3.1 handelt.

In der Literatur ist bisher auch eine gegenseitige Regulation von NKX3.1, dem Androgenrezeptor und dem Protoonkogen C-MYC (Kokontis et al. 1994), sowie eine Koregulation gemeinsamer Gene in muriner und humaner Prostatakarzinogenese beschrieben (Anderson et al. 2012). In einer neueren Studie wurde zudem beobachtet, dass in der Prostatakarzinogenese des Hundes eine reduzierte NKX3.1 Expression mit einer erhöhten C-MYC Proteinexpression einhergeht (Fonseca-Alves et al. 2013). Infolge dieser Ergebnisse wäre zu erwarten, dass eine Stimulation mit EGF resultierend aus dem Verlust von NKX3.1 zu einem Anstieg von C-MYC führen würde. Dies würde die Position von NKX3.1 als Tumorsuppressor verstärken und ein weiteres Indiz hinsichtlich der Verbindung des inflammatorischen NKX3.1-Verlusts mit erhöhtem Entartungsrisiko darstellen. Experimente, die diese Vermutungen belegen, wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, könnten aber zu weiteren Erkenntnissen über den induzierten NKX3.1-Verlust führen.

4.5 Expression von NKX3.1 in neoplastisch und entzündlich veränderten Bereichen humaner Prostatae

Ziel dieser Arbeit war es, den NKX3.1 Verlust auch hinsichtlich entzündlicher Veränderungen in primärem Porstatagewebe zu untersuchen. Um hierzu einen klinischen Bezug zu schaffen, wurden von einer Kohorte von elektiv entfernten Prostatae Schnitte angefertigt und immunhistochemisch mit Antikörpern hinsichtlich der zu untersuchenden Ziele behandelt. Wie bereits zuvor beschrieben, bewirkt eine Stimulation mit IL-1α und TNF-α in Prostatakarzinomzelllinien eine Reduktion von NKX3.1 (Markowski et

al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass auch der Wachstumsfaktor EGF in LNCaP-Zellen einen Verlust von NKX3.1 bewirkt. Zunächst stellte sich nun die Frage, welche Zellen inflammatorische Zytokine selbst produzieren, beziehungsweise mit ihren proinflammatorischen Einflüssen angrenzende Stromazellen zur vermehrten Produktion anregen. Weiterhin ist es folglich von Interesse, welche Auswirkungen dies auch auf das den entzündlichen Läsionen angrenzende normale Gewebe haben könnte.

EGF wird in entzündlichen und traumatischen Läsionen hinsichtlich einer Resolution der Inflammation und der Wundheilung von Makrophagen und andererseits in geringerem Maße auch physiologisch von Stromazellen produziert (Schultz et al. 1991; Bodnar 2013; Myers et al. 1993). Andererseits wurde auch eine Beteiligung von EGF in neoplastischen Veränderungen gezeigt. So kann zum Beispiel eine erhöhte Produktion von EGF mit manchen Formen von Brustkrebs assoziiert sein (O'Sullivan et al. 1993) und es wird vermutet, dass die Produktion des EGF-Familien-Mitglieds HB-EGF (Heparin bindender epithelialer Wachstumsfaktor) das Wachstum verschiedener Tumorarten fördert (Rigo et al. 2010).

Von großem Interesse war nun, ob in den untersuchten Prostatae entzündliche Veränderungen mit Infiltrationen Zellen zu finden sind, welche einerseits selbst inflammatorische Zytokine bzw. EGF sezernieren bzw. andererseits durch parakrine Sekretion von Zytokinen angrenzende Stromazellen zur Produktion dieser anregen. Hierzu verwendete ich Antikörper gegen CD3, CD20 und CD68, um eine Vielzahl der häufigsten Entzündungszellen zu detektieren. Ich verwendeten CD3 um Ansammlungen von T-Lymphozyten zu markieren, CD68 um diverse Mitglieder der Makrophagen-Zelllinie zu detektieren (Holness und Simmons 1993) und schließlich einen Antikörper gegen CD20, um B-Lymphozyteninfiltrate darzustellen, welche ein Indikator für eine eher chronische gegenüber akute entzündliche Veränderungen darstellen könnten und in anderen Krebsarten bereits mit dem Risiko einer malignen Entartung in Verbindung gebracht wurden (Cain et al. 2009; Coussens und Werb 2002; Visser et al. 2005). In den Gewebeschnitten zeigten sich zusätzlich auch PIN-Läsionen, in welchen ein zu erwartender deutlicher Verlust von NKX3.1 zu beobachten war(Abdulkadir et al. 2002). Als weiterer Marker wurde zur Identifikation und Abgrenzung von neoplastisch verändertem Gewebe noch ein Antikörper gegen die α-Methylacyl-CoA-Racemase (AMACR) verwendet, da diese dort oft überexprimiert wird (Zhou et al. 2003). Die Abgrenzung und der Ausschluss von neoplastisch verändertem Gewebe wurde jedoch nicht nur aufgrund der AMACR-

Überexpression vollzogen. Jeder histologische Schnitt wurde vor der Analyse von einem erfahrenen Pathologen ausführlich auf eventuelle neoplastische Areale untersucht, um das Ergebnis nicht zu verfälschen.

Wie in 3.11, Abb.43 zu erkennen, fand ich gleichsam sowohl angrenzend an CD3-, als auch in CD20- und CD68-positive Läsionen eine deutliche Reduktion der NKX3.1 positiven luminalen Prostataepithelzellen und somit deutlich mehr NKX3.1 negative Zellen. Diese Beobachtungen haben primär eine große Aussagekraft und unterstützen auch meine Hypothese. Nämlich, dass alleine entzündliche Infiltrate und die dort potentiell von den Entzündungszellen sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren einen Einfluss auf die Expression von NKX3.1 in den luminalen Epithelzellen haben. Dies könnte ein wichtiger erster Faktor hinsichtlich einer sekundären malignen Entartung darstellen, vor allem, wenn man im Vergleich dazu die in NKX3-1-Knock-Out-Mausmodellen deutlich vermehrt auftretenden PIN-Läsionen betrachtet (Abdulkadir et al. 2002). Nun stellt sich mir die Frage, welche Faktoren hierbei den größten Einfluss haben.

Es wäre möglich, dass gerade in chronisch entzündlichen Läsionen der Prostata Typ M2 Makrophagen zur Auflösung dieses Geschehens in diese Bereiche infiltrieren. Diese Zellen sezernieren wie zuvor beschrieben eher Wachstums- und Remodeling-Faktoren gegenüber der Makrophagen vom Typ M1 (Edin et al. 2012) und führen somit zur Bildung eines lokalen Entzündungsmilieus. Welche Makrophagen in diesem Fall genau vorhanden sind, lässt sich nur vermuten. Für Makrophagen vom Typ M2 sprechen z.B. die oftmals beobachteten - potentiell durch EGF verursachten - Veränderungen hinsichtlich einer Verdickung des Epithels (Siehe 3.11, Abb.41). Diese Vermutungen könnten durch eine immunhistochemische Differenzierung der Makrophagen Typ M1 mittels CD80 und Typ M2 mittels CD163 gestellt werden (Badylak et al. 2008; Descazeaud et al. 2009), was ihm Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurde.
Hinsichtlich des Wachstumsfaktors EGF und des beobachteten starken Einflusses auf den NKX3.1-Gehalt müssen jedoch noch weitere Faktoren in Betracht gezogen werden. So wird EGF physiologisch auch von gesunden, unaffektierten Stromazellen der Prostata produziert, da seine mitogenen Einflüsse entscheidend für die Aufrechterhaltung des Gewebes sind. Eine vermehrte bis übermäßige Produktion wird jedoch in entzündlichem Gewebe beobachtet. Hier spielt EGF eine wichtige Rolle bei Reparatur- und Umbauvorgängen. Proinflammatorische Zytokine veranlassen angrenzende Stromazellen hier zu einer Vermehrten Produktion (Bodnar 2013; Sherwood und Lee 1995).

Im Gesamten betrachtet, geben diese Beobachtungen Hinweise darauf, dass dauerhafte Reparatur-/Umbausignale, wie sie in chronischen Entzündungen vorhanden sind zu einer beständigen und übermäßig erhöhten Expression mitogener Faktoren wie EGF beitragen. Eben diese Faktoren könnten dann mittels ihrer negativen Wirkung auf den NKX3.1 Gehalt der luminalen Prostataepithelzellen analog zu den Funden von Leotoing et. al 2007 zu einer Dedifferenzierung terminal differenzierter Prostataepithelzellen führen. Dieser Wiedereintritt in den Zellzyklus und die erhöhte Teilungsbereitschaft (siehe: Abb.32 in 3.8) könnten somit maßgeblich an einem vermehrten Auftreten von (prä-)neoplastischen Läsionen mit nachfolgender maligner Entartung sein und somit einen wichtigen Risikofaktor darstellen.

Die Ergebnisse meiner immunhistochemischen Auswertungen geben deutliche Hinweise darauf, dass die Expression von NKX3.1 bereits in inflammatorischem Milieu gesenkt wird. Ob sich auch in humanen Prostatae nach Auflösung der Entzündung das NKX3.1 Niveau analog zum Mausmodell (Khalili et al. 2010) wieder erholt, ist noch nicht bekannt, wäre aber von weiterer Bedeutung. Möglich ist jedoch, dass gerade in chronisch entzündlichen Bereichen der frustrane Versuch der Entzündungszellen, mittels EGF und anderer Faktoren eine Reparatur und restitutio ad integrum des Gewebes herzustellen, zu einem Verlust von NKX3.1 führt. Dieser Verlust des Tumorsuppressors könnte, besonders unter langanhaltender Senkung in chronischen Läsionen, ein deutlicher Risikofaktor für die Entstehung einer PIN und einer folgenden späteren Entartung darstellen. Diese Theorie wird durch Funde wie in 3.11, Abb.40 bekräftigt. Die hier zu sehende PIN-Läsion ist mit einem leicht positiven CD68 und CD20 Signal überlagert. Dies könnte einerseits eine reaktive Einwanderung von Makrophagen in eine bereits morphologisch veränderte PIN-Läsion darstellen. Andererseits wäre auch ein vorhergehender entzündlicher Herd möglich, in dem es nach Einfluss von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie EGF zu einem Verlust von NKX3.1 mit anschließender Entstehung einer PIN kam, wofür das mehrreihig erscheinende, dysplastische Epithel sprechen würde.

Über die Analyse der von mir gefärbten Schnitte ist zusammenfassend zu sagen, dass ich einen deutlichen Zusammenhang der reduzierten NKX3.1 Expression mit der inflammatorischen Infiltration des betreffenden Prostataepithels beobachten konnte. Sowohl CD3, CD20 als auch CD68 positive Regionen zeigen einen ähnlichen Verlust von NKX3.1.

Zusammengefasst sind die Beobachtungen der Histologie und der Stimulationsexperimente ein Indiz dafür, dass eine Entzündung der Prostata mit einer einhergehenden Reduktion des Tumorsuppressors NKX3.1 ein deutlicher Risikofaktor für die Entstehung von neoplastischen Läsionen und einer malignen Entartung darstellen könnte. Diese Ergebnisse sind nicht nur molekularpathologisch sondern vor allem auch klinisch von Bedeutung. So könnte es von großer Bedeutung sein, vor allem jüngere Männer, die an einer chronischen Prostatitis leiden, früher und engmaschiger an Vorsorgeuntersuchungen anzubinden. Solche Maßnahmen könnten dann dabei helfen, dass Prostatakarzinome in dieser Risikogruppe vermehrt in Frühstadien erkannt werden, in welchen sie noch z.B. minimalinvasiv oder lokal therapiert werden können.

5 Zusammenfassung

NKX3.1 ist ein prostataspezifisches Protein, welches bei der embryonalen Entwicklung der Prostata und bei der Entstehung des Prostatakarzinoms sowie präneoplastischer Vorstufen (prostatisch-intraepitheliale Läsionen (PIN)) eine wichtige Rolle spielt. Es wird überwiegend von luminalen Prostataepithelzellen unter Androgenregulation exprimiert. Durch einen Knockout von NKX3.1 konnte im Mausmodell eine erhöhte Inzidenz von PIN-Läsionen gezeigt werden, welche eine Tendenz zu maligner Entartung aufweisen.

Unter verschiedenen anerkannten Risikofaktoren für die Entstehung des Prostatakarzinoms wird die Prostataentzündung (Prostatitis) bis dato kontrovers diskutiert. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf die Analyse des Verlusts von NKX3.1 in entzündlich veränderten Bereichen der Prostata gelegt. Ziel war es herauszufinden, ob Stoffe, die von Entzündungszellen vermehrt produziert und sezerniert werden, einen Einfluss auf die Expression von NKX3.1 haben und ob Infiltrate von Entzündungszellen in humanen Prostatae mit einem Verlust von NKX3.1 einhergehen, was für die Prostatitis als Risikofaktor sprechen könnte.

Es konnten in dieser Arbeit, sowohl bei den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP- als auch bei LNCaP C4.2 die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden, dass entzündliche (inflammatorische) Zytokine wie Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interleukin-1α (IL-1α) den NKX3.1-Gehalt sowohl auf Proteinebene als auch auf Ebene der Boten-RNA (mRNA) senken. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass auch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), welcher unter anderem während einer Prostatitis vermehrt exprimiert wird, in allen untersuchten Prostatakarzinomzelllinien die Expression von NKX3.1 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene senkt. Dieser Verlust hat weiterhin einen Einfluss auf die Expression Genen, die selbst unter NKX3.1-Kontrolle stehen.

Anschließend wurde hierzu der zugrundeliegende Mechanismus untersucht. Hieraus ergab sich, dass der Abbau von NXK3.1 unter anderem auf einer Degradation durch das zelleigene Proteasom beruht. Dieser Abbau konnte durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren partiell vermindert werden.

Mittels immunhistochemischer Analysen von primärem Prostatagewebe wurden mithilfe von Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3, CD20 und CD68 Bereiche mit Infiltraten von Entzündungszellen wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Ansammlungen von Makrophagen ausfindig gemacht. Durch eine Anfärbung von NKX3.1 wurden diese Bereiche auf ihre Expression von NKX3.1 in den Zellkernen der luminalen Prostataepithelzellen untersucht. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Verlust von NKX3.1 positiven Zellen sowohl in den CD3, CD20 als auch in CD68 positiven Bereichen. Zum Vergleich wurden auch Areale mit prostatisch-intraepithelialen Neoplasien (PIN) untersucht, von welchen bereits bekannt ist, dass dort ein NKX3.1 Verlust zu beobachten ist. In den Analysen der ausgewerteten PIN-Läsionen fiel ein vergleichbarer Verlust analog zu den untersuchten entzündlichen Läsionen auf. Dies lässt eine kausale Verbindung von entzündlichen Veränderungen und Vorläuferstufen maligner Entartung möglich erscheinen.

Die reduzierte Expression von NKX3.1 in den entzündlich veränderten Bereichen gibt einen Hinweis darauf, dass hierdurch ein erheblich erhöhtes Risiko zur Entstehung von präneoplastischen Veränderungen, wie z.B. der PIN, bestehen könnte. Diese Funde der Immunhistochemie, zusammen mit den Auswirkungen der entzündlichen Zytokine und EGF, auf den NKX3.1-Gehalt in Prostatakarzinomzelllinien deuten darauf hin, dass die Prostatitis ein ernst zu nehmender Risikofaktor für die Entstehung des Prostatakarzinoms ist. Dies hätte zudem auch eine erhebliche klinische Relevanz, da Männer mit chronischer Prostatitis aufgrund des erhöhten Risikos engmaschiger untersucht werden sollten. Gerade bei jüngeren Patienten könnte somit ein Prostatakarzinom deutlich früher diagnostiziert und somit noch besser therapiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdulkadir, SA, Magee JA, Peters TJ, Kaleem Z., Naughton CK, Humphrey PA und Milbrandt J. (2002). "Conditional Loss of Nkx3.1 in Adult Mice Induces Prostatic Intraepithelial Neoplasia." *Molecular Cell Biology*, S. 1495–1503.

2. Ammirante, M., JL Luo, S. Grivennikov, S. Nedospasov und M. Karin (2010). "B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer". *Nature*, S. 302–305.

3. Anderson, PD, SA McKissic, M. Logan, M. Roh, OE Franco, J. Wang, I. Doubinskaia, R. van der Meer, SW Hayward, CM Eischen, IE Eltoum und SA Abdulkadir (2012). "Nkx3.1 and Myc crossregulate shared target genes in mouse and human prostate tumorigenesis". *The Journal of clinical investigation*, S. 1907–1919.

4. Badylak, SF, JE Valentin, AK Ravindra, GP McCabe und AM Stewart-Akers (2008). "Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling". *Tissue engineering*, S. 1835–1842.

5. Bankowski, A., K. Filczak und M. Korbecki (1986). "Inhibition of vaccinia virus replication in RK-13 cells by N,N'-bis-2-methylpiperazine". *Acta virologica*, S. 192–198.

6. Bethel, CR, D. Faith, X. Li, B. Guan, JL Hicks, F. Lan, RB Jenkins, CJ Bieberich und AM De Marzo (2006). "Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion". *Cancer research*, S. 10683–10690.

7. Bhatia-Gaur, R., Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M., Desai N., Young P., Norton CR, Gridley T., Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C. und Shen MM (1999). "Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer". *Genes Development*, S. 966–977.

8. Biswas, DK und JD Iglehart (2006). “Linkage between EGFR family receptors and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signaling in breast cancer”. *Journal of Cellular Physiology*, S. 645–652.

9. Bodnar, RJ (2013). “Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer”. *Advances in wound care*, S. 24–29.

10. Bostwick, DG und J. Qian (2004). “High-grade prostatic intraepithelial neoplasia”. *Modern pathology*, S. 360–379.

11. Boulton, SJ (2006). “Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins”. *Biochemical Society transactions*, S. 633–645.

12. Brawer, MK (2005). “Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview”. *Reviews in Urology*, S. 11–18.

13. Cain, D., M. Kondo, H. Chen und G. Kelsoe (2009). “Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation”. *The Journal of investigative dermatology*, S. 266–277.

14. Cairns, P., K. Okami, S. Halachmi, N. Halachmi, M. Esteller, JG Herman, J. Jen, WB Isaacs, GS Bova und D. Sidransky (1997). “Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer”. *Cancer research*, S. 4997–5000.

15. Chen, CD und CL Sawyers (2002). “NF-kappaB Activates Prostate-Specific Antigen Expression and Is Upregulated in Androgen-Independent Prostate Cancer”. *Molecular and Cellular Biology*, S. 2862–2870.

16. Chin, AI, Dave DS und Rajfer J. (2007). “Is Repeat Biopsy for Isolated High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia Necessary?” *Reviews in Urology*, S. 124–131.

17. Clark, J., S. Merson, S. Jhavar, P. Flohr, S. Edwards, CS Foster, R. Eeles, FL Martin, DH Phillips, M. Crundwell, T. Christmas, A. Thompson, C. Fisher, G. Kovacs und CS Cooper (2007). “Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate”. *Oncogene*, S. 2667–2673.

18. Coussens, LM und Z. Werb (2002). “Inflammation and cancer”. *Nature*, S. 860–867.

19. Dennis, LK, CF Lynch und JC Torner (2002). “Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer”. *Urology*, S. 78–83.

20. Descazeaud, RG, Nicolaiew N., Terry S., Sirab N., Vacherot F., Mailli P., Allory Y. und de la Taille A. (2009). “Inflammation in benign prostatic hyperplasia: A 282 patients’ immunohistochemical analysis”. *The Prostate*, S. 1774–1780.

21. Edin, S., ML Wikberg, AM Dahlin, J. Rutegard, A. Oberg, PA Oldenborg und R. Palmqvist (2012). “The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer”. *PloS One*, e47045.

22. Ferlay, J., HR Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers und DM Parkin (2010). “Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008”. *International journal of cancer*, S. 2893–2917.

23. Fonseca-Alves, CE, MM Rodrigues, VM de Moura, SR Rogatto und R. Laufer-Amorim (2013). “Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis”. *Microscopy research and technique*, S. 1250–1256.

24. Gaston, KE, D. Kim, S. Singh, OH Ford und JL Mohler (2003). “Racial differences in androgen receptor protein expression in men with clinically localized prostate cancer”. *The Journal of urology*, S. 990–993.

25. Habib, AA, Chatterjee S., Park SK, Ratan RR, Lefebvre S. und Vartanian T. (2001). “The Epidermal Growth Factor Receptor Engages Receptor Interacting Protein and Nuclear Factor-kappaB (NF-kappaB)-inducing Kinase to Activate NF-kappaB: Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome”. *Journal of Biological Chemistry*, S. 8865–8874.

26. Hankey, BF, EJ Feuer, LX Clegg, RB Hayes, JM Legler, PC Prorok, LA Ries, RM Merrill und RS Kaplan (1999). “Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer–part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates”. *Journal of the National Cancer Institute*, S. 1017–1024.

27. He, WW, PJ Sciavolino, J. Wing, M. Augustus, P. Hudson, PS Meissner, RT Curtis, BK Shell, DG Bostwick, DJ Tindall, EP Gelmann, CA Shen und KC Carter (1997). “A Novel Human Prostate-Specific, Androgen-Regulated Homeobox Gene (NKX3.1) That Maps to 8p21, a Region Frequently Deleted in Prostate Cancer”. *Genomics*, S. 69–77.

28. Hermans, KG, R. van Marion, H. van Dekken, G. Jenster, WM van Weerden und J. Trapman (2006). “TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer”. *Cancer research*, S. 10658–10663.

29. Higashiyama, S., H. Iwabuki, C. Morimoto, M. Hieda, H. Inoue und N. Matsushita (2008). “Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: Beyond receptor ligands”. *Cancer Science*, S. 214–220.

30. Holness, CL und DL Simmons (1993). “Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins”. *Blood*, S. 1607–1613.

31. Horoszewicz, JS., Leong SS, Kawinski E., Karr JP, Rosenthal H., Chu TM, Mirand EA und Murphy GP (1983). “LNCaP model of human prostatic carcinoma”. *Cancer Res*, S. 1809–1818.

32. Hsing, AW, L. Tsao und SS Devesa (2000). “International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality”. *International Journal of Cancer*, S. 60–67.

33. Jemal, A., Bray F., Center MM, Ferlay J., Ward E. und Forman D. (2011). “Global cancer statistics.” *CA Cancer J Clin*, S. 69–90.

34. Johns, LE und RS Houlston (2003). “A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk”. *BJU international*, S. 789–794.

35. Khalili, M., LN Mutton, B. Gurel, JL Hicks, AM De Marzo und CJ Bieberich (2010). “Loss of Nkx3.1 expression in bacterial prostatitis: a potential link between inflammation and neoplasia”. *The American journal of pathology*, S. 2259–2268.

36. Kim, MJ, RD Cardiff, N. Desai, WA Banach-Petrosky, R. Parsons, MM Shen und C. Abate-Shen (2002). “Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, S. 2884–2889.

37. Kokontis, J., K. Takakura, N. Hay und S. Liao (1994). “Increased Androgen Receptor Activity and Altered c-myc Expression in Prostate Cancer Cells after Long-Term Androgen Deprivation”. *Cancer Research*, S. 1566–1573.

38. Kote-Jarai, Z., D. Leongamornlert, E. Saunders, M. Tymrakiewicz, E. Castro, N. Mahmud, M. Guy, S. Edwards, L. O'Brien, E. Sawyer, A. Hall, R. Wilkinson, T. Dadaev, C. Goh, D. Easton, D. Goldgar und R. Eeles (2011). "BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients". *British journal of cancer*, S. 1230–1234.

39. Krieger, JN, L. Nyberg und JC Nicke (1999). "NIh consensus definition and classification of prostatitis". *JAMA*, S. 236–237.

40. Krieger, JN, SW Lee, J. Jeon, PY Cheah, ML Liong und DE Riley (2008). "Epidemiology of prostatitis". *Int J Antimicrob Agents*, S. 85–90.

41. Kryvenko, ON, Jankowski M., Chitale DA, Tang D., Rundle A., Trudeau S. und Rybicki BA (2012). "Inflammation and preneoplastic lesions in benign prostate as risk factors for prostate cancer." *Mod Pathol*, S. 1023–1032.

42. Kwak, MK, Johnson DT, Zhu C., Lee SH, Ye DW, Luong R. und Sun Z. (2013). "Conditional Deletion of the Pten Gene in the Mouse Prostate Induces Prostatic Intraepithelial Neoplasms at Early Ages but a Slow Progression to Prostate Tumors." *PLoS One*, e53476.

43. Lei, Q., J. Jiao, L. Xin, CJ Chang, S. Wang, J. Gao, ME Gleave, ON Witte, X. Liu und H. Wu (2006). "NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss". *Cancer Cell*, S. 367–378.

44. Leongamornlert, D., N. Mahmud, M. Tymrakiewicz, E. Saunders, T. Dadaev, E. Castro, C. Goh, K. Govindasami, M. Guy, L. O'Brien, E. Sawyer, A. Hall, R. Wilkinson, D. Easton, D. Goldgar, R. Eeles und Z. Kote-Jarai (2012). "Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk". *British journal of cancer*, S. 1697–1701.

45. Leotoing, L., M. Manin, D. Monte, S. Baron, Y. Communal, C. Lours, G. Veyssiere, L. Morel und C. Beaudoin (2007). "Crosstalk between androgen receptor and epidermal growth factor receptor-signalling pathways: a molecular switch for epithelial cell differentiation". *Journal of Molecular Endocrinology*, S. 151–162.

46. Lu, H., W. Ouyang und C. Huang (2006). "Inflammation, a key event in cancer development". *Molecular cancer research*, S. 221–233.

47. M., Karin (2009). “NF-kappaB as a Critical Link Between Inflammation and Cancer”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

48. Markowski, MC, C. Bowen und EP Gelmann (2008). “Inflammatory Cytokines Induce Phosphorylation and Ubiquitination of Prostate Suppressor Protein NKX3.1”. *Cancer research*, S. 6896 –6901.

49. Marzo, AM De, Marchi VL, Epstein JI und Nelson WG (1999). “Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate: Implications for Prostatic Carcinogenesis.” *Am J Pathol*, S. 1985–1992.

50. Marzo, AM De, Platz EA, Sutcliffe S., Xu J., Gronberg H., Drake CG, Nakai Y., Isaacs WB und Nelson WG (2007). “Inflammation in prostate carcinogenesis”. *Nat Rev Cancer*, S. 256–269.

51. Montironi, R., R. Mazzucchelli, A. Lopez-Beltran, L. Cheng und M. Scarpelli (2007). “Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate”. *Nature clinical practice Urology*, S. 321–332.

52. Myers, RB, JE Kudlow und WE Grizzle (1993). “Expression of transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor and the epidermal growth factor receptor in adenocarcinoma of the prostate and benign prostatic hyperplasia”. *Modern pathology*, S. 733–737.

53. Nadler, RB, AE Koch, EA Calhoun, PL Campbell, DL Pruden, CL Bennett, PR Yarnold und AJ Schaeffer (2000). “IL-1beta and TNF-alpha in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis”. *The Journal of urology*, S. 214–218.

54. O’Sullivan, C., CE Lewis, AL Harris und JO McGee (1993). “Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma”. *Lancet*, S. 148–149.

55. Pettaway, CA (1999). “Racial differences in the androgen/androgen receptor pathway in prostate cancer”. *Journal of the National Medical Association*, S. 653–660.

56. Ries, LA und MP Eisner (2003). “SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000”. *Bethesda, MD, National Cancer Institute*.

57. Rigo, A., M. Gottardi, A. Zamo, P. Mauri, M. Bonifacio, M. Krampera, E. Damiani, G. Pizzolo und F. Vinante (2010). "Macrophages may promote cancer growth via a GM-CSF/HB-EGF paracrine loop that is enhanced by CXCL12". *Molecular cancer*, e9:273.

58. RKI (2014). "Krebs in Deutschland". *Pressemitteilung des Robert Koch-Instituts*.

59. Salem, S., M. Salahi, M. Mohseni, H. Ahmadi, A. Mehrsai, Y. Jahani und G. Pourmand (2011). "Major dietary factors and prostate cancer risk: a prospective multicenter case-control study". *Nutrition and cancer*, S. 21–27.

60. Schueller, J. und T. Laux (2013). "Prostataentzuendung - Prostatitis, 25.06.2013, 10:30Uhr". URL: `http://urologe-berlin-mitte.de/prostataentzundung-prostatitis/`.

61. Schultz, G., D. S. Rotatori und W. Clark (1991). "EGF and TGF-alpha in wound healing and repair". *Journal of cellular biochemistry*, S. 346–352.

62. Sherwood, ER und C. Lee (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate". *World journal of urology*, S. 290–296.

63. Shinohara, DB, AM Vaghasia, SH Yu, TN Mak, H. Bruggemann, WG Nelson, AM De Marzo, S. Yegnasubramanian und KS Sfanos (2013). "A mouse model of chronic prostatic inflammation using a human prostate cancer-derived isolate of Propionibacterium acnes". *The Prostate*, S. 1007–1015.

64. Song, H., Zhang B., Watson MA, Humphrey PA, Lim H. und Milbrandt J. (2009). "Loss-of-Nkx3.1 Leads to Activation of Discrete Downstream Target Genes during Prostate Tumorigenesis." *Oncogene*, S. 3307–3319.

65. Sramkoski, RM., TG Pretlow, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S., Sy MS, Marengo SR, Rhim JS, Zhang D. und Jacobberger JW (1999). "A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1." *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, S. 403–409.

66. Suzuki, H., D. Freije, DR Nusskern, K. Okami, P. Cairns, D. Sidransky, WB Isaacs und GS Bova (1998). "Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues". *Cancer research*, S. 204–209.

67. Tan, PY, CW Chang, KR Chng, KD Wansa, WK Sung und E. Cheung (2012). "Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen dependent prostate cancer survival". *Molecular and cellular biology*, S. 399–414.

68. Thomas, MA, DM Preece und JM Bentel (2010). "Androgen regulation of the prostatic tumour suppressor NKX3.1 is mediated by its 3' untranslated region". *The Biochemical journal*, S. 575–583.

69. Todesursachenstatistik, Wiesbaden Amtliche (2013). "Amtliche Todesursachenstatistik Wiesbaden". *Statistisches Bundesamt*.

70. Visser, KE de, LV Korets und LM Coussens (2005). "De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent". *Cancer cell*, S. 411–423.

71. Vykhovanets, EV, S. Shukla, GT MacLennan, MI Resnick, H. Carlsen, R. Blomhoff und S. Gupta (2008). "Molecular imaging of NF-kappaB in prostate tissue after systemic administration of IL-1 beta". *The Prostate*, S. 34–41.

72. Vykhovanets, EV, MacLennan GT, Vykhovanets OV und Gupta S. (2011). "IL-17 Expression by macrophages is associated with proliferative inflammatory atrophy lesions in prostate cancer patients." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, S. 552–565.

73. Wu, HC, JT Hsieh, ME Gleave, NM Brown, S. Pathak und LW Chung (1994). "Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: Role of bone stromal cells". *International Journal of Cancer*, S. 406–412.

74. Zhang, H., Muders MH, Li J., Rinaldo F., Tindall DJ und Datta K. (2008). "Loss of NKX3.1 Favors Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression in Prostate Cancer." *Cancer Res*, S. 8770–8778.

75. Zhou, M., Z. Jiang und JI Epstein (2003). "Expression and diagnostic utility of alpha-methylacyl-CoA-racemase (P504S) in foamy gland and pseudohyperplastic prostate cancer". *The American Journal of Surgical Pathology*, S. 772–778.

Tabellenverzeichnis

1 Kulturmedien 12
2 Primärantikörper Immunoblot 13
3 Sekundärantikörper Immunoblot 13
4 Immunhistochemie-Antikörper 14
5 Inhibitoren und Stimulantien 15
6 Zytokine und Hormone 15
7 RT-PCR Primer 16
8 siRNA-Sequenzen 17
9 Verwendete Chemikalien 18
10 Rezepte der verwendeten Puffer und Lösungen 21
11 Rezepte der hergestellten Western-Blot-Gele 25
12 Liste der verwendeten Kits 25
13 Verwendete Größenstandards 26
14 Verbrauchsgüter und Hersteller 26
15 Benutzte Gerätschaften 27

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Ralf Marienfeld für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie seiner hervorragenden und unermüdlichen Betreuung.

Bei Michaela Buck, Julia Melzner und Karola Dorsch möchte ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung und Färbung der histologischen Schnitte bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Lena Kelsch für ihren vielseitigen Beistand im Labor und Dr. Silke Brüderlein für die Hilfestellungen im Rahmen der Zellkultur bedanken.

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.