

Aus der Abteilung Urologie
(Prof. Dr. med. R.H. Ringert)
im Zentrum Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Effekte der Antiepileptika Carbamazepin und Lamotrigin
auf das Prostatakarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Stefan Sürig

aus
Wolfenbüttel

Göttingen
2010

Dekan:

Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter:

PD Dr. rer. nat. P. Thelen

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung

Abkürzungsverzeichnis

cDNA	complementary DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ER	Östrogenrezeptor
hIGF-BP-3	humanes Insulin- like growth factor-binding protein-3
IGF	Insulin- like growth factor
mRNA	messenger RNA
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
as-Primer	antisense-Primer
s-Primer	sense-Primer
tRNA	transfer RNA
TUR-P	transurethrale Prostataresektion

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1. Daten und Fakten zum Prostatakarzinom	- 1 -
1.1.1. Epidemiologie	- 1 -
1.1.2. Klassifikation und Ausbreitung des Prostatakarzinoms	- 2 -
1.1.3. Klinik, Prognose und Therapie des Prostatakarzinoms	- 3 -
1.1.4. Ätiologie und Pathogenese des Prostatakarzinoms	- 4 -
1.2. Mechanismen der Karzinomentstehung	- 6 -
1.2.1. Grundlegendes zur Kanzerogenese	- 6 -
1.2.2. Genetische Aberrationen im Prostatakarzinom	- 8 -
1.2.3. Die IGF-Achse	- 8 -
1.2.4. Der IGF-1 Rezeptor	- 9 -
1.2.5. Das humane IGF-Binding-Protein-3 (hIGF-BP-3)	- 9 -
1.2.6. Der Einfluss der Östrogene	- 10 -
1.2.7. Epigenetische Veränderungen	- 11 -
1.3. Histondeacetylaseinhibitoren	- 12 -
1.4. Antiepileptika	- 13 -
1.7. Fragestellung	- 15 -
2. Material und Methoden	- 16 -
2.1. Geräte, Materialien, Chemikalien, Zelllinie	- 16 -
2.1.1. Geräte	- 16 -
2.1.2. Materialien	- 17 -
2.1.3. Chemikalien	- 17 -
2.1.4. Zelllinie	- 18 -
2.2. Zellkultur	- 18 -
2.2.1. Kulturmedium	- 18 -
2.2.2. Kultivierung der Zelllinien	- 19 -
2.2.3. Passagieren der Zellkultur	- 19 -
2.2.4. Einfrieren der Zellen	- 20 -
2.3 Stimulation der drei Zelllinien mit Carbamazepin und Lamotrigin	- 20 -
2.3.1. Zielkonzentrationen von Lamotrigin und Carbamazepin	- 20 -

2.3.2. Stimulation und Zellgewinnung.....	- 21 -
2.4. PSA-Sekretion.....	- 21 -
2.5. Zellproliferations- und Vitalitätstest.....	- 22 -
2.6. RNA-Extraktion	- 22 -
2.6.1 Vermeidung von RNA-Degeneration	- 22 -
2.6.2. Prinzip der RNA-Extraktion.....	- 23 -
2.6.3. Protokoll zur RNA- Extraktion.....	- 23 -
2.7. RNA- Quantifizierung mittels Agilent 2100 Bioanalyzer	- 25 -
2.7.1 Prinzip der RNA-Quantifizierung	- 25 -
2.7.2. Protokoll zur RNA- Quantifizierung.....	- 25 -
2.7.3 Auswertung der Messungen.....	- 27 -
2.8. cDNA-Synthese.....	- 28 -
2.8.1. Prinzip der Reversen Transkription	- 28 -
2.8.2 Protokoll zur cDNA-Synthese	- 29 -
2.9. PCR.....	- 32 -
2.9.1. Prinzip der PCR.....	- 32 -
2.9.2. Real-Time-PCR-Amplifikationsdiagramm	- 33 -
2.9.3. Thermocycler und iTaq DNA- Polymerase	- 34 -
2.9.4. SYBR Green- Farbstoff zur unspezifischen Detektion.....	- 35 -
2.9.5. Primer.....	- 36 -
2.9.6. Protokoll zur iQ SYBR Green Supermix PCR.....	- 36 -
2.9.7. iCycler iQ-Programm	- 38 -
2.9.8. Auswertung des PCR-Laufes	- 39 -
2.9.9. Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Standardkurve	- 39 -
2.9.10. Endogenes Referenzgen ARP	- 40 -
2.10. Zusammenfassung Material und Methoden	- 40 -
3. Ergebnisse	- 41 -
3.1. Ergebnisse der RNA-Quantifizierung.....	- 41 -
3.2. Zellvitalität und Proliferation nach Stimulation mit Carbamazepin.....	- 42 -
3.2.1. Zellvitalität	- 42 -
3.2.2. Proliferationstest.....	- 44 -
3.3. Veränderungen der Genexpression nach Stimulation mit Carbamazepin und Lamotrigin in LNCaP, PC 3 und MCF 7	- 46 -

3.3.1. Expression von ARP	- 46 -
3.3.2. Expression des ER β in LNCaP, PC 3 und MCF 7	- 48 -
3.3.3. Vergleich der mRNA-Expression und der Sekretion von PSA.....	- 51 -
3.3.4. Komponenten des IGF-Systems	- 53 -
4. Diskussion	- 56 -
4.1. Das onkoprotektive Potential von Carbamazepin und Lamotrigin.....	- 56 -
4.1.1. Abnehmende Zellvitalität und Proliferation durch Carbamazepin und Lamotrigin	- 56 -
4.2. Hochregulation des ER β.....	- 58 -
4.3. Reduktion der PSA-mRNA-Expression und PSA-Sekretion	- 60 -
4.3.1. Zusammenhang PSA und IGF-Achse	- 60 -
4.4. Die IGF-Achse	- 61 -
4.4.1. Das hIGF-BP-3.....	- 61 -
4.4.2. Der IGF-1 Rezeptor.....	- 62 -
4.5. Rektifizierung der IGF- und Androgen-Achse unter Berücksichtigung des ER β Einflusses	- 63 -
4.6. Fazit und Ausblick.....	- 65 -
5. Zusammenfassung.....	- 67 -
6.Literaturverzeichnis.....	- 68 -

1. Einleitung

1.1. Daten und Fakten zum Prostatakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Mit fast 50000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das Prostatakarzinom die häufigste maligne Neubildung des Mannes. Nahezu 13% aller Männer erkranken im Laufe ihres Lebens an einem behandlungsbedürftigen manifesten Karzinom. Es steht hinter dem Bronchialkarzinom und den Darmtumoren an dritter Stelle der zum Tode führenden Tumorerkrankungen. Da es bevorzugt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr in Erscheinung tritt und über 90% der erkrankten Männer über 60 Jahre alt sind, liegt das Erkrankungsdurchschnittsalter bei über 72 Jahren.

Obwohl die Sterberate dank verbesserter Behandlungskonzepte und erweiterter Methoden zur Früherkennung seit den 90er Jahren rückläufig ist, bleibt die Erkrankung nicht zuletzt durch die steigende Inzidenz eine große Gefährdung für den Mann. In der westlichen Welt beträgt die Mortalität 20-45 Fälle pro 100000 Einwohner und sie ist in der schwarzen Bevölkerung in den USA mit 100 Fällen pro 100000 Einwohner und Jahr am höchsten (Angaben des Robert Koch Institutes, 2009). Die steigende Inzidenz lässt sich aber nicht nur durch verbesserte Früherkennung erklären, auch die ständig wachsende Lebenserwartung der westlichen Bevölkerung spielt eine wichtige Rolle (Jemal und Siegel, 2007).

Zu erwähnen ist an dieser Stelle die bekannte Tatsache, dass die Inzidenz des Prostatakarzinoms in der ostasiatischen Bevölkerung zehnfach niedriger ist, trotz ebenfalls steigender Lebenserwartung (Hammerer et al., 2000). Der so zu vermutende genetische Einfluss auf die Entstehung des Prostatakarzinoms wird aber relativiert durch Studien an ostasiatischen Emigranten in den USA. Nach bereits einer Generation passte sich die Inzidenz der westlichen Kontrollkohorte an.

Letztlich wird ein multifaktorielles Modell zur Kanzerogenese diskutiert, bei dem sowohl genetische Disposition (das Risiko für einen Mann, dessen Vater oder Bruder an einem Prostatakarzinom erkrankt sind, ist 2-3fach erhöht), Umweltfaktoren und die Lebensweise eine Rolle spielen (Carter und Beaty, 1992).

1.1.2. Klassifikation und Ausbreitung des Prostatakarzinoms

Neben der TNM- Klassifikation und der Beurteilung der Resektionsfläche gehört der Gleason-Score zu den wichtigsten prognostischen Parametern. Dieses Grading bezieht sich nicht auf zytologische Merkmale der Tumorzellen, sondern beurteilt das sich darstellende Drüsenmuster. Es werden fünf Grundmuster unterschieden:

Bei den Graden 1 und 2 handelt es sich um ein hochdifferenziertes Adenokarzinom, das meist zufällig im Elektrodenresektionmaterial nach einer transurethralen Prostataresektion (TUR-P) entdeckt wird.

Bei dem Grad 3 nach Gleason findet man noch ungleichmäßig aufgebautes Drüsenepithel, dessen Zellen deutlich nukleäre Atypien zeigen.

Gleason 4 zeichnet sich durch kleine Drüsen und ein kribriiformes Muster aus.

Gleason 5 bezeichnet ein anaplastisches Karzinom mit zahlreichen Mitosen.

Es werden die beiden größten Gruppen (die mit den meisten Zellen) für den Gleason-Score herangezogen. Zählt man ihre beiden Werte zusammen, erhält man den endgültigen Score

Bei homogenem Muster wird der ermittelte Grad einfach verdoppelt. So entspricht dem maximalen Gleason-Score ein Wert von 10.

Ein Karzinom entsteht nahezu immer in der Randzone der Prostata und breitet sich dann zunächst im Organ in Richtung Zentralzone aus. Die Metastasierung erfolgt lymphogen in die retroperitonealen Lymphknoten und hämatogen vor allem in die Wirbelsäule, den Femur oder den Beckenknochen.

Meist ist das Karzinom frühestens ab dem T2-Stadium klinisch manifest und zeigt zuerst Symptome, die einer benignen Prostatahyperplasie entsprechen könnten. Oft fällt es aber auch erst im metastasierten Stadium auf, z.B. durch starke Rückenschmerzen oder Schmerzen in großen Röhrenknochen (z.B. Femur) (Sökeland et al., 2004).

1.1.3.Klinik, Prognose und Therapie des Prostatakarzinoms

Klinik:

Leider gibt es für das Frühstadium eines Prostatakarzinoms keine wegweisende Klinik. Meist gibt es nur einen Zufallsbefund bei einer TUR-P OP bei einer bekannten benignen Prostatahyperplasie oder man entdeckt das Karzinom im Rahmen einer Obduktion. Das Zeitfenster, in dem so ein Frühstadium in der präklinischen Phase verbleibt, wird auf 10-15 Jahre geschätzt.

Im fortgeschrittenen Stadium können Blut im Urin, Dysurie oder Pollakisurie Leitsymptome darstellen. Da das Karzinom von der Randzone zur Zentralzone wächst, treten diese Symptome meist erst ab dem T2- Stadium auf.

Manchmal zeigen sich die ersten klinischen Symptome auch erst, wenn das Karzinom bereits metastasiert hat. In diesem Fall wird es dann durch pathologische Knochenbrüche in der Wirbelsäule, dem Femur oder den Beckenknochen manifest (Sökeland et al., 2004).

PSA:

Das Prostataspezifische Antigen (PSA) ist eine Serinprotease und ein gewebespezifisches Glykoprotein und trägt zur Verflüssigung des Ejakulates bei. Es wird in den epithelialen Deckzellen der Prostata gebildet und ist innerhalb gewisser Grenzwerte im Serum physiologischerweise nachweisbar (bis 4ng/ml). Beim Verdacht auf ein Prostatakarzinom oder bei Vorsorgeuntersuchungen wird es als Tumormarker bestimmt. Es ist der einzige Tumormarker, der bedingt auch bei einem Tumor-Screening eingesetzt wird. Jedoch bedarf es bei einem erhöhten PSA immer einer weiteren Abklärung, da viele Erkrankungen einen PSA-Anstieg im Serum verursachen können (benigne Prostatahyperplasie, Prostatitis, usw) (Sökeland et al., 2004). Deshalb wird intensiv nach weiteren aussagekräftigen Prostatakarzinommarkern gesucht, die helfen können, eine frühzeitige Therapieentscheidung zu fällen. Als vielversprechend erwiesen sich hierbei in jüngster Zeit Ergebnisse mit dem PCA 3 und den sogenannten Fusionsproteinen, wie z.B. dem TMPRSS2-ERG (Nelson und Montgomery, 2007).

Prognose:

Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Prostatakarzinome beträgt 70%. Die Stadien T1 und T2 haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90%. Bei einem T4-Befund bzw. T3 mit Fernmetastasen (M1) beträgt die 5-Jahres Überlebensrate 40% (Angaben Robert Koch Institut, 2009).

Therapie:

Beim lokalen Prostatakarzinom ist die Heilung prinzipiell durch die radikale Prostatektomie oder eine Bestrahlungstherapie möglich. Beim lokal fortgeschrittenen Karzinom kommt häufig ein multimodales Therapiekonzept zum Einsatz (Prostatektomie, Strahlentherapie, sofortiger oder verzögerter Androgenentzug). Das metastasierte Karzinom wird initial mit Androgendeprivation, durch chirurgische Orchiektomie, LH-RH-Analoga oder Antiandrogene behandelt. Bei weiterem Fortschreiten der Krankheit kann die Therapie abgesetzt und durch Hydrokortison oder Somatostatin-Analoga ersetzt werden. Sind alle hormonellen Therapiemaßnahmen ausgeschöpft und der PSA steigt weiter an, spricht man von einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom. In diesem Fall gibt es keine weitere kausale Therapie, eine Chemotherapie mit Docetaxel stellt die momentane Standardbehandlung dar (Sökeland et al., 2004).

1.1.4. Ätiologie und Pathogenese des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom entwickelt sich über viele Jahre hinweg. Als Präkanzerose gelten zur Zeit die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) und die atypische adenomatöse Hyperplasie (AAH) sowie die proliferative inflammatorische Atrophie (PIA) (De Marzo und Marchi, 1999; Taichmann und Loberg, 2007).

Damit bleibt das Alter des Mannes der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms. Zwar können die Initiation des Prostatakarzinoms und morphologische Veränderungen schon in frühen Jahren auftreten, aber das klinisch manifeste Karzinom tritt gehäuft im Alter zwischen 60 und 70 Jahren auf. Allerdings zeigen postmortale Untersuchungen an über 90-Jährigen eine Karzinomrate von über 70%. Diese Karzinome konnten sich aber zu Lebzeiten klinisch nicht manifestieren und waren dementsprechend auch nicht behandlungsbedürftig (Böcker et al., 2004).

Deshalb wird ein Modell diskutiert, bei dem für die Entstehung eines klinisch manifesten Tumors zwei Phasen nötig sind: einerseits die Entartung einer Zelle, getriggert durch Kanzerogene, und die damit verbundene Autonomie gegenüber höheren regulativen Einflüssen, andererseits die Karzinom Progression, für die weitere Aberrationen nötig sind (Nelson und Montgomery, 2007).

Bei 10% aller Prostatakarzinome spielt Vererbung eine Rolle. In diesen Fällen tritt die Krankheit schon in jungen Jahren und familiär gehäuft auf. Die Suche nach den ursächlichen Genen hat sich als äußerst schwierig erwiesen, schließlich ist am ehesten ein genetischer Polymorphismus zu vermuten. Hierbei existieren auf einem Genlocus zwei oder mehr Allele, die sich in Ihrer Nucleotidsequenz unterscheiden und somit zu entsprechenden phänotypischen Ausprägungen führen. Diese Polymorphismen sind z.B. für den Androgenrezeptor beschrieben. Trotz intensiver Suche konnte dafür aber kein Korrelat innerhalb des Genoms gefunden werden (Abate-Shen und Shen, 2000).

Der scheinbar bedeutendste Umweltfaktor für die Entstehung des Prostatakarzinoms ist wohl die Ernährung. Während in westlichen Kulturen vermehrt tierische Fette und Proteine, aber weniger Ballaststoffe konsumiert werden, zeichnet sich die asiatische Ernährung durch fettarme faserreiche Kost aus. Sie enthält abhängig von der Beschaffenheit des Bodens idealerweise größere Anteile des Spurenelementes Selen und zudem unabhängig von der Bodenbeschaffenheit Phytoöstrogene (v.a. in Sojaprodukten) (Giovannucci, 1999; Jankevicius et al., 2002).

Entzündungen scheinen ebenfalls an der Genese des Prostatakarzinoms mitzuwirken, da sexuell übertragbare Krankheiten das Risiko für die Entstehung einer malignen Hyperplasie steigern. Zum einen ist daran die Infektion selbst beteiligt, zum anderen spielt die von Entzündungsmediatoren vermittelte Immunantwort eine Rolle. So können genomische Schäden gesetzt werden, die als Wegbereiter des Prostatakarzinoms dienen (Nelson und Montgomery, 2007).

1.2. Mechanismen der Karzinomentstehung

1.2.1. Grundlegendes zur Kanzerogenese

Grundlegend für die Entstehung eines Karzinoms ist die Veränderung von physiologischen Funktionen, welche die Zellproliferation und die Apoptose regulieren. Somit bilden überschießende Zellproliferation und abnehmende Apoptoseraten häufig die ersten Schritte in der Karzinomentstehung. Das so enthemmte autonome Wachstum geht in der Regel mit Verlusten in der spezifischen Zell- und Gewebefunktion einher.

Charakteristisch ist die Zellproliferationsrate in der Prostata gering und bleibt es auch meist bei der Entwicklung von neoplastischem Gewebe. Die steigende Zellzahl lässt sich größtenteils auf eine unangemessen niedrige Apoptoserate zurückführen (Schulz et al., 2003).

Während die PIN noch durch eine etwa 7-fach erhöhte Proliferationsrate gekennzeichnet ist, beobachtet man in fortgeschrittenen Karzinomen einen annähernd 60% Abfall der Apoptoseraten (Abate-Shen und Shen, 2000).

Die früheste histologisch erkennbare präkanzeröse Veränderung ist die low grade (lg)PIN (prostatistische intraepitheliale Neoplasie). Man geht davon aus, dass der größte Teil der Männer ab dem 50. Lebensjahr betroffen ist. Allgemeine präkanzeröse Veränderungen sind etwa bei einem von drei Männern ab dem 30. Lebensjahr zu finden. Jedoch entwickelt nur einer von neun ein Karzinom. In histologischen Studien beobachtet man ein Kontinuum zwischen niedrig- und hochgradigen Formen der PIN (low grade (lg), bzw. high grade (hg) PIN), wobei die hgPIN als unmittelbarer Vorläufer des frühinvasiven Karzinoms gilt. Hochgradige PINs gehen manifesten Tumoren wenigstens 10 Jahre voraus. Die PIN bewirkt keinen PSA-Anstieg im Serum und ist nur bioptisch nachweisbar.

Den Ablauf der Kanzerogenese stellt man sich wie folgt vor:

Initiation

Durch eine irreversible Schädigung der DNA in Folge einer Infektion oder andersartigen Inflammation werden Reparaturmechanismen inaktiviert und die Proonkogene aktiviert.

Latenz

Dieser Zeitraum kennzeichnet die Spanne vom Eintreten der Noxe bis zum manifesten Karzinom. Da die Prostata eine sehr geringe Zellerneuerungsrate hat, ist dieser Zeitraum ausgesprochen lang (Bühling et al., 2000).

Promotion

Hierunter versteht man einen zellschädigenden Prozess, der zur Überleitung der onkogenen Potenz einer Zelle zur vollständigen Entartung führt. Unter Einfluss von Promotoren kommt es zur Steigerung der Zellproliferation. Zusätzlich können Kokarzinogene greifen, wie z.B. Hormone, Viren oder Chemikalien (Bühling et al., 2000).

Beim Prostatakarzinom bewirken Androgene eine Steigerung der Proliferationsrate, während Antiandrogene zumeist eine Wachstumshemmung induzieren.

Progression

Es gibt einen Unterschied zwischen der Prävalenz des Prostatakarzinoms in histologischen Studien und der Prävalenz des Prostatakarzinoms in der Bevölkerung. Diese Differenz könnte u.a. daher rühren, dass histologische Kriterien eines Karzinoms in einigen wenigen Zellen schon frühzeitig erworben sind (Karzinom Initiation), während die Fähigkeit zur unkontrollierten Vermehrung dieser Zellen erst im weiteren Verlauf erworben wird (Karzinom-Progression). Mögliche Faktoren, die entartete Zellen befähigen, sich ungehemmt zu vermehren, sind z.B. die schon erwähnten Fusionsproteine (TMPRSS2-ERG) (Nelson und Montgomery, 2007).

Deshalb steht am Ende der Karzinogenese das Stadium der Progression, dieses ist im Gegensatz zur Promotion irreversibel. Es führt zur Proliferation veränderter Zellklone, sodass sich makroskopisch sichtbare Läsionen bilden.

Im Zuge dieser Entwicklung erlangt der Tumor invasive Eigenschaften, die ihn zur Metastasierung befähigen. Dabei finden sich im fortgeschrittenen Prostatakarzinom eine verminderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und eine Zunahme an Matrixmetalloproteinasen (Schulz et al., 2003).

Im Prostatakarzinom werden sowohl normales Drüsengewebe als auch paraneoplastische Veränderungen sowie neoplastische Herde nebeneinander gefunden (Heterogenität). Innerhalb einer Neoplasie lassen sich auch unterschiedliche genetische Veränderungen nachweisen (Multifokalität). Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass multiple Foci unabhängig voneinander entstehen und sich auch auf unterschiedliche Weise entwickeln können (Abate-Shen und Shen, 2000).

1.2.2. Genetische Aberrationen im Prostatakarzinom

Essentiell für die Entstehung eines Karzinoms ist die Fähigkeit der Tumorzellen autonom proliferieren zu können. Dazu sind unter anderem die Umwandlung von Protoonkogenen zu Onkogenen und die Inaktivierung proapoptotischer Faktoren notwendig. Eine besondere Rolle nimmt hierbei der Androgenrezeptor ein. Er ist ein Transkriptionsfaktor diverser Gene unter anderem auch des PSA. Seine Umwandlung von einem Pro-Differenzierungs- zu einem Pro-Proliferationsfaktor wird als eines der Schlüsselereignisse in der Entstehung des Prostatakarzinoms gesehen (Nelson und Montgomery, 2007).

Auch andere Proteine, die im Folgenden näher erläutert werden, sind in ihrer Funktion oder Expression im Prostatakarzinom verändert. Hierzu zählen z.B. Komponenten der IGF-Achse, das PSA und Östrogenrezeptoren.

1.2.3. Die IGF-Achse

Die einzelnen Anteile der zur IGF-Achse gehörenden Proteine und Peptide haben die unterschiedlichsten Wirkungen auf die Apoptoserate, die Proliferationsrate, die Fähigkeit zur Metastasierung und die De-Differenzierung von Prostatakarzinomzellen (Moschos und Mantzoros, 2002). Im Allgemeinen werden die Polypeptide IGF-1 und

IGF-2, der IGF-1 Rezeptor und das hIGF-BP-3 als diejenigen Komponenten der IGF-Achse mit dem am gründlichsten untersuchten Einfluss betrachtet.

Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass IGF-1 in der Lage ist, den Androgenrezeptor (AR) der entarteten Prostatazellen Androgen-unabhängig zu aktivieren. So resultierten aus den erhöhten IGF-1-Pegeln eine vermehrte PSA-Sekretion (Culig et al. 1994).

Besondere Aufmerksamkeit wird in dieser Arbeit dem IGF-1 Rezeptor und dem humanen IGF-Binding-Protein gewidmet und deren Wechselwirkungen mit der nicht zur IGF-Achse zählenden Serinprotease PSA.

1.2.4. Der IGF-1 Rezeptor

Der IGF-1 Rezeptor ist ein Glykoprotein auf den Oberflächen der Zellen und gehört zur Familie der Tyrosinkinase (Moschos und Mantzoros, 2002).

Seine Wirkung wird über die MAP-Kinase und über PI 3-Kinase entfaltet. In seiner Struktur ist er zu 70% dem Insulinrezeptor ähnlich. Die höchste Affinität weist er zum IGF-1 auf die niedrigste zum Insulin selbst (Djavan et al., 2001).

Die IGF-1 Rezeptoren müssen in einer suffizienten Anzahl aktiviert werden, um eine „Mode of function“ zu erfahren, die ihre mitogenen Eigenschaften hervorbringt (Moschos und Mantzoros, 2002 und Hellawell et al., 2002).

In Prostatakarzinomen von Ratten wurde in vivo eine Suppression des Tumorwachstums und eine verminderte Fähigkeit des Tumors zur Metastasierung beobachtet, sobald der IGF-1 Rezeptor durch antisense-RNA ausgeschaltet wurde (Burfeind et al., 1996).

Dieses Ergebnis wurde von Grzmil et al. 2004 in humanen PC 3 Zelllinien bestätigt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass allein eine Repression des IGF-1-Rezeptors zu einer massiven Hochregulation des hIGF-BP-3 führt (Grzmil et al., 2004).

1.2.5. Das humane IGF-Binding-Protein-3 (hIGF-BP-3)

Das hIGF-BP-3 ist das größte der insgesamt 6 IGF-1 und IGF-2 bindenden Proteine. Es weist die höchste Konzentration aller hIGF-BP im Serum auf. Die stärkste Affinität zeigt es zum IGF 1 (Moschos und Mantzoros, 2002).

hIGF-BP-3 wird hauptsächlich in der Leber produziert, ebenfalls aber auch in den Epithelzellen der Prostata. Wegen seiner hohen Affinität zum IGF-1 ist das hIGF-BP-3 in der Lage, die Wirkung dieses anti-apoptotischen und proliferations-fördernden Peptids zu mindern, da der hIGF-BP-3-IGF1-Komplex keine Signalkaskade initiieren kann (Djavan et al., 2001).

Die Wirkung dieses so bedeutenden Tumorsuppressorgens erfolgt aber nicht allein über den Mechanismus der Inaktivierung des IGF-1. Es wurden spezielle hIGF-BP-3 Rezeptoren auf Zelloberflächen beschrieben, über die das Protein seine anti-proliferativen und proapoptotischen Eigenschaften in Abwesenheit von IGF-1 vermitteln kann (Oh Y et al., 1995 und Grzmil et al., 2004).

Des Weiteren handelt es sich bei dem hIGF-BP-3 um ein Substrat der Serinprotease PSA. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigendem PSA-Level die Konzentration des hIGF-BP-3 deutlich reduziert wurde und die Affinität zum IGF-1 abnahm. Somit wird die maligne Funktion des PSA mit steigenden Konzentrationen deutlich (Moschos und Mantzoros, 2002).

1.2.6. Der Einfluss der Östrogene

Dass nicht nur Androgene wie das Testosteron, sondern auch Östrogene Einfluss auf das Prostatakarzinom haben, ist schon seit längerem bekannt. Der androgene Einfluss allein vermag nicht das Fortschreiten einer PIN einzuleiten, es wurde vielmehr beobachtet, dass ein Ungleichgewicht zwischen Testosteron/Östrogen nötig war. Dazu wurden Ratten mit hohen Dosen Testosteron behandelt, während gleichzeitig eine Stimulation mit Östrogenen stattfand. In diesen Fällen kam es zu einer vermehrten Entwicklung eines manifesten Prostatakarzinoms (Bonkhoff, 2008). Die so naheliegende Vermutung, dass eine Behandlung mit einem Aromatase-Hemmer (und damit die Ausschaltung des Östrogens) zu einer Verlangsamung des Wachstums des Karzinoms führen würde, konnte aber nicht bestätigt werden (Stuart et al., 2007).

Daher muss die Wirkung des Östrogens differenziert betrachtet werden. Das Östrogen entfaltet seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptoren, den ER α und den ER β . Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung über den ER α eine

Entzündungsreaktion begünstigt und einen die Proliferation steigernden Einfluss hat (Stuart et al., 2007).

Dagegen gibt es diverse Hinweise darauf, dass eine Restauration des ER β , bzw. dessen spezifische Stimulation zu einer gesteigerten Apoptose und Proliferationsinhibition führen (Cheng et al., 2004).

In der Arbeit von Stettner et al. konnten des Weiteren diverse Onkogene identifiziert werden, die ohne den Einfluss des ER β einen signifikanten Expressionszuwachs erfuhren (Stettner et al., 2007).

Damit sind dem ER β eindeutig Tumorsuppressor-Eigenschaften zuzuschreiben.

1.2.7. Epigenetische Veränderungen

Neben Veränderungen, die direkt die DNA betreffen, spielen auch Modifikationen an den mit der DNA interagierenden Proteinen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Genexpression. Auch Veränderungen an diesen Proteinen tragen zur Transformation gesunder Zellen bei. Dies wird unter dem Oberbegriff „Epigenetische Veränderungen“ zusammengefasst. Besondere Beachtung verdienen dabei die Histon-Oktamer-Kernkomplexe. Ein solcher Komplex besteht aus je zwei Kopien der Proteine H2A, H2B, H3 und H4. Jedes dieser 4 Proteine enthält einen lysinreichen N-terminalen Anhang, der die um den Histonkomplex gewickelte DNA überragt und umschließt und so Interaktionen von nicht zum Nukleosom gehörenden regulatorischen Proteinen mit der DNA beeinflussen kann (Luger et al., 1997).

Die Seitenketten der Histonanhänge können posttranslational unter anderem durch Acetylierung modifiziert werden. Durch diese Veränderungen der Chromatinstruktur entsteht ein Code, der nicht durch die Basenfolge der DNA, sondern durch Proteine, die mit der DNA in enger Verbindung stehen, geschrieben wird. Dieser Code kann von spezialisierten Proteinen und Proteinkomplexen in Befehle zur Genaktivierung bzw. zur Geninaktivierung übersetzt werden. Die Acetylierung ist die am besten untersuchte epigenetische Veränderung. Vermehrte Histon-Acetylierung führt zu einer Nettoabnahme positiver Ladungen am Histon, sodass die Bindung zwischen Histon und negativ geladener DNA geschwächt wird. Die Folge ist eine weniger dichte Chromatinstruktur, die wiederum das Ablesen der DNA erleichtert und somit in

einer gesteigerten Genexpression resultiert. Dementsprechend führt eine verminderte Acetylierung zu einer verminderten Genexpression (Marks et al., 2004).

Der Acetylierungsstatus der Histonschwänze wird durch das Wechselspiel zweier Enzymklassen beeinflusst: Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) fördern die Acetylierung, während Histon-Deacetylasen (HDAC) sie verhindern. Bisher sind 18 HDACs bekannt, die abhängig vom Autor in mehrere Klassen eingeteilt werden (Gray und Ekström, 2001).

Veränderungen in der Funktion oder Expression der HATs und HDACs sind Schlüsselereignisse, die zu einem Ungleichgewicht im Wechselspiel dieser zwei antagonistischen Enzymklassen führen und somit für das Entstehen und Fortschreiten eines Karzinoms mit verantwortlich sind.

1.3.Histondeacetylaseinhibitoren

Eine vermehrte Aktivität von HDACs führt zu einer Suppression in der Transkription einiger Gene. Um Aktivität der HDACs zu unterdrücken, setzt man auf sogenannte Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) mit dem Ziel, so gewisse antiproliferative Eigenschaften der Zellen wieder zu aktivieren. Die biochemische Struktur der HDACi ist extrem heterogen und reicht von einfachen Vertretern, wie dem Valproat, bis hin zu komplexen chemischen Stoffen, wie dem MS 275. Die HDACis werden nach ihrer chemischen Struktur in sechs Gruppen eingeteilt:

1. Carboxylsäuren (z.B. Valproat)
2. Hydroxamsäuren (z.B. Trichostatin A)
3. Benzoamide (z.B. MS 275)
4. Epoxide (z.B. Trapoxin)
5. Zyklische Peptide (z.B. Depsipeptid)
6. Hybridmoleküle (z.B. CHSP31).

Bei der Behandlung von Prostatakarzinomzelllinien mit HDACis zeigen sich pleiotrope Effekte. Beobachtet wurden bei der Behandlung mit Valproat unter anderem: Inhibition des Wachstums (Xia et al., 2006), Induktion von Apoptose und Veränderungen in der Expression verschiedener proliferativer und proapoptotischer Gene (Thelen et al., 2004).

1.4. Antiepileptika

Bei den Antiepileptika handelt es sich um eine chemisch sehr heterogene Gruppe von Medikamenten. Das wohl bekannteste und am besten erforschte ist das Valproat. Es wird als Mittel der ersten Wahl bei einer generalisierten Epilepsie eingesetzt und ist ebenfalls zum Einsatz bei bipolaren Störungen zugelassen. Ihm werden teratogene Eigenschaften zugeschrieben und es ist das erste Antiepileptikum, bei dem eine epigenetische Wirksamkeit beobachtet wurde. Deshalb sei es an dieser Stelle noch einmal kurz erwähnt.

Nach seiner chemischen Struktur ist es eine einfache Carbonsäure:

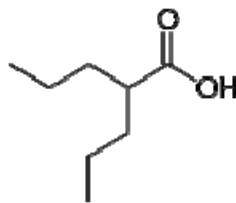
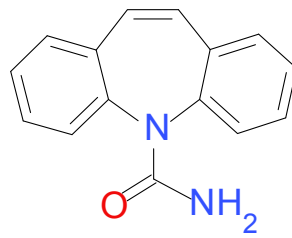


Abbildung 1: Valproat

Des Weiteren seien hier noch die in dieser Arbeit untersuchten Antiepileptika Carbamazepin und Lamotrigin erwähnt.

Carbamazepin:

Carbamazepin zählt chemisch zur Klasse der Dibenzazepine und ist ein Antiepileptikum, das vorwiegend gegen fokale Epilepsien eingesetzt wird. Strukturchemisch ist es dem Imipramin sehr ähnlich. Darüber hinaus wird es auch als Phasenprophylaktikum bei verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen eingesetzt. Außerdem zeigt es gute Ergebnisse bei der Behandlung von Trigeminusneuralgien. Beachtenswert ist auch, dass es Cytochrom-P-450 in der Leber induzieren und somit seinen eigenen Abbau beschleunigen kann.



Carbamazepine

Abbildung 2: Carbamazepin

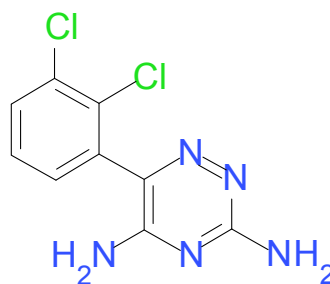
Lamotrigin:

Lamotrigin zählt zu den neueren Antiepileptika. Es ist seit 1993 zugelassen und wird vor allem als Zusatzmedikation verabreicht. Neben der Epilepsiebehandlung wird es vor allem zur Prophylaxe von rezidivierenden Depressionen und von depressiven Zuständen bei einer bipolaren Störung eingesetzt.

Lamotrigin wirkt stimmungsstabilisierend und reiht sich damit bei den Phasenprophylaktika ein.

Zudem wurde in einer Studie von Schlaganfallpatienten bei 30 % der Beteiligten eine Minderung der Schmerzen beobachtet. Ebenfalls wird eine gute Wirksamkeit bei HIV-assoziiertes Polyneuropathie beschrieben.

In jüngerer Zeit wird das Mittel von Neurologen auch gegen Migräne eingesetzt - allerdings nicht gegen die Kopfschmerzen, sondern in Fällen, in denen die Aura (neurologische Ausfälle, Lähmungserscheinungen, Gesichtsfeldausfälle aufgrund der Migräne) im Vordergrund steht (Burgis, 2001).



Lamotrigine

Abbildung 3: chemische Struktur von Lamotrigin

1.7. Fragestellung

Das Antiepileptikum Valproat ist ein bekannter Histondeacetylase-Inhibitor. Es sind diverse Gene und Mechanismen beschrieben worden, durch die Valproat seine antiproliferative und proapoptotische Wirkung entfaltet (Thelen et al., 2004).

Ebenfalls sind mit Levetiracetam und dessen Metabolit 2-pyrrolidinon-n-butyl-Säure (PBA) zwei weitere Antiepileptika beschrieben, die das Wachstum und die Entdifferenzierung von Prostatakarzinomzellen hemmen können (Eyal et al., 2004).

Carbamazepin ist ein Antiepileptikum, das in der neurologischen Therapie vielfältig eingesetzt wird. Es zählt zur Klasse der Dibenzazepine und ist strukturchemisch dem Imipramin ähnlich. So wird es bei fokalen Epilepsien und zur Phasenprophylaxe bei bipolaren Störungen eingesetzt. Seine Pharmakodynamik ist noch nicht vollständig geklärt, es wird aber eine Blockade von Natrium-Kanälen in den Axonen der Nervenzellen diskutiert.

Das Lamotrigin ist ein neueres Antiepileptikum, das neben dem Einsatz bei Epilepsien vorzugsweise bei affektiven Störungen eingesetzt wird (v.a. bei rezidivierenden Depressionen) und gegen Migräne-Kopfschmerzen. Es entfaltet seine Wirkung über Hemmung von axonalen Kalzium- und Natrium-Kanälen.

Um die Fähigkeit der Antiepileptika, Histondeacetylasen zu inhibieren und die Mechanismen der Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung der Genexpression genauer betrachten zu können, ist es das Ziel dieser Arbeit, das Spektrum der Antiepileptika mit Wirkung auf die Histondeacetylasen zu erweitern.

Dazu werden sowohl die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC 3 als auch die Mammakarzinomzelllinie MCF 7 mit Carbamazepin und Lamotrigin stimuliert und anschließend hinsichtlich ihrer Proliferationsrate, PSA- Sekretion und Genexpression untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte, Materialien, Chemikalien, Zelllinie

2.1.1. Geräte

Für die experimentellen Arbeiten werden folgende Geräte verwendet:

- Photometer:
- Brutschrank: Biocenter 2001
- Automatikpipetten unterschiedlicher Größen: Eppendorf
- Sterile Werkbank und Abzug HA 2472 GS: Heraeus Lamin Air, Hanau
- Lichtmikroskop Labovert
- Neubauer- Zählkammer
- Zentrifugen:
 - Labofuge GI, Heraeus
 - Labofuge 400R, Heraeus
- Nano- Chip- Priming- Station: Biotech Gene Quant 2, Agilent
- Bioanalyzer: Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies
- Perkin Elmer
- PCR-Cycler: iCycler iQ (BIORAD) mit: Software zur Datenanalyse:
iCycler iQ real time detection software (BIORAD)

2.1.2 Materialien

Nachfolgend aufgelistete Materialien werden für die Versuche benötigt:

- Pipettenspitzen mit hydrophobem Filter: Nunc
- Gewebekulturflaschen (50 ml): Nunc
- Sechs-Well-Platten
- Quarzglas-Kürvetten
- Reagenzröhrchen: Nunc
- Eppendorf- Gefäße verschiedener Größe
- RNA 6000 Nano LabChip Kit: Agilent Technologies
- Agilent Reinigungschip: Agilent Technologies

2.1.3. Chemikalien

Folgende Chemikalien kommen in den Experimenten zur Anwendung:

- L-Glutamin: Sigma
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma
- Carbamazepin
- Lamotrigin
- Trypsin-EDTA: Sigma
- Cell Freezing Medium DMSO: Sigma
- FCS
- Natriumpyruvat
- L-Glutamin
- Penicillin- Streptomycin
- RNeasy Mini Kit: Qiagen, Hilden
- 100% Ethanol (EtOH): Fluka
- RNA 6000 Nano LabChip Kit: Agilent Technologies
- RNA-6000-ladder: Ambion
- RNase ZAP: Ambion,

- Omniscript RT Kit: Qiagen
- RNase Inhibitor: Eppendorf
- Random Primer: Qiagen
- iQ SYBR Green Supermix Kit BIORAD
- genspezifische s- und as- Primer

2.1.4. Zelllinie

Für die Zellkultur werden folgende etablierten Zelllinien verwendet:

- LNCaP- Prostatakarzinomzelllinie (hormonsensibel, Modell aus einer humanen Lymphknotenmetastase)
- PC 3- Prostatakarzinomzelllinie (fehlender Androgenrezeptor, Modell aus einer humanen Knochenmetastase)
- MCF 7- etablierte humane Mammakarzinomzelllinie

Bei der MCF 7 handelt es sich um eine humane Mammakarzinomzelllinie. Es wird somit im Rahmen einer urologischen Arbeit zum Prostatakarzinom lediglich ein Vergleich der Expressionsveränderungen des ER β herangezogen, um die Wirkung von Histondeacetylase-Inhibitoren auch in anderen Karzinomen zu charakterisieren.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Kulturmedium

Für die Zelllinien der LNCaP und der PC 3 wird das Medium DMEM versetzt mit:

- 10% FCS
- 1% Natriumpyruvat
- 2% L-Glutamin
- 1% Penicillin-Streptomycin

Die MCF 7 erhält ein Nährmedium, das sich wie folgt zusammensetzt:

- 50% MEM
- 50% DMEM
- 2 % L-Glutamin
- 10% FCS

Das fertige Medium wird bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2. Kultivierung der Zelllinien

Um optimale Bedingungen für das Wachstum der Zelllinien zu gewährleisten, werden die Kulturen in einem Brutschrank bei 37°C aufbewahrt, bei einem CO₂- Gehalt von 5%. Alle drei Tage wird das Medium erneuert. Dies geschieht unter einer sterilen Sicherheitswerkbank. Das verbrauchte Medium wird bis auf einen kleinen Rest aus der Flasche abgesaugt. Dieser Rest ist für die Kontinuität der Zellkultur nötig. Dann werden 3ml frisches Medium dazu gegeben. Dabei ist auf eine schonende, schüttelfreie Behandlung der Zellen zu achten, um die Zelladhärenz nicht zu beeinträchtigen.

2.2.3. Passagieren der Zellkultur

Sobald durch das Wachstum der Zellen eine gewisse Zelldichte in der Kulturflasche erreicht wird, werden die Zellen passagiert. Dies geschieht in Abhängigkeit der eingesetzten Zellmenge und Zellcharakteristika etwa alle 7 Tage. Dazu wird unter dem sterilen Abzug das Medium abgesaugt und durch 2ml Trypsin-EDTA ersetzt. Danach wird für 10 min inkubiert. Dadurch lösen sich die Zellen von dem Boden der Kulturflasche und können anschließend in ein großes Zentrifugenröhrchen überführt werden. Anschließend werden 2ml Medium dazugegeben, um die Wirkung des Trypsins zu stoppen.

Das Zentrifugenröhrchen mit der Zellsuspension wird dann bei 10000 UPM zentrifugiert, um ein Zellpellet zu erhalten. Der Überstand aus dem Röhrchen wird erneut abgesaugt und wieder durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Darin wird das

Zellpellet resuspendiert. Von der so neu entstandenen Suspension wird 1ml entnommen und in eine neue Kulturflasche gegeben und weiter kultiviert.

2.2.4. Einfrieren der Zellen

Nicht benötigte Zellen können in einem Kryo-Gefäß eingefroren und so für spätere Versuche verwahrt werden.

2.3 Stimulation der drei Zelllinien mit Carbamazepin und Lamotrigin

2.3.1. Zielkonzentrationen von Lamotrigin und Carbamazepin

Die Stimulation aller drei Zelllinien erfolgt sowohl mit Lamotrigin als auch mit Carbamazepin.

Beide Wirkstoffe liegen als Reinsubstanz vor. Sie müssen in unterschiedlichen Medien aufgelöst werden:

Auf Grund seines lipophilen Charakters wird das Carbamazepin in Ethanol gelöst, bis eine Lösung von 100mmol/l entsteht. Diese kann dann mit dem Nährmedium für LNCaP/ PC 3 oder dem Medium für MCF 7 auf Konzentrationen von 2mmol/l, 1mmol/l und 0,1mmol/l verdünnt werden.

Etwas anders verhält sich dies beim Lamotrigin: Es ist stark hydrophob und wird deshalb in DMSO gelöst. Auch hier wird eine Konzentration von 100mmol/l erreicht, die dann ebenfalls durch die entsprechenden Nährmedien auf Konzentrationen von 1mmol/l, 0,5mmol/l und 0,1mmol/l verdünnt wird.

2.3.2. Stimulation und Zellgewinnung

Die Zelllinien der LNCaP, der PC 3 und der MCF 7 werden mit verschiedenen Konzentrationen des Carbamazepins und des Lamotrigins stimuliert. Zudem wird jeweils eine Kontrolle mit Ethanol- bzw. DMSO versetztem Medium durchgeführt. Die Stimulation erfolgt für exakt 24 Stunden.

Zur Vorbereitung der Stimulation geht man zunächst wie in Punkt 2.2.3. beschrieben vor. Während normalerweise die gewonnene Suspension wieder zurück in eine Kulturflasche gefüllt wird, entnimmt man zunächst mit einer Pipette eine kleine Menge und gibt sie auf eine Neubauer-Zählkammer. So erreicht man eine annähernd gleiche Anzahl Zellen in jeder Kammer einer Sechs-Well-Platte. Hat man die Anzahl Zellen pro ml Zellsuspension berechnet, werden pro Napf 200000 Zellen in die Sechs-Well-Platte gegeben. Anschließend wird die Platte für 24 Stunden zurück in den Brutschrank gegeben, damit die Zellen auf dem Boden der Platte anwachsen können.

Nach dieser Zeit beginnt die eigentliche Stimulation: Das Medium in den Nöpfen der Platten wird abgesaugt und durch Medium ersetzt, das die entsprechenden Konzentrationen des Carbamazepins (2mmol/l, 1mmol/l, und 0,1mmol/l) oder des Lamotrigins (1mmol/l, 0,5mmol/l, 0,1mmol/l) enthält. Zusätzlich wird jeweils ein Napf mit Medium und der höchsten Konzentration des jeweiligen Lösungsmittels als Kontrolle befüllt.

Daraufhin wird die Platte wiederum für 24 Stunden zurück in den Brutschrank gegeben.

Nach Beendigung der Stimulation entnimmt man die Überstände der Sechs-Well-Platten der LNCaP-Stimulation zur PSA-Bestimmung (siehe 2.4.). Die zurückbleibenden Zellen sind jetzt bereit zur RNA-Extraktion.

2.4. PSA-Sekretion

Aus den Überständen der stimulierten LNCaP-Zelllinien wird mit Hilfe des Elecsys Systems 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) die PSA-Sekretion bestimmt.

2.5. Zellproliferations- und Vitalitätstest

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wird nach der Stimulation ein AlamarBlue-Test durchgeführt. Da durch metabolische Aktivität ein reduktives Milieu aufrechterhalten wird, kann der im AlamarBlue-Test enthaltene RedOx-Indikator in seine reduzierte fluoreszierende Form überführt werden. Durch Bestimmung der Fluoreszenz bei 570nm können Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen gewonnen werden.

Mit einem Zellproliferationstest Elisa (BrdU-Test) kann das Maß der Zellproliferation bestimmt werden. Bei dem BrdU handelt es sich um ein Pyrimidin-Analogon, das anstelle des Thymidins in die DNA eingebaut wird. Die DNA wird denaturiert und ein spezieller Antikörper, der eine Peroxidase enthält, gegen das BrdU dazugegeben. Nachdem sich der Antikörper an das BrdU angelagert hat, wird der blaue Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB) dazugegeben. Im nächsten Schritt erfolgt die Umwandlung des blauen Farbstoffs durch die Peroxidase des Antikörperkomplexes. Durch 1molare Schwefelsäure wird ein Farbumschlag in Richtung gelb erreicht. Die photometrische Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die entstehende Farbtintensität korreliert mit der Anzahl proliferierender Zellen.

2.6. RNA-Extraktion

2.6.1 Vermeidung von RNA-Degeneration

Da RNA ständig durch RNAasen gefährdet ist, muss stets darauf geachtet werden, die Proben nicht zu kontaminieren. Deswegen werden bei der Arbeit Latexhandschuhe getragen und es wird ausschließlich autoklaviertes oder RNAase-freies Material benutzt. Zudem sind alle Gefäße nach Möglichkeit immer zu schließen und kühl zwischenzulagern. Die mittelfristige Lagerung erfolgt bei -20°C. Es soll auf zügige Arbeitsweise geachtet werden. Die RNA-Extraktion wird bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.6.2. Prinzip der RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wird unter Verwendung des Zymo Research Mini RNA Isolation II Kit durchgeführt. Durch das RNA-Extraktionsverfahren kann RNA aus Zellen gewonnen werden. Dazu werden die selektiven Bindungseigenschaften einer mit Silikangel beschichteten Membran mit der Microspin-Technologie kombiniert. Es ist möglich, bis zu 100µg RNA mit einer Transkriptionsgröße oberhalb von 200 Nucleotiden an die Silikangel-Membran zu binden. Dadurch reichert man RNA oberhalb einer Größe von 200 Nucleotiden an; kleinere RNA, insbesondere 5.8S rRNA, 5S rRNA und tRNA, die zusammen etwa 15- 20 % der RNA ausmachen, werden zusammen mit Proteinen und weiterem Zelllysate abgetrennt.

Beim RNeasy-Verfahren werden die Zellen zunächst lysiert und homogenisiert, anschließend mit einem Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffer behandelt. Auf diese Weise wird eine Denaturierung erreicht, gleichzeitig werden alle RNAsen inaktiviert, wodurch eine Isolation intakter RNA gewährleistet wird. Durch den Einsatz von Ethanol in einem weiteren Schritt werden optimale Bindungsvoraussetzungen für die Säulen geschaffen. Dann wird die Probe auf eine Zymo-Spin Column mit Collection Tube gegeben, an die die RNA gebunden wird und restliche Zellbestandteile ausgewaschen werden. Die letztendlich erhaltene RNA wird mit 30µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Bindungskapazität der Silikangel-Membran für RNA sollte nicht überschritten werden, weswegen eine definierte Zellmenge (siehe 2.3.2.) einzusetzen ist.

2.6.3. Protokoll zur RNA- Extraktion

Benutzt wird das Mini RNA Isolation II Kit (Zymo Research) bestehend aus:

- Zymo-Spin Column mit Collection Tube
- Eppendorfgefäße 1,5ml und 2ml
- Wasch-Puffer RL1
- Hochsalz Puffer RW 1
- Puffer RPE
- RNAase freies Wasser.

Außerdem werden benötigt:

- Mercaptoethanol
- 96- 100 % Ethanol (zur Ergänzung des RPE Puffers)
- 70%Ethanol
- Zentrifuge.

Arbeitsschritte:

1. Ernte der Zellen

Die Zellen in den Näpfen sind, wie in 2.3.2. beschrieben, frei von Medium und Medikament. Dies ist wichtig, da nur so optimale Bedingungen für den Lyse- und Homogenisierungsvorgang geschaffen werden.

2. Lyse

Der ZR-RNA-Puffer wird komplettiert und dann pro Napf 600µl fertiger Puffer über die Zellen gegeben. Durch diesen Schritt lösen sich die Zellen vom Boden des Wells, es kommt zur Lyse der Plasmamembranen und der Organellen der Zellen, die gesamte in den Zellen befindliche RNA wird freigegeben.

3. Zentrifugation der Probe

Die 600µl Probe aus jedem Well wird in eine Zymo-Spin Column pipettiert, welche dann auf einem 2ml Eppendorf-Gefäß platziert wird. Dann wird für 1min bei 10000 UPM zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Die Zymo-Spin Column wird für Schritt 4 aufgehoben.

4. Zugabe von RNA Wash Puffer

Ohne die Bindung der RNA zu gefährden, werden mit diesem Puffer Zellbestandteile ausgewaschen. Dazu gibt man 350µl RNA Wash Puffer auf die Säule und zentrifugiert erneut bei 10000UPM für eine Minute. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt.

5. Elution

Man überführt die Zymo-Spin Column auf ein frisches 1,5ml Eppendorf- Gefäß und pipettiert 30µl RNAase-freies Wasser direkt auf die Membran. Anschließend wird für eine Minute bei 10000 UPM zentrifugiert. Das Eluat wird bei -20°C gelagert. Alternativ kann die gewonnene RNA zur weiteren Arbeit auch kurzfristig auf Eis gelagert werden.

2.7. RNA- Quantifizierung mittels Agilent 2100 Bioanalyzer

2.7.1 Prinzip der RNA-Quantifizierung

Die Quantität und die Integrität der RNA wird mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 mit Hilfe des RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) festgestellt. Qualität und Konzentration geringer RNA Mengen (5ng) können bei einem Probeneinsatz von 1µl innerhalb von 30min bestimmt werden.

Um die Qualität der RNA-Proben zu bewerten, wird ein Fluoreszenzassay, das eine kapillar-elektrophoretische Auftrennung beinhaltet, genutzt. Jeder RNA-LabChip enthält ein miteinander verbundenes System von Mikrokanälen, durch das die Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe gesiebt und im Sinne der Elektrophorese aufgetrennt werden. Der Bioanalyzer misst die Fluoreszenz der RNA-Proben über die Zeit und zeichnet einen Graphen auf, das Elektropherogramm. Kleine Moleküle wandern schneller und erscheinen daher auf der linken Seite des Elektropherogramms. Zu jedem Ansatz erstellt die Software ein vom Elektropherogramm abgeleitetes Gel-Bild, das den Graphen ergänzt. Zudem berechnet das System automatisch das Verhältnis der ribosomalen Banden der RNA.

2.7.2. Protokoll zur RNA- Quantifizierung

RNA-6000-Nano-LabChip-Kit Bestandteile:

- RNA-Chips
- 2 Elektrodenreinigungschips

- Spritzenset
- Spinfilter
- RNA-6000-Dye-Konzentrat
- RNA-6000-Nano Marker
- RNA-Gel-Matrix.

Weiterhin benötigt man:

- Chip-Priming-Station
- RNA-6000-ladder zur Quantifizierung der RNA-Proben (Ambion)
- RNAase-ZAP zur Elektrodendekontamination
- RNAase-freie Pipettenspitzen
- RNAase-freie Zentrifugenröhrchen (0,5ml und 1,5ml)
- Zentrifuge
- Vortex (IKA).

Alle Reagenzien werden gekühlt bei 4°C gelagert. Der Dye-Mix muss vor Licht geschützt aufbewahrt werden, um ihn vor Zerfall zu schützen.

Arbeitschritte:

1. Dekontamination der Elektroden

Mit dem RNAase-ZAP wird der Reinigungschip befüllt und anschließend für eine Minute in den Agilent 2100 Bioanalyzer platziert. Danach wird der Chip mit RNAase-freiem Wasser befüllt und der Vorgang wiederholt. Dann lässt man das Wasser kurz vor den Elektroden verdampfen.

2. Vorbereiten des Gel-Dye-Mixes

Der Gel-Dye-Mix wird bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Vor dem Gebrauch muss er auf Raumtemperatur erwärmt werden. 400µl RNA-Gel Matrix wird in den Spin-Filter gegeben und bei 4000 UPM für 10 min zentrifugiert. 130µl der filtrierten RNA-Gel Matrix werden in einem 1,5ml Zentrifugenröhrchen mit 2µl RNA-Dye-Konzentrat supplementiert. Anschließend mischt man den Gel-Dye-Mix mit Hilfe des Vortex. Den

Mix kann man 1 Woche lagern, das gefilterte Gel muss innerhalb eines Monats verbraucht werden.

3. Vorbereitung des RNA-Nano-Chips

Ein RNA-Nano-Chip wird in die Priming Station eingelegt. 9µl des Gel-Dye-Mixes werden in die auf dem Chip markierte Vertiefung pipettiert. Um den RNA-Chip zu laden, wird mit Hilfe des Tauchkolbens der Priming Station für 30 Sekunden ein definierter Druck auf den Chip ausgeübt. Dann werden 9µl Dye-Mix in die anderen beiden gekennzeichneten Probenöffnungen verteilt.

Als nächstes werden je 5µl des RNA-Nano-Markers in die dafür vorgesehenen Öffnungen gegeben.

Im letzten Schritt der Vorbereitung wird 1µl RNA-6000-ladder in die mit der Leiter markierte Vertiefung gegeben.

4. Einfüllen der Proben

Jetzt kann jeweils 1µl der Proben in die entsprechenden zwölf Vertiefungen pipettiert werden. Nicht genutzte Vertiefungen müssen mit 1µl RNA-6000-Nano-Marker befüllt werden. Anschließend wird der Chip auf dem Vortex geschüttelt.

5. Messung des Chips im Agilent 2100 Bioanalyzer

Diese Analyse ermöglicht eine exakte Quantifizierung der RNA. Zudem ist es möglich, anhand des Elektropherogramms Integrität und Reinheit der RNA zu beurteilen.

2.7.3 Auswertung der Messungen

Das Elektropherogramm eines guten Laufes sollte folgende Kriterien aufweisen: zwei ribosomale Peaks bei gelungener RNA-Präparation sowie einen Marker-Peak (siehe Abbildung). Zudem sollte zwischen den ribosomalen Peaks lediglich eine niedrige Hintergrundfluoreszenz aufgetreten sein.

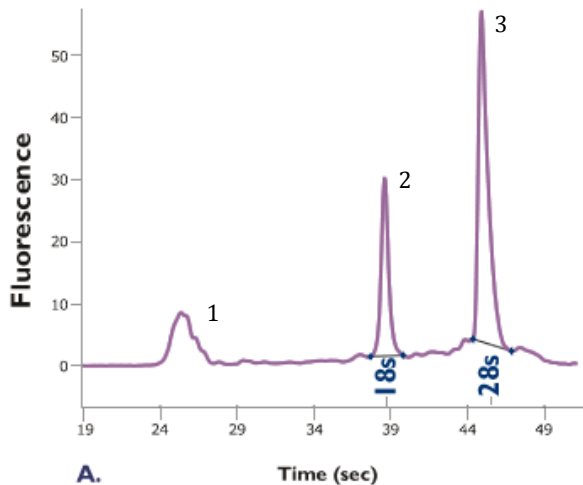


Abbildung 4: schematische Darstellung eines Elektropherogramms

1. Marker Peak
2. 18S- ribosomaler Peak
3. 28S- ribosomaler Peak

Zur Beurteilung der RNA kann man als weiteren Wert die rRNA-Ratio (28S/18S) heranziehen. Werte $> 1,7$ sprechen für eine intakte RNA.

Anhand der ermittelten RNA- Konzentration wird die cDNA-Synthese durchgeführt.

2.8. cDNA-Synthese

2.8.1. Prinzip der Reversen Transkription

Um die mRNA mittels Real-Time-PCR quantifizieren zu können, ist es notwendig, die RNA in cDNA umzuschreiben. Dazu wird das Omniscript RT Kit von QIAGEN benutzt. Da Zufallsprimer (Random Primer) verwendet werden, wird die komplette RNA der Probe einschließlich jeglicher rRNA, mRNA und tRNA umgeschrieben.

Das Umschreiben der RNA geschieht durch die Omniscript Reverse Transcriptase, einem Enzym, das mit hoher Affinität zur RNA einsträngige cDNA schreibt. Hierdurch kann selbst RNA mit komplexer Sekundärstruktur transkribiert werden, was nötig ist, da sonst kurze cDNA entsteht, die in der PCR womöglich nicht amplifiziert werden kann.

Die Reverse Transkriptase leitet sich in der Regel von RNA-haltigen Retro-Viren ab, z.B. dem HIV. Es ist ein multifunktionelles Enzym mit drei deutlichen Enzymaktivitäten: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine hybridabhängige Exoribinuclease (RNase H) und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Bei retroviralen Infektionen ermöglicht diese Kombination die Umschreibung einsträngiger Virus-RNA in doppelsträngige DNA. Bei der Reversen Transkription in vitro unter Verwendung des QIAGEN-Kits werden nur die ersten zwei Enzymaktivitäten genutzt, um einsträngige cDNA herzustellen. Die einzelnen Schritte der cDNA-Synthese sehen nun wie folgt aus:

1. Primeranlagerung: Der Zufallsprimer (Random-Primer) lagert sich an einer komplementären Stelle der RNA an.
2. Reverse Transkription: Die RNA-abhängige DNA-Polymerase lagert sich an den Primern an und polymerisiert die cDNA.
3. RNA-Degradation: Die Ribonuclease (RNase H) zerlegt an die DNA hybridisierte RNA, so dass ein einsträngiger cDNA-Strang übrigbleibt. Ungebundene RNA wird nicht degradiert.

2.8.2 Protokoll zur cDNA-Synthese

Alle Arbeiten werden mit Handschuhen und unter ausschließlicher Verwendung von RNAase freien Materialien durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -20°C. Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 20µl. Davon entfallen 5,8µl auf die Mastermixbestandteile. Die restlichen 14,2µl setzen sich aus RNA und gegebenenfalls Wasser zusammen.

Für die cDNA-Synthese werden genau 500ng RNA eingesetzt. Die zu pipettierenden RNA-Volumina berechnet man basierend auf den Werten der Agilent Messungen. Die zu ergänzende Wassermenge ergibt sich aus der Differenz.

Rechenbeispiel:

RNA-Konzentration 358ng/μl

500ng RNA sind einzusetzen.

$500\text{ng}/358\text{ng}/\mu\text{l} = 1,40\mu\text{l}$

Daraus folgt, dass 1,4μl der extrahierten RNA-Suspension 500ng RNA enthalten. Dementsprechend muss noch $14,2\mu\text{l} - 1,4\mu\text{l} = 12,8\mu\text{l}$ RNAase-freies Wasser ergänzt werden.

Nachfolgende Materialien sind für die cDNA-Synthese erforderlich:

- Omniscript RT Kit bestehend aus:
 - Omniscript Reverse Transcriptase
 - Puffer RT
 - dNTP-Mix
 - RNAase-freies Wasser

Außerdem benötigt man:

- RNAase-Inhibitor
- Random Primer

Der einfache Ansatz des Master- Mixes zur Transkription einer Probe setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 2μl RT-Puffer
- 2μl 5mM dNTPs
- 0,3 RNAase-Inhibitor (30U/μl)
- 0,5μl Random Primer (0,1μg/l)

= 5,8μl Master Mix

Arbeitsschritte:

1. Vorbereitung der RNA

Die zu entnehmende Menge RNA für jede Probe wird, wie oben gezeigt, berechnet und anschließend mit Wasser ergänzt. Dann werden die Proben in einen Thermocycler gegeben, wo sie bei 65°C denaturiert werden. Anschließend werden sie wieder auf 4°C heruntergekühlt.

2. Master-Mix

Der Master-Mix wird entsprechend der obigen Anleitung hergestellt. Dazu müssen die Komponenten bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Dann wird entsprechend der Probenzahl pipettiert, mit dem Vortex kurz durchgemischt und anschließend kurz zentrifugiert.

3. Supplementierung der RNA mit Master-Mix

Zu jeder Probe im Thermocycler werden 5,8µl Master-Mix pipettiert. Anschließend werden die Proben kurz auf dem Vortex durchmischt und danach herunterzentrifugiert.

4. cDNA-Synthese im Thermocycler

Die Proben werden im Thermocycler „Perkin Elmer Gene Amp 2400“ in cDNA umgeschrieben. Das Programm sieht wie folgt aus:

- 10 Minuten 25°C bei Ansätzen mit Random Primer
- 60 Minuten bei 37°C
- 5 Minuten bei 93°C
- danach: konstante Temperatur von 4°C bis zur Weiterverwendung

5. Verdünnung

Die fertige cDNA wird 1:5 verdünnt. Zu den 20µl Probe werden also 80µl Wasser ergänzt, so dass man 100µl mit gelöster cDNA bekommt.

6. Lagerung

Die cDNA wird bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt

2.9. PCR

2.9.1. Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde entwickelt, um einen definierten Teil eines DNA-Abschnittes zu vervielfältigen. Dabei handelt es sich meist um ein Gen oder den Teil eines Genes. Es können DNA-Abschnitte etwa bis zu einer Größe von 10000 Basenpaaren amplifiziert werden.

Die PCR lässt sich am besten in folgende drei Schritte aufgliedern:

1. Aufschmelzen in zwei Einzelstränge (Denaturierung)
2. Anlagerung der Primer (Annealing)
3. Primerverlängerung (Elongation)

Diese Schritte werden während einer PCR mehrfach wiederholt.

Bei der Denaturierung werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Doppelsträngen aufgetrennt, sodass Einzelstränge entstehen. Dies geschieht bei 90°C.

Der nächste Schritt ist die Anlagerung der Primer. Dazu werden Oligonucleotide aus etwa 15- 30 Basenpaaren, sogenannte Primer, dazugesetzt. Diese Primer sind spezifisch für ein bestimmtes Gen, das man zu amplifizieren wünscht. Sie sind jeweils komplementär zu den 5'- Enden bestimmter Regionen der Einzelstränge. Dementsprechend lagern sie sich einmal an den kodierenden Strang (sense (s)) bzw. hybridisieren den komplementären Strang (antisense(as)). Dieses Anlagern geschieht für jedes Primerpaar bei einer spezifischen Temperatur, der Annealing Temperatur. Diese wird anhand der Primerlänge und des Guanin- und Cytosin-Gehaltes ermittelt.

Bei der Elongation werden jetzt durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) diese Primer mit zugesetzten Nucleotiden in 5'- 3'- Richtung verlängert. Die Taq-Polymerase arbeitet nur bei einer Temperatur von

72°C, was sicherstellt, dass nur bei dieser Temperatur eine Amplifizierung der DNA stattfindet.

Durch das mehrfache Wiederholen der Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation kommt es zu einer exponentiellen Zunahme der gewünschten DNA-Abschnitte.

In der vorliegenden Arbeit wird die abgeleitete Methode der Real-Time-PCR angewendet. Sie ermöglicht die Detektion von PCR-Produkten in Echtzeit und ermöglicht zudem eine Quantifizierung von cDNA Zielsequenzen. Dazu macht man sich die Eigenschaften verschiedener fluoreszierender Chemikalien zunutze, deren Fluoreszenz mit der PCR-Produktkonzentration korreliert. Überschreitet die Fluoreszenz der Produkte erstmals die Hintergrundfluoreszenz, bezeichnet man diesen Zyklus als Threshold-Cycle (Schwellenzyklus). Das gesuchte cDNA-Fragment ist umso stärker vertreten, je eher dieser Threshold-Cycle überschritten wird (Löffler und Petrides, 1998).

2.9.2. Real-Time-PCR-Amplifikationsdiagramm

Alle Daten werden in einem Amplifikationsdiagramm gesammelt, bei dem die Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen wird. Es entsteht eine sigmoidal geformte Kurve, anhand welcher man zwischen 4 Phasen differenzieren kann:

1. die lineare Grundphase: Diese Phase ist der Beginn der PCR. Es gibt keinen Anstieg der Fluoreszenz. Dies wird als Base-Line bezeichnet.
2. die frühe exponentielle Phase: Die Fluoreszenzintensität steigt erstmal über die Hintergrundfluoreszenz.
3. die exponentielle Phase: In diesem Abschnitt erreicht die PCR ihre optimale Amplifikationsrate. Das PCR-Produkt verdoppelt sich nach jedem Zyklus, woraus ein exponentieller Anstieg resultiert.
4. die Plateau-Phase: Reaktionskomponenten stehen nur noch begrenzt zur Verfügung. Es macht keinen Sinn, die Fluoreszenzintensität zur Quantifizierung heranzuziehen, da die PCR Produktmenge am Ende der PCR nicht zwingend ein Maß für die Anfangsmenge sein muss.

An der Amplifikationskurve kann man die Emission des Fluoreszenzsignals in jedem Reaktionszyklus ablesen.

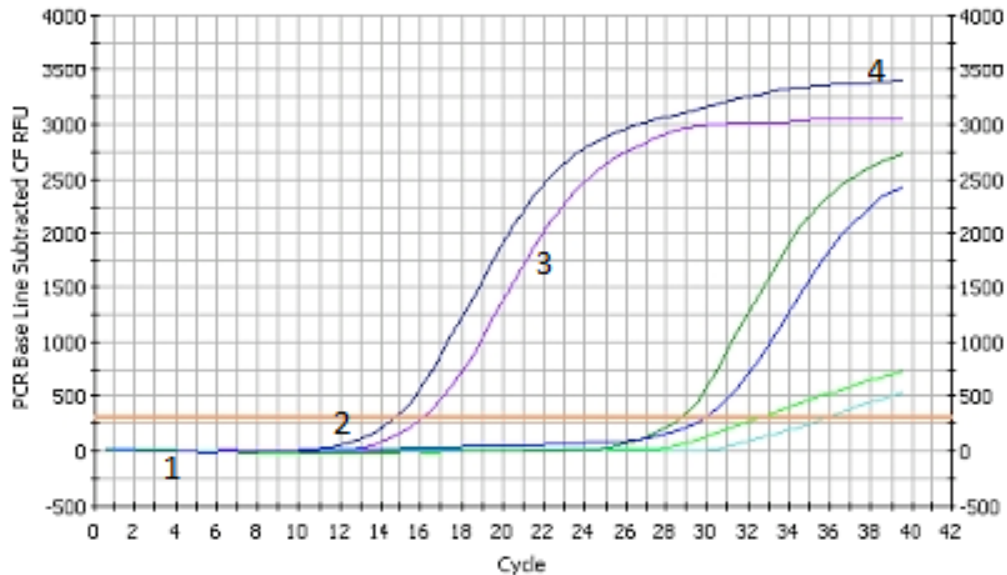


Abbildung 5: PCR Amplifikationsdiagramm mit Phasen der Amplifikation (1.- 4.)

Zur Auswertung der Daten ist es nötig, einen Schwellenzyklus (Threshold-Cycle) zu ermitteln. Dieser Wert kennzeichnet den Beginn der exponentiellen Amplifikation, d.h. den Kurvenanstieg über die Schwellenlinie. Der Punkt, an dem die Amplifikationskurve die Schwellenlinie schneidet und somit ein signifikanter Anstieg in der Fluoreszenzintensität erreicht wird, bezeichnet man als Schwellenwertzyklus (Threshold-Cycle). Die Schwelle entspricht dem zehnfachen Wert der zufälligen Hintergrundschwankung der Fluoreszenz. Dieser Wert wird zur Berechnung experimenteller Daten herangezogen (Wong und Medrano, 2005).

2.9.3. Thermocycler und iTaq DNA- Polymerase

Als Real-Time-PCR-Thermocycler wurde der iCycler iQ (BIORAD) verwendet. Dieses Gerät umfasst eine Kapazität von 96 Ansätzen und verfügt über eine optische Einheit, mit der Emissionen jeder einzelnen Probe in Echtzeit gemessen werden können. Verschiedene Farbstoffe, wie z.B. FAM, ROX oder SYBR Green, können erfasst werden.

Als thermostabile DNA-Polymerase wird die „RT-SN2X-03-Polymerase mit fluorescin“ von Eurogentec eingesetzt. Wie schon erwähnt, ist diese nur bei Temperaturen von 72°C aktiv.

2.9.4. SYBR Green- Farbstoff zur unspezifischen Detektion

Durch den unspezifisch interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green ist es möglich, Zielsequenzen ohne aufwändige genspezifische Sonden zu analysieren. SYBR- Green bindet an alle doppelsträngigen DNA- Moleküle und emittiert nach der Bindung auf Grund eines interkalierenden Farbstoffes ein Fluoreszenzsignal einer bestimmten Wellenlänge (Exzitations- und Emissionsaxima bei 494 und 521nm). Dies geschieht ebenfalls während der Verlängerungsschritte der PCR. Die Signalintensität steigt mit zunehmender Zykluszahl durch Akkumulation der PCR-Produkte. Der Nachteil der SYBR-Green Methode ist, dass auch unspezifische PCR-Produkte und Primer-Dimere zur Signalgebung beisteuern können. Dieser Nachteil wird aber kompensiert durch eine Schmelzkurvenanalyse. Die Reaktion wird langsam von 55°C auf 94°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich aufgezeichnet. Den Schmelzpunkt der doppelsträngigen DNA erkennt man daran, dass es zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals kommt, da SYBR Green dissoziiert.

Anhand der Schmelzkurve lassen sich somit spezifische und unspezifische PCR-Produkte unterscheiden. Unterschiedlich lange Produkte und Produkte mit unterschiedlichen Sequenzen (Cytosin- und Guanin-Gehalt) schmelzen bei verschiedenen Temperaturen. Sie können als deutliche Gipfel registriert werden, wenn man den ersten Fluoreszenzabfall gegen die Temperatur aufträgt. Wenn die PCR optimal gelaufen ist, erhält man eine Schmelzkurve mit nur einem Peak, der das spezifische Produkt entsprechend der Primerauswahl darstellt. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, eindeutig sequenzspezifische Primer zu benutzen, um sicherzustellen, nur ein spezifisches Produkt zu erhalten. Das Vorliegen des spezifischen Produktes muss durch Gel-Elektrophorese bestätigt werden.

2.9.5. Primer

Die Primer sollen sich während des Anlagerungs-Schrittes sequenzspezifisch an die Matrize anlagern. Bedingt durch die hohe Ausgangskonzentration von Primern oder eventuell zu niedriger Anlagerungstemperatur können sie sich auch an nicht-komplementäre Sequenzen binden oder Primer- Dimere bilden.

Um dies zu vermeiden, ist es wichtig, das Primerdesign auf diese Fehlermöglichkeiten abzustimmen. Die Primerlänge sollte 18- 30 Nucleotide betragen und einen Guanin-Cytosin-Gehalt von idealerweise 40-60 % aufweisen. Komplementäre Sequenzen zwischen s- und as-Primern sollten wegen der Gefahr von Selbstanlagerungen vermieden werden. Der zu amplifizierende Abschnitt sollte möglichst nicht länger als 150 Basenpaare sein, um effiziente Ergebnisse zu erreichen.

Gen	s- Primer	as- Primer
ARP	5´-CGACCTGGAAGTCCAACACTAC-3	5´-ATC TGCTGCATCTCGTTG-3
ER B	Validated Primer von Qiagen	Bezeichnung: ILS_ESR2_1_sg
IGF BP 3	5´-GAACTTCTCCTCCGAGTCCAA-3	5´.GAGTTACACGACTTCAGGGTC-3
IGF 1 Rez	5´-CCGAAGGTCTGTGAGGAAGA-3	5´-AATTGGCGGATCTTCACGTAG-3
PSA	5´-TGAACCAGAGGAGTTCTTGAC-3	5´-CCCCAGAATCACCCGAGCAG-3

Tabelle 1: Genspezifische s- und as- Primer

2.9.6. Protokoll zur iQ SYBR Green Supermix PCR

Alle Pipettierschritte für die PCR werden in Laborbereichen durchgeführt, die nicht für DNA-Präparationen oder PCR-Produktanalysen genutzt werden.

Für die iQ SYBR Green Supermix PCR benötigt man:

- iQ SYBR Green Supermix
- s-Primer (genspezifisch)
- as-Primer (genspezifisch)
- autoklaviertes Wasser

Außerdem erforderlich:

- cDNA
- genspezifische Standards in seriellen Verdünnungen

Der Ansatz für eine Probe setzt sich wie folgt zusammen:

- 10µl iQ SYBR Green Supermix
- 0,2µl s-Primer
- 0,2µl as-Primer
- 4,6µl Wasser

Dazu werden 5µl cDNA der Standardverdünnung gegeben.

Die einzelnen Volumina der Standardverdünnung sind mit der Anzahl der Proben zu multiplizieren.

Arbeitsschritte:

1. Vorbereitung

Alle benötigten Materialien werden aus dem Gefrierschrank auf Eis aufgetaut. Danach wird durch den Vortex kurz gemischt und eventuelle Reste am Gefäßrand herunterzentrifugiert.

2. Komplementierung des SYBR Green Supermix

Der Supermix wird nach dem obigen Schema in ein dunkles Eppendorf- Gefäß pipettiert. Dadurch wird der Farbstoff geschützt. Nach dem Vortex wird kurz zentrifugiert.

3. Supplementierung mit cDNA

15µl des fertigen Supermixes werden in jedes PCR- Gefäß gegeben. Dazu werden 5µl der jeweiligen cDNA pipettiert.

4. Negativkontrolle

Zur Kontrolle wird ein weiterer Ansatz mit 15µl Supermix und 5µl Wasser angesetzt.

5. Zentrifugieren

Die fertig pipettierten Proben werden nun bei 1500 UPM für 5 Minuten zentrifugiert.

6. Positionierung im Thermocycler

Alle Eppendorf-Gefäße werden zum Schutz vor Verdunstung mit einer thermosensiblen und lichtdurchlässigen Folie überzogen. Dann erfolgt die Positionierung im iCycler

2.9.7. iCycler iQ-Programm

Im iCycler laufen folgende Schritte ab:

Zyklus 1 (1x):

- 95°C für 15 Minuten Aktivierung der iTaq DNA-Polymerase

Zyklus 2 (50x):

- 95°C für 30 Sekunden Denaturierung
- 52-72°C für 30 Sekunden Primerspezifisches Annealing
- 72°C für 30 Sekunden Extension/ Elongation

Zyklus 3 (80x):

- beginnend bei 55° Schmelzkurvenanalyse
Temperaturerhöhung um 0,5°C für
10 Sekunden bei jedem Zyklus

Primer	Annealingtemperatur (°C)
ARP	59°C
ER β	55°C
IGF BP 3	62°C
IGF 1 Rezeptor	61°C
PSA	61°C

Tabelle 2: Annealingtemperaturen

2.9.8. Auswertung des PCR-Laufes

Die Datenanalyse wird mit Hilfe der iCycler iQ real time detection software (BIORAD) durchgeführt. Zur Erstellung von Standardkurven und Berechnung von Nukleinsäurekonzentrationen wird Microsoft Excel benutzt. Zur Gestaltung von Graphen und zur Durchführung statistischer Analysen kommt das Programm GraphPad Prism 3.0 zur Anwendung. Dabei wird mit dem ungepaarten t-Test gearbeitet. Das Konfidenzintervall beträgt 95%. Als signifikant gelten Ergebnisse mit $p < 0,05$.

2.9.9. Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Standardkurve

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression bedient man sich des Schwellenwertzyklus als Messwert. Dies ist der Punkt, an dem die Fluoreszenzintensität erstmals signifikant über den Schwellenwert ansteigt und die Amplifikationskurve in die exponentielle Phase übergeht. Je stärker die jeweilige Gensequenz initial vorhanden war, desto eher wird der Threshold-Cycle erreicht. Indem man die Threshold-Cycles verschiedener Proben vergleicht, kann man eine Aussage darüber treffen, ob ein Gen stark oder schwach exprimiert ist bzw. ob es hoch- oder runterreguliert wurde.

Zur Quantifizierung werden genspezifische Standards benutzt. Mit Hilfe einer Verdünnungsserie aus fünf Standards bekannter Konzentrationen wird eine Standardkurve erstellt. Diese Standardkurve zeigt eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen Threshold-Cycle und dem Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge. Um die Validität der Kurve sicherzustellen und von einer PCR-Effizienz von 100% auszugehen, muss die Steigung -3,3 bis -3,8 betragen.

Zur Erstellung einer Standardkurve trägt man den Threshold-Cycle der Standards gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentration an Standards auf.

Man erhält eine Gerade, anhand der man die unbekannte Konzentration einer amplifizierten Gensequenz bestimmen kann.

Dazu wird der Threshold-Cycle der unbekannt Probe auf der Standardkurve aufgetragen und entsprechend der Gleichung:

$(C_T - \text{Abschnitt}) / \text{Steigung}$

der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt. Um letztendlich zur Ausgangskonzentration der unbekannt Probe zu gelangen, bedient man sich der Formel:

$$10^{\log \text{Konz}}$$

Die einzelnen Rechenschritte werden bei den eigentlichen Versuchen in einer Excel-Tabelle mit entsprechendem Algorithmus berechnet, in die lediglich die Threshold Cyclen eingetragen werden müssen.

2.9.10. Endogenes Referenzgen ARP

Zur Kontrolle der Expressionsdaten und auch zur Verifizierung der Vitalität der Zellen wird ein endogenes Referenzgen mitbestimmt. Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes „Housekeeping-Gen“, das unabhängig der eingesetzten Konzentration des Wirkstoffes in seiner Expression nicht signifikant verändert werden sollte. Dadurch wird sichergestellt, dass Veränderungen in der Expression anderer Gene nicht auf Schädigungen der Zellen durch den Wirkstoff hervorgerufen werden.

In dieser Arbeit wurde das Gen ARP, das ein Strukturprotein von Zellen kodiert, als endogenes Referenzgen gewählt.

2.10. Zusammenfassung Material und Methoden

Die Zelllinien der LNCaP, PC 3 und der MCF 7 wurden kultiviert und im Folgenden mit den Histondeacetylaseinhibitoren Carbamazepin und Lamotrigin stimuliert. Anschließend erfolgte die Isolation der RNA aus den stimulierten Zellen. Diese wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyser quantifiziert. Dann wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit der real-time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) untersucht. Dadurch sollen Rückschlüsse auf Expressionsveränderungen der Zellen geschlossen werden. Des Weiteren erfolgte ein Zellproliferations- und Vitalitätstest.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der RNA-Quantifizierung

Die gesamt-RNA-Quantifizierung wurde mittels Agilent Bioanalyzer 2100 durchgeführt. Alle Elektropherogramme zeigten zwei klare ribosomale Peaks (28S und 18S rRNA) (Abbildung 4). Dies spricht für eine gute RNA-Integrität.

In der nachfolgenden Tabelle sind die durch den Agilent-Bioanalyzer 2100 gemessenen RNA-Konzentrationen für einen kompletten Versuch aufgeführt:

Stimulation mit Carbamazepin	RNA-Konzentration (ng/ml)
LNCaP EtOH	368
LNCaP 0,1mM	235
LNCaP 1mM	231
LNCaP 2mM	292
PC 3 EtOH	286
PC 3 0,1mM	431
PC 3 1mM	471
PC 3 2mM	171
MCF 7 EtOH	290
MCF 7 0,1mM	250
MCF 7 1mM	276
MCF 7 2mM	215

Tabelle 3: RNA-Konzentrationen nach Carbamazepin-Stimulationen

Stimulation mit Lamotrigin	RNA-Konzentration (ng/ml)
LNCaP DMSO	375
LNCaP 0,1mM	368
LNCaP 0,5mM	289
LNCaP 1mM	259
PC 3 DMSO	455
PC 3 0,1mM	437
PC 3 0,5mM	369
PC 3 1mM	311
MCF 7 DMSO	352
MCF 7 0,1mM	300
MCF 7 0,5mM	289
MCF 7 1mM	249

Tabelle 4: RNA-Konzentrationen nach Lamotrigin-Stimulation

3.2. Zellvitalität und Proliferation nach Stimulation mit Carbamazepin

3.2.1. Zellvitalität

Die Vitalität der LNCaP und der PC 3 wurden mit Hilfe des AlamarBlue-Tests nachgewiesen. Es zeigt sich, dass die höchste Carbamazepin- bzw. Lamotrigin-Dosis den größten Effekt hat.

LNCaP:

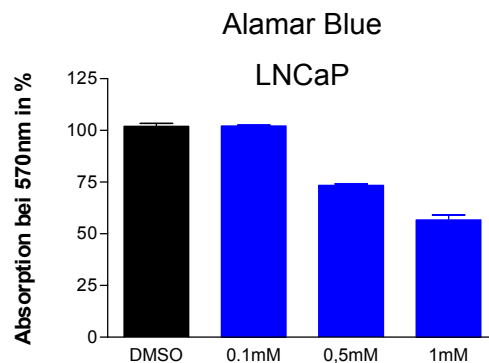
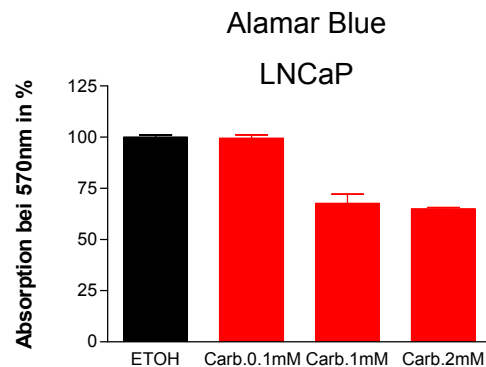


Abbildung 6 und 7: AlamarBlue LNCaP

Beim Carbamazepin reduzierte sich die Vitalität bei 2mM um 35% in Bezug auf die Ethanolkontrolle (Vergleich der Mittelwerte). Die Veränderungen der Vitalität bei Dosierungen von 1mM und 2mM sind nicht signifikant. Ebenso kann hier die Dosierung von 0,1mM noch keinen signifikanten Rückgang in der Vitalität erreichen.

Beim Lamotrigin lässt sich beobachten, dass unter der 1molaren Dosierung eine Reduktion der Vitalität um 45% ($p < 0,05$) eintritt. Beim Lamotrigin ist auch keine Reduktion der Vitalität bei einer Dosierung von 0,1mM zu verzeichnen, die Veränderungen der Vitalität nach Steigerung der Dosis von 0,5mM zu 1mM sind hingegen mit 16% signifikant.

PC 3:

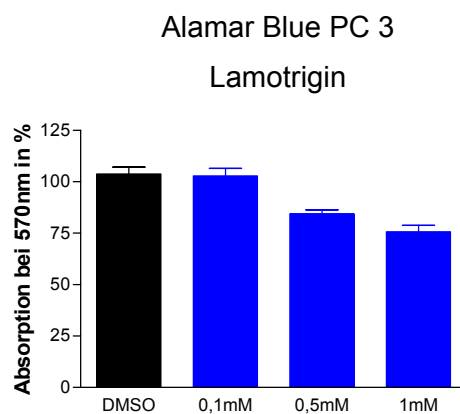
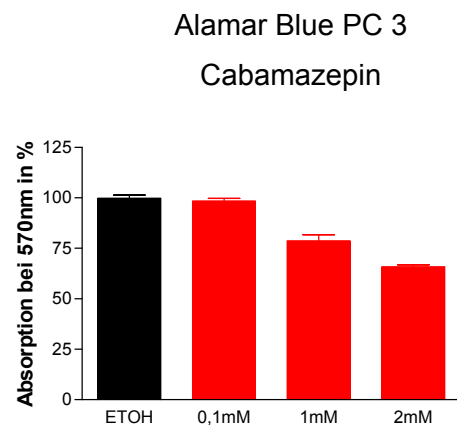


Abbildung 8 und 9: AlamarBlue PC3

Auch auf die PC 3 haben das Carbamazepin und das Lamotrigin einen Effekt auf die Vitalität.

Carbamazepin

Der maximale Rückgang beträgt 35% zu der Ethanolkontrolle (Dosierung: 2mM). Ebenfalls beobachtet man einen signifikanten Abfall der Vitalität bei Steigerung der

Dosis von 1mM auf 2mM ($p < 0,05$). Die Reduktion beträgt 12%. Wie bei der LNCaP bleibt auch hier die Konzentration von 0,1mM ohne signifikanten Effekt.

Lamotrigin

Bei maximaler Lamotrigin Dosierung (1mM) beobachtet man einen Rückgang von 25% zwischen der höchsten Lamotrigin Dosierung und der DMSO Kontrolle. Zwischen der 0,5mM und 1mM Dosierung gibt es eine Reduktion um 9% ($p < 0,05$). Die Dosierung von 0,1mM zeigt noch keinen Effekt.

3.2.2. Proliferationstest

Zur Bestimmung der Proliferation wurde der BrdU-Test bei den Zellen der LNCaP und der PC 3 angewendet. Eine Verringerung der Proliferation ist ein Hinweis darauf, dass das Wachstum der Zellen verringert wurde.

LNCaP:

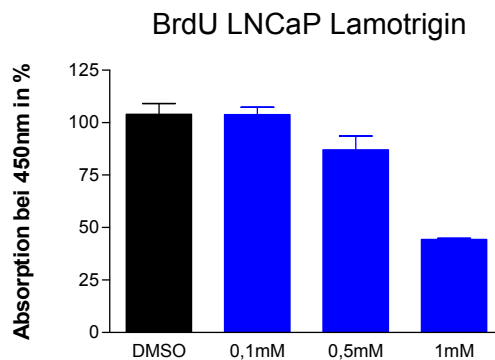
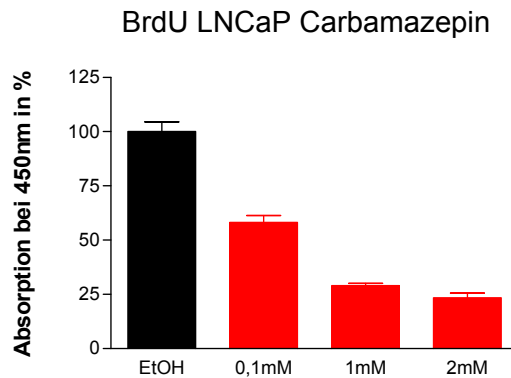


Abbildung 10 und 11: BrdU LNCaP

Carbamazepin

Die Proliferation der LNCaP verringert sich bereits ab einer Carbamazepin- Dosis von 0,1mM um 42% ($p < 0,05$) in Bezug auf die Ethanolkontrolle. Ebenso verringert sich die Proliferation bei 1mM und 2mM um 71% bzw. 76%. Die Reduktion zwischen 1mM und 2mM beträgt 5% und ist ebenfalls signifikant im 95% Konfidenzintervall.

Lamotrigin

Die maximale Proliferations-Reduktion verzeichnet man bei 1mM (56%). Zwischen der DMSO-Kontrolle und 0,1mM gibt es keine signifikante Proliferations-Reduktion. Bei einer Dosierung von 0,5mM erreicht man eine Proliferations-Reduktion von 13%.

PC 3:

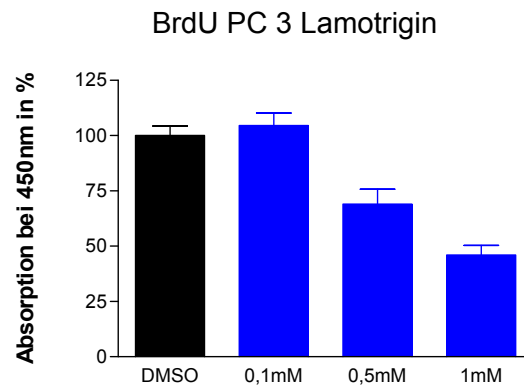
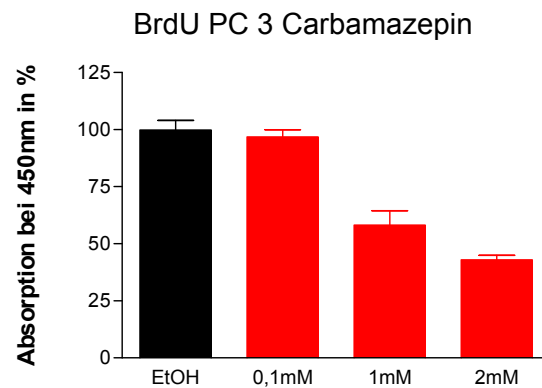


Abbildung 12 und 13: BrdU PC 3

Carbamazepin

Bei der PC 3 wird eine Reduktion der Proliferation zwischen Kontrolle und maximaler Carbamazepin-Dosierung um 56% ($p < 0,05$) gesehen. Zwischen Kontrolle und 1mM Carbamazepin verringert sich die Proliferation um 41% ($p < 0,05$). Ohne signifikanten Effekt bleibt die Dosierung von 0,1mM.

Lamotrigin

Die Proliferationsreduktion zwischen DMSO-Kontrolle und 1mM beträgt 54%. Zwischen DMSO-Kontrolle und 0,5mM ist ein Rückgang von 31% zu beobachten. Ohne signifikanten Effekt bleibt die Dosierung von 0,1mM.

3.3. Veränderungen der Genexpression nach Stimulation mit Carbamazepin und Lamotrigin in LNCaP, PC 3 und MCF 7

Bei der MCF 7 handelt es sich um eine humane Mammakarzinomzelllinie. Es wird deshalb hier im Rahmen einer urologischen Arbeit zum Prostatakarzinom lediglich der ER β in der MCF 7 untersucht.

3.3.1. Expression von ARP

Zur Kontrolle der endogenen Funktion wird das Housekeeping- Gen ARP mitbestimmt. Seine Expression verändert sich im Verlauf der Experimente bei verschiedenen Dosierungen nicht signifikant. Die gefundenen Schwankungen werden bei der Diskussion der Ergebnisse mit einkalkuliert. Es kann davon ausgegangen werden, dass es nicht zu einer generellen Schädigung des mRNA-Synthese-Apparates gekommen ist.

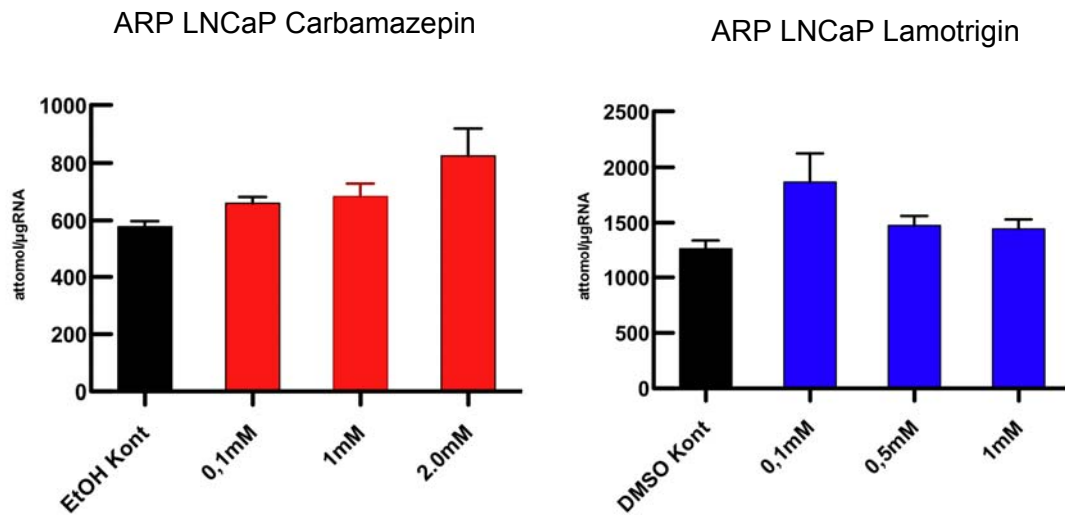


Abbildung 14 und 15: ARP LNCaP, keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression

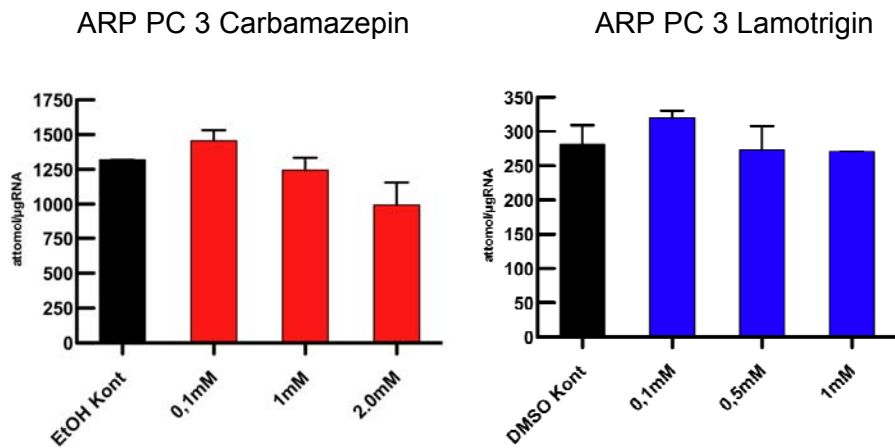


Abbildung 16 und 17: ARP PC3 keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression

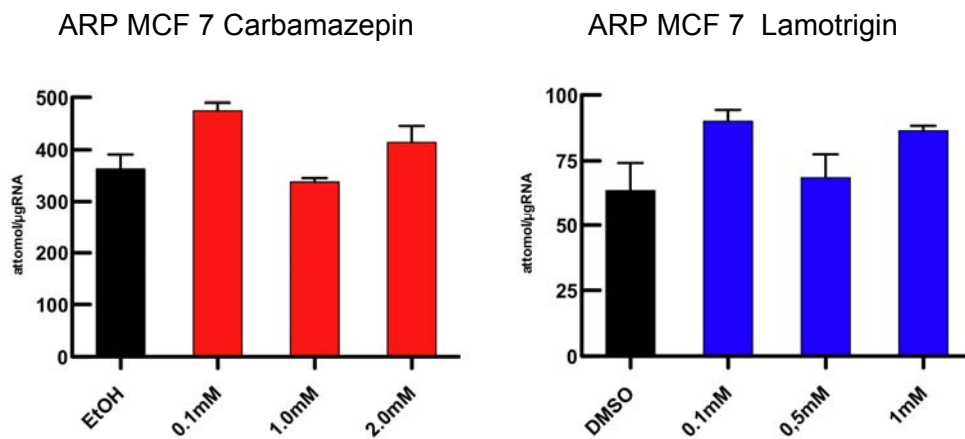


Abbildung 18 und 19: ARP MCF 7, ebenfalls keine Veränderungen in der mRNA-Expression

3.3.2. Expression des ER β in LNCaP, PC 3 und MCF 7

Die Behandlung von LNCaP, PC 3 und MCF 7 hat einen Effekt auf die Expression des ER β . Durch die Stimulation mit Carbamazepin bzw. Lamotrigin kann in zwei der drei Zelllinien eine Zunahme der Expression des Östrogenrezeptors beobachtet werden.

LNCaP:

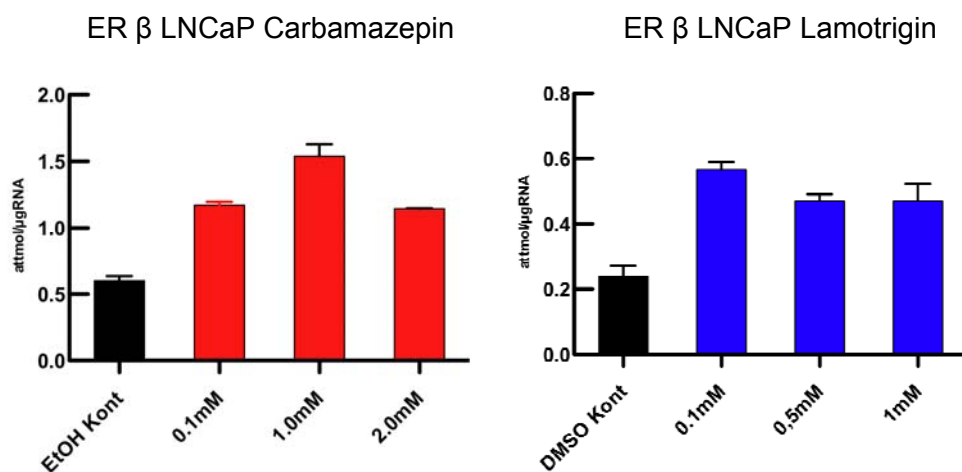


Abbildung 20 und 21:

Carbamazepin:

Bei allen Dosierungen ist eine hoch-signifikante Zunahme ($p < 0,01$) der Expression des ER β zu beobachten. Die größte Steigerung findet man bei einer Dosierung von 1mM um Faktor 2,5.

Lamotrigin:

Die Behandlung mit Lamotrigin führt zu einem maximalen Anstieg um Faktor 2,3 der mRNA-Konzentration bei einer Konzentration von 0,1mM. Zwischen den einzelnen Dosierungen gibt es keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression.

PC 3:

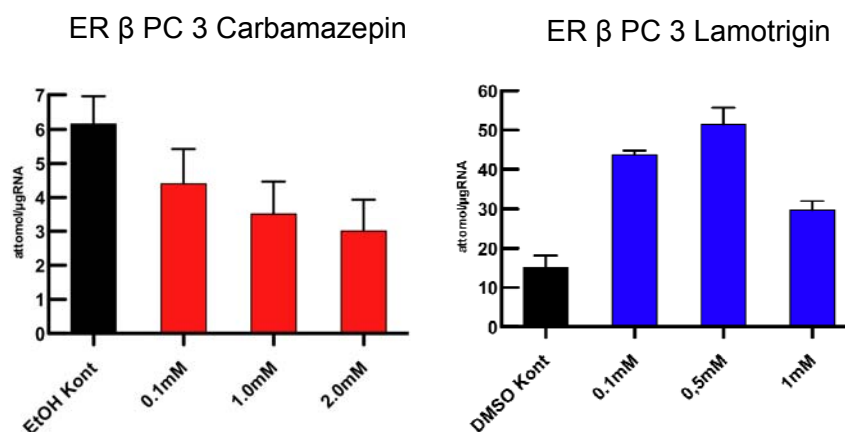


Abbildung 22 und 23:

Carbamazepin:

Hier zeigt sich kein signifikanter Effekt des Carbamazepins auf die Expression des ER β . Die Abwärtstendenz der Expression mit zunehmender Konzentration ist auf Grund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant.

Lamotrigin:

Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression in allen drei Dosierungen. Den größten Effekt beobachtet man bei einer Dosierung von 0,5mM mit einem Zuwachs um Faktor 3,4. Der Effekt verringert sich bei 1mM wieder und ist mit einem Anstieg um Faktor 1,9 aber immer noch hoch signifikant ($p < 0,01$).

MCF 7:

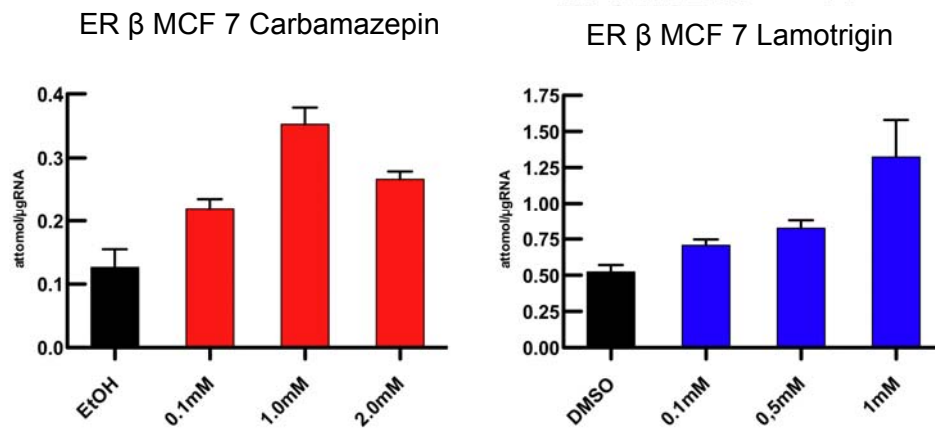


Abbildung 24 und 25:

Carbamazepin:

Hier zeigt sich wie bei der LNCaP eine deutliche Zunahme in der Expression des ER β. Die deutlichste Steigerung findet sich mit Faktor 2,7 abermals bei einer Dosierung von 1mM. Auch hier fällt wiederum ein leichter Abfall der Expression bei 2mM auf.

Lamotrigin:

Den größten Einfluss auf die Expression der ER β mRNA hat die höchste Dosierung. Der Zuwachs der mRNA-Expression beträgt Faktor 2,5. Der Unterschied in der Expression zwischen den Konzentrationen von 0,1mM und 0,5mM ist nicht signifikant, sodass lediglich die Verdopplung der Dosis auf 1mM einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression bringen konnte.

3.3.3. Vergleich der mRNA-Expression und der Sekretion von PSA

Durch die Real-Time-PCR wurde die Expression der mRNA der Serinprotease PSA, die auch als Prostatakarzinomindikator gilt, in der Zelllinie der LNCaP bestimmt (Abb. 26 und 28). Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Konzentration der Wirkstoffe Carbamazepin und Lamotrigin eine Herunterregulation der mRNA von PSA zu erreichen war. Die mRNA-Expression nahm bei der höchsten Carbamazepin-Dosis um ca. 2/3 ab. Bei der Lamotrigin Stimulation konnte sogar eine Verringerung um 90% beobachtet werden.

Die Sekretion von PSA wurde aus den Überständen der mit Carbamazepin und Lamotrigin stimulierten Zellen bestimmt. Die Sekretion ist auf 1000 Zellen bezogen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Elecsys Systems 2010. Die folgenden Tabellen sollen die Ergebnisse veranschaulichen:

LNCaP Carbamazepin	PSA-Sekretion (ng/ml)	Zellzahl/ml	PSA/ 1000 Zellen
EtOH	2,84	375000	7,57
0,1mM	1,03	205000	5,02
1mM	0,766	190000	4,08
2mM	0,437	172000	2,5

Tabelle 5: PSA-Sekretion nach Carbamazepin

LNCaP Lamotrigin	PSA-Sekretion (ng/ml)	Zellzahl/ml	PSA/ 1000 Zellen
DMSO	1,39	187000	7,43
0,1mM	2,12	235000	6,02
0,5mM	0,697	162000	4,3
1mM	0,449	195000	2,3

Tabelle 6: PSA-Sekretion nach Lamotrigin

Wie die Tabellen zeigen, kann auch eine deutliche Reduktion der Sekretion von PSA erreicht werden. Auch hier ist die Bestimmung des PSA nur in der Zelllinie der LNCaP sinnvoll, da die anderen Zelllinien dieses Enzym nicht sezernieren.

In den folgenden Abbildungen sind die Veränderungen der PSA mRNA-Synthese und der PSA-Sekretion graphisch dargestellt:

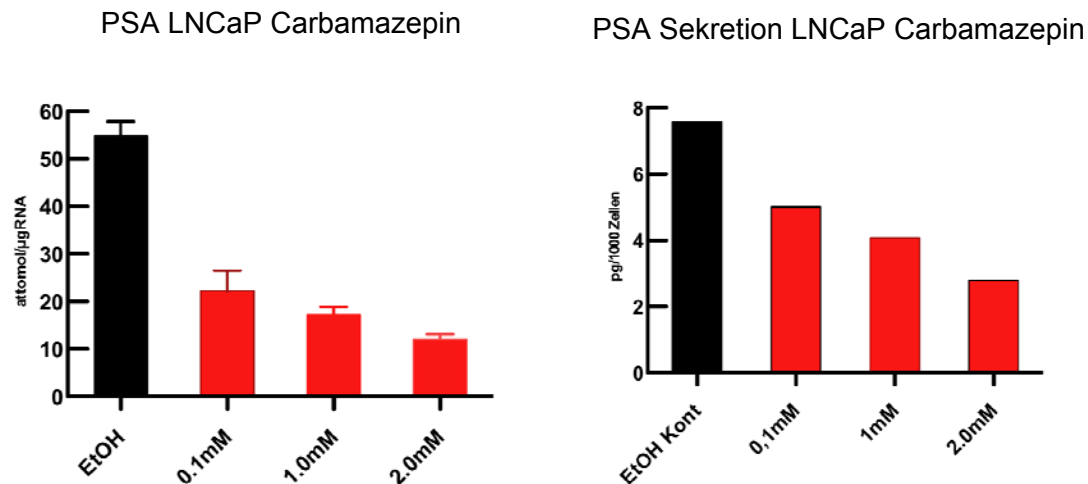


Abbildung 26 und 27: PSA mRNA-Expression und PSA-Sekretion nach Carbamazepin

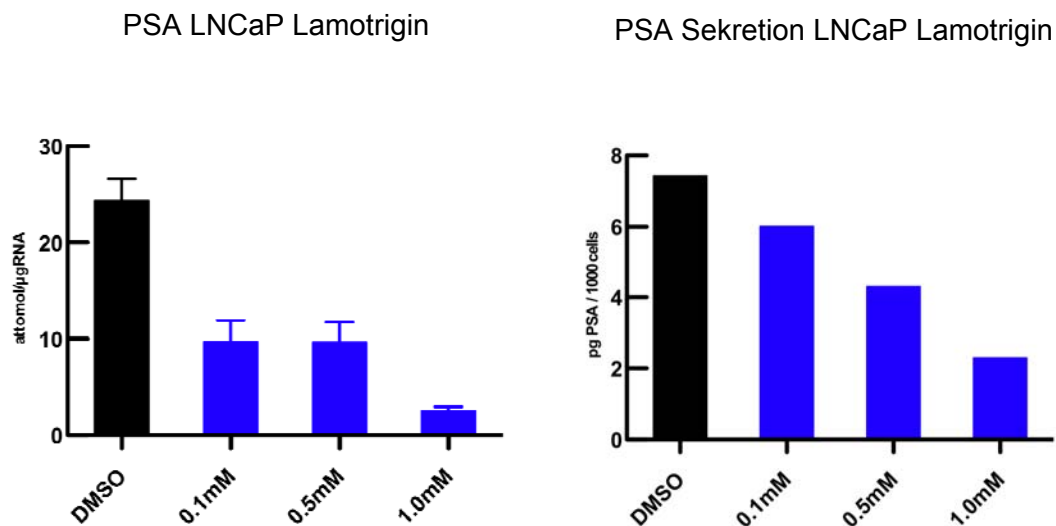


Abbildung 28 und 29: PSA mRNA-Expression und PSA-Sekretion nach Lamotrigin

Durch den direkten Vergleich wird ersichtlich, dass die mRNA-Expression und die Sekretion von PSA in gleicher Richtung abnehmen. Der stärkste Effekt wird sowohl beim Carbamazepin als auch beim Lamotrigin bei der höchsten Dosierung gesehen.

3.3.4. Komponenten des IGF-Systems

Carbamazepin:

Es konnte eine deutliche Beeinflussung in der mRNA-Expression in zwei Komponenten der IGF-Achse gefunden werden. Hierzu werden der IGF-1 Rezeptor und das hIGF-BP-3 dargestellt:

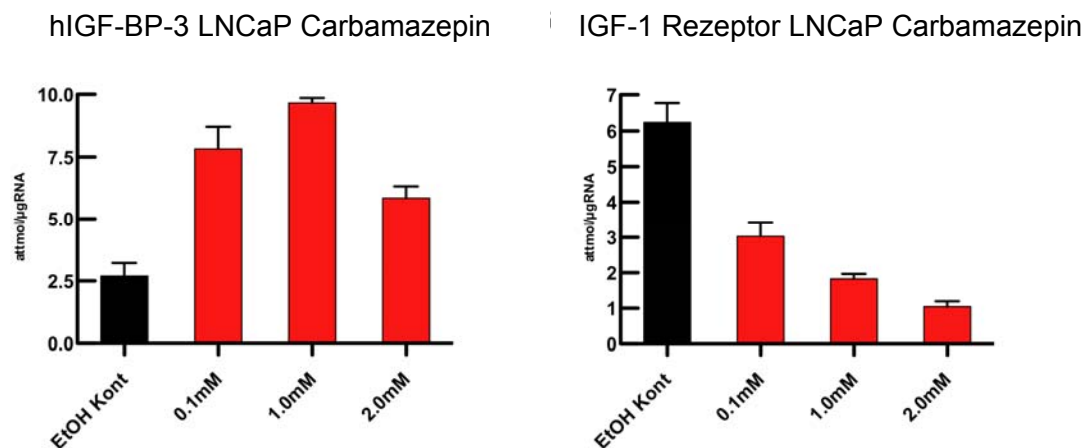


Abbildung 30 und 31 LNCaP:

Während sich bei dem protektiv wirkenden hIGF-BP-3 eine Zunahme der Expression bis auf das 4fache der Kontrolle zeigt, kann bei dem Wachstumsfaktor IGF-1 Rezeptor eine stetige Abnahme der Expression mit steigender Wirkstoffkonzentration gesehen werden. Bei 2mM hat sich die Expression um 84% verringert.

Anders verhält sich dies bei der PC 3:

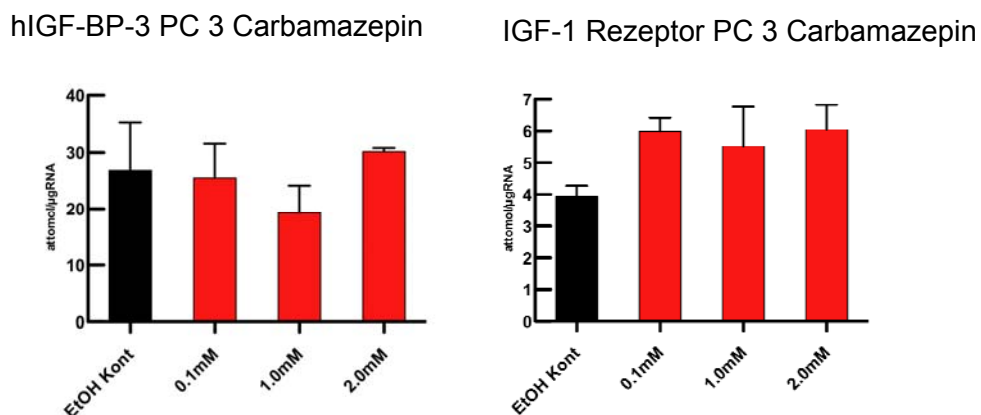


Abbildung 32 und 33 PC 3:

Hier lassen sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression zeigen. Die Schwankungen zeigen zwar bei dem IGF-1 Rezeptor eine Tendenz zur Expressionszunahme, sind aber auf Grund der großen Standardabweichungen nicht signifikant.

Lamotrigin:

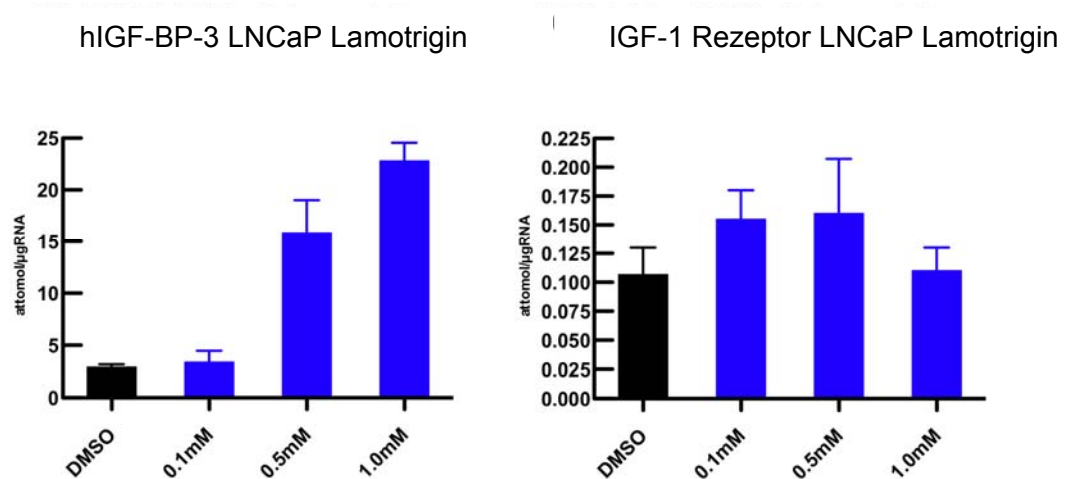


Abbildung 34 und 35 LNCaP:

Der Effekt auf die IGF-Achse der LNCaP beschränkt sich bei der Behandlung mit Lamotrigin auf das hIGF-BP-3. Hier lassen sich signifikante Zuwächse in der mRNA-Expression bei allen drei Dosierungen finden. Das Maximum wird schließlich mit einem 8fachen Anstieg der mRNA-Konzentration bei der Dosierung von 2mM gefunden. Veränderungen der Expression am IGF-1-Rezeptor zeigen wie bei der Stimulation mit Carbamazepin ebenfalls nur eine Tendenz, aber keine signifikante Expressionszunahme.

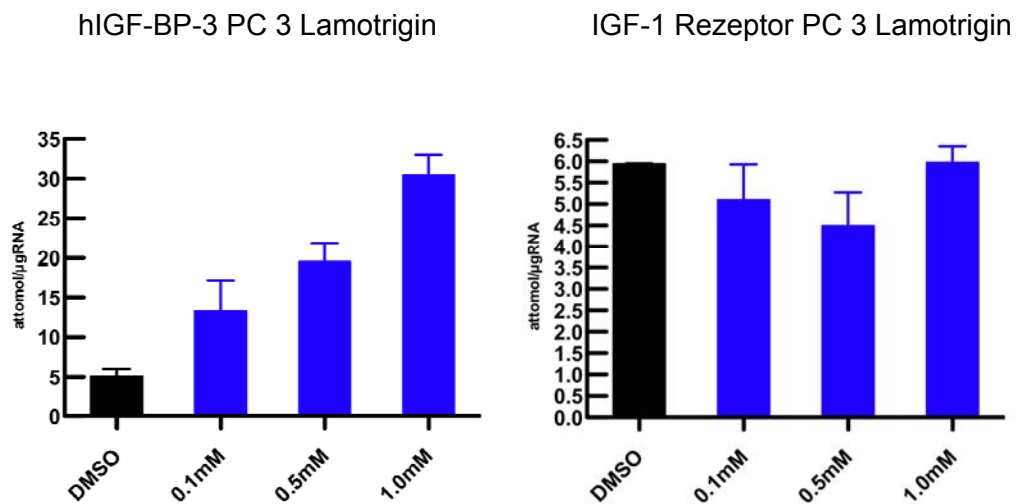


Abbildung 36 und 37: PC 3

Wie bei der LNCaP bleibt auch bei der PC3 der Effekt des Lamotrigins auf das hIGF-BP-3 beschränkt. Es findet sich eine stetige Zunahme der mRNA-Konzentration des hIGF-BP-3 bis das Maximum bei einer Dosierung von 1mM erreicht ist. Die Konzentration an mRNA hat sich dann etwa versechsfacht. Auch bei der Stimulation der PC-3 bleibt der IGF-1-Rezeptor in seiner Expression unbeeinflusst.

4. Diskussion

4.1. Das onkoprotektive Potential von Carbamazepin und Lamotrigin

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nach den Studien mit Valproat mit dem Carbamazepin und dem Lamotrigin zwei weitere Histondeacetylaseinhibitoren aus der Gruppe der Antiepileptika zu finden. Der antiproliferative Effekt des Antiepileptikums Valproat konnte in diversen Experimenten belegt werden. Auch sind verschiedene Tumorsuppressorgene und Onkogene identifiziert worden, die durch die Behandlung mit Valproat rektifiziert wurden (Thelen et al., 2004).

Um zu untersuchen, ob dem Carbamazepin und dem Lamotrigin ähnliche Eigenschaften wie dem Valproat zuzuschreiben sind, wurden in der vorliegenden Arbeit die Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und PC 3 und die Mammakarzinomzelllinie MCF 7 jeweils mit Carbamazepin und Lamotrigin stimuliert. Anschließend wurden sie hinsichtlich ihrer Proliferations- und Vitalitäts-Aktivität untersucht. Bei der Zelllinie der LNCaP wurden zusätzlich die mRNA Expression und die Sekretion der Serinprotease PSA bestimmt.

Um für die gefundenen Ergebnisse ein Korrelat auf Genexpressions-Ebene zeigen zu können, wurden dann mit Hilfe der Real-Time-PCR die Expression einzelner Komponenten der IGF-Achse und die Expression des Tumorsuppressorgens ER β untersucht.

4.1.1. Abnehmende Zellvitalität und Proliferation durch Carbamazepin und Lamotrigin

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Behandlung von LNCaP und PC 3 Zellen mit Carbamazepin und Lamotrigin sowohl ein signifikanter Abfall der Vitalität als auch der Zellproliferationsrate erzielt werden (Abbildung 6-13).

Unter steigenden Konzentrationen der Antiepileptika kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Zellvermehrung und Proliferation, sodass schließlich die Proliferationsrate der LNCaP bei einer Konzentration von 2mmol/l (Carbamazepin) bzw. 1mmol/l (Lamotrigin) um 86% bzw. 49% reduziert ist. Ähnlich

verhält es sich bei der PC 3, hier ist aber nur eine Proliferationsreduktion von 33% (Carbamazepin) bzw. 44% (Lamotrigin) zu verzeichnen. Zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass die Expression des housekeeping-Gens ARP (Abbildung 14-19) unter den steigenden Konzentrationen der Antiepileptika keine signifikanten Veränderungen zeigt. Ebenfalls kann aus den Schwankungen der ARP-Expression keine Tendenz in Richtung Expressionsabnahme abgeleitet werden. Es ist also nicht von einem rein zytotoxischen Effekt der Antiepileptika auszugehen.

Dies lässt sich gut in Einklang bringen mit den Ergebnissen, die bei Untersuchungen an diesen Zelllinien unter der Behandlung mit Valproat gemacht wurden. Auch hier konnte jeweils unter der höchsten Konzentration die größte Reduktion der Vitalität und Proliferation erreicht werden. Ursächlich hierfür ist unter anderem die Rektifizierung der IGF-Achse beschrieben wurden (Thelen et al., 2004 und Shabbeer et al., 2007).

Dies kann dadurch erklärt werden, dass IGF-1 als Progressionsfaktor auf den Zellzyklus wirkt. In Verbindung mit anderen Faktoren werden die Zellen für andere Wachstumsstimuli sensitiviert und der Übergang von der G1- in die S-Phase mit nachfolgender Zellproliferation findet statt (Djavan et al., 2001). Hierbei zeigt IGF-1 seine mitogene Wirkung durch steigende DNA-Synthese (Iwamura et al., 2003) und Stimulation der Cyclin-D-Expression, welches die Progression des Zellzyklus beschleunigt (Furlanetto et al., 1994). Daraus folgt eine gesteigerte Teilungsrate. Zudem konnte für einige IGFs eine Antagonisierung von antiproliferativen Molekülen gezeigt werden (Yu und Rohan, 2000).

Im Kontext dieser Arbeit könnte die Rektifizierung der IGF-Achse und die damit verbundene Reduktion der Expression des IGF-1 über diesen Mechanismus ebenfalls zu der abnehmenden Zellproliferationsrate beitragen.

Besondere Beachtung finden in diesem Zusammenhang die Veränderungen der Expression des ER β und die damit verbundene Wirkung auf die IGF-Achse. Die Auswirkungen der Rektifizierung der IGF-Achse lassen sich in Einklang bringen mit der von Stettner et al.(2007) beschriebenen Wirkung des ER β auf die IGF- Achse.

4.2. Hochregulation des ER β

Alle drei Zelllinien LNCaP, PC-3 und MCF-7, die in dieser Arbeit untersucht wurden, exprimieren den ER β (Lau et al., 2000). Der ER β ist ein proapoptotischer und antiproliferativer Faktor im Prostatakarzinom (Bonkhoff und Berges, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass selbst Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms den ER β noch exprimieren (Fixemer et al., 2003). Oftmals wird aber in hormonrefraktären Stadien ein substantieller Verlust des ER β beobachtet.

In der Arbeit von Stettner et al. (2007) konnte die antiproliferative und apoptotische Wirkung des ER β gezeigt werden. Hierzu wurde der ER β mittels siRNA herunterreguliert und anschließend mit Tectoriginin behandelt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, die den ER β noch exprimierte, zeigte sich, dass ohne den ER β der antiproliferative Effekt des Tectoriginins stark reduziert war.

Vor diesem Hintergrund kann davon ausgegangen werden, dass eine vermehrte Expression des ER β antiproliferativ wirkt. In der vorliegenden Arbeit konnte bei der LNCaP sowohl bei der Behandlung mit Carbamazepin (Abbildung 20) als auch mit Lamotrigin (Abbildung 21) eine gesteigerte Expression des ER β beobachtet werden. Während beim Lamotrigin bereits eine geringe Dosis von 0,1mmol/l ausreicht, um eine Expressionssteigerung zu bewirken und eine Dosissteigerung ohne weiteren Effekt bleibt, kann bei der Stimulation mit Carbamazepin ein differenzierterer Effekt beobachtet werden. Alle drei Konzentrationen des Carbamazepins führen zwar zu einer signifikanten Expressionssteigerung, jedoch ist dieser Effekt nicht bei der höchsten Konzentration am ausgeprägtesten, sondern bei einer Dosierung von 1mmol/l. Hier muss eventuell von einem toxischen Effekt des Carbamazepins bei steigenden Konzentrationen auf die Transkription ausgegangen werden, zumal sich diese Beobachtung auch beim hIGF-BP-3 (Abbildung 30) machen lässt. Dies deckt sich nicht mit den Beobachtungen, die beim ARP gemacht wurden. Hier ist selbst bei den höchsten Konzentrationen kein vergleichbarer Effekt zu beobachten gewesen. Dies könnte durch eine sensitivere Regulierung des ER β und des hIGF-BP-3 erklärt werden. Ob ein toxischer Effekt bei höheren Dosierungen des Lamotrigins ebenfalls auftritt, bleibt zu klären.

Bei der PC 3 konnte lediglich bei der Behandlung mit Lamotrigin (Abbildung 23) eine Expressionsveränderung beobachtet werden. Hier zeigt sich, ähnlich wie bei der Behandlung der LNCaP mit Carbamazepin, die größte Veränderung nicht bei der höchsten, sondern bei einer mittleren Konzentration von 0,5mmol/l. Nicht in Einklang zu bringen sind hiermit die Ergebnisse des Vitalitätstests und des Proliferationstests. Hier konnte jeweils der größte Effekt bei der höchsten Konzentration (Abbildung 9 und 13) beobachtet werden. Ein toxischer Effekt hätte aber auch hier eine verringerte Proliferation zur Folge.

Zur Klärung der Frage, ob die Heraufregulation des ER β bei der Behandlung mit den Histondeacetylaseinhibitoren Carbamazepin und Lamotrigin ein isoliert beim Prostatakarzinom zu beobachtender Effekt ist, wurde die Expression des ER β nach der Behandlung mit Carbamazepin und Lamotrigin an der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 untersucht. Auch in der MCF-7 werden dem ER β antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften zugeschrieben (Chen et al., 2008; Behrens et al., 2007). So konnte unter anderem bei isolierter Aktivierung des ER β im Mammakarzinom eine vermehrte Apoptose, verminderte maligne Entartung und eine Wachstumsinhibition nachgewiesen werden (Treeck et al., 2007).

Wie die Abbildungen 24 und 25 zeigen, kann eine Heraufregulation des ER β durch die Behandlung mit Carbamazepin und Lamotrigin auch bei der MCF-7 erreicht werden. Während bei der Stimulation mit Carbamazepin wiederum ein maximaler Einfluss bei der mittleren Konzentration auffällt, ist diesmal bei der Behandlung mit Lamotrigin der größte Effekt bei der höchsten Dosierung zu sehen.

4.3. Reduktion der PSA-mRNA-Expression und PSA-Sekretion

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation der LNCaP mit Carbamazepin und Lamotrigin eine Expressionreduktion der Serinprotease PSA stattfand (Abb. 26 und 28). Den deutlichsten Effekt beobachtet man bei den jeweils größten Konzentrationen (Carbamazepin: 2mmol/l und Lamotrigin: 1mmol/l). Durch die PSA-Bestimmung in den Medium-Überständen der Zellen konnte gezeigt werden, dass sich dieser Effekt auch auf Proteinebene fortsetzt (Abbildung 27 und 29).

Die Expression des PSA steht in engem Zusammenhang mit der Aktivität des Androgenrezeptors. Dieser wiederum kann durch eine gesteigerte Expression des IGF-1 direkt stimuliert werden (Culig et al., 1994).

Ebenso gibt es nach Williams Hinweise darauf, dass das PSA sowohl in die Tumorprogression als auch über die Aufrechterhaltung einer chronischen Inflammation in die Kanzerogenese involviert ist (Williams et al., 2007).

Da das PSA auch über eine Involvierung des IGF-Systems stimulierend auf die stromale Zellproliferation wirkt, ist insgesamt die Herunterregulation des PSA äußerst positiv zu betrachten (Sutkowski et al., 1999).

Durch die Herunterregulation dieses prostataspezifischen Proliferationsfaktors kann in Anlehnung an das Valproat ein therapeutisches Potential der etablierten Antiepileptika Carbamazepin und Lamotrigin erwogen werden (Thelen et al., 2004).

4.3.1. Zusammenhang PSA und IGF-Achse

PSA, eine Serin-Protease, weist in Prostatakarzinomen eine erhöhte Aktivität auf (Cohen et al., 1992). Prostatistische Stromazellen zeigen nach der alleinigen Behandlung mit PSA sowie bei der kombinierten Behandlung von PSA und IGF-1 ansteigende Zellzahlen. Neben einer direkt wachstumsstimulierenden Wirkung in vitro moduliert die Serinprotease PSA die Interaktion zwischen IGF-1 und hIGF-BP-3 (Sutkowski et al., 1999). PSA degradiert hIGF-BP-3 (Fowlkes et al., 1994) und verhindert somit die inhibitorischen Effekte dieses Bindungsproteins auf das Wachstum kultivierter Prostatazellen (Cohen et al., 1994). Infolgedessen ist bei der durch Carbamazepin und Lamotrigin bewirkten Hochregulation von hIGF-BP-3

(Abbildung 30, 32 und 34) in Kombination mit abnehmender Genexpression und Sekretion von PSA (Abbildung 26-99) auf eine Verschiebung dieses Verhältnisses zu Gunsten protektiv wirkender Faktoren auszugehen. Aus der Herunterregulation des PSA resultiert zum einen ein direkter Wegfall eines Wachstumsstimulus, zum anderen folgt eine verminderte Proteolyse des protektiv wirkenden hIGF-BP-3. Dies wirkt begünstigend auf die beobachtete rückläufige Proliferationsrate der LNCaP.

4.4. Die IGF-Achse

4.4.1. Das hIGF-BP-3

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung der Zelllinien der LNCaP mit Carbamazepin eine deutliche Steigerung in der Expression des hIGF-BP-3 zu erzielen ist (Abbildung 30). Auch hier zeigt sich jedoch, wie beim ER β , dass die Steigerung am deutlichsten bei einer Konzentration von 1mmol/l ist. Ohne signifikante Ergebnisse bleiben die Untersuchungen an der Linie der PC-3 (Abbildung 32).

Bei der Behandlung mit Lamotrigin hingegen zeigen sich sowohl in der LNCaP (Abbildung 34), als auch in der PC-3 (Abbildung 36) deutliche Expressionszunahmen.

Die ansteigende Expression des hIGF-BP-3 ist ein wichtiges Ergebnis. Sowohl Kaicer et al., (1993) als auch Zi et al., (2000) weisen steigenden Konzentrationen von hIGF-BP-3 einen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum von Prostatakarzinomen zu. Zudem ist eine inverse Assoziation zwischen hIGF-BP-3-Konzentrationen und dem Risiko für ein Prostatakarzinom beschrieben worden (Chan et al., 1998, Djavan, et al., 2001).

Da eine hohe Affinität zwischen IGF-1 und dem hIGF-BP-3 besteht, liegen 90% des IGF-1 in gebundener Form vor (Djavan et al., 2001). Es kann davon ausgegangen werden, dass durch erhöhte hIGF-BP-3 Konzentrationen eine Art Konkurrenz zwischen dem hIGF-BP-3 und den IGF-1-Rezeptoren um das freie IGF-1 entsteht, sodass schließlich weniger freie IGF-1 Moleküle zur Verfügung stehen. Die folglich resultierende verminderte Bioverfügbarkeit des IGF-1 durch steigende

Konzentrationen des hIGF-BP-3 führt zu einer verminderten Sensitivität der Zelllinien gegenüber dem proliferationsstimulierenden Einfluss des IGF-1 (Rajah et al., 1997).

Dies ist vor allem bei der Betrachtung der sinkenden PSA Spiegel bei den hier vorliegenden Experimenten zu bedenken. IGF-1 kann liganden-unabhängig den Androgenrezeptor aktivieren und somit unter anderem die Transkription des PSA beeinflussen.

Neben der modulierenden Einflussnahme auf das IGF-System besitzt hIGF-BP-3 die Fähigkeit, Apoptose auszulösen, wobei zur Generierung entsprechender Signale sowohl Rezeptor- als auch Nicht-Rezeptor-vermittelte Mechanismen, wie die Interaktion mit Integrinen, postuliert werden (Mira et al., 1999). Möglicherweise konnte durch die Hochregulation des hIGF-BP-3 ebenfalls ein antineoplastischer Effekt ausgelöst werden. In der PC-3 wurden membranassoziierte Proteine identifiziert, welche als spezifische Rezeptoren fungieren und den Effekt des hIGF-BP-3 auf den programmierten Zelltod vermitteln.

Jedoch weisen Rajah et al. (1997) in ihrer Arbeit darauf hin, dass für diese Wirkung hIGF-BP-3 in seiner unkonjugierten Form vorliegen muss. Steigende IGF-1 Konzentrationen würden diesem Effekt also entgegen wirken.

4.4.2. Der IGF-1 Rezeptor

Die Ergebnisse der Untersuchung der Veränderung der Expression des IGF-1 Rezeptors müssen kritisch betrachtet werden. Es konnte lediglich eine Expressionsverringerung des IGF-1 Rezeptors für die Behandlung der LNCaP mit Carbamazepin (Abbildung 31) gezeigt werden. Die PC 3 zeigte keine Veränderung der IGF-1 Rezeptor Expression nach Stimulation mit Carbamazepin. Ebenso konnte weder bei der LNCaP, noch bei der PC 3 ein Effekt durch die Stimulation mit Lamotrigin (Abbildung 35 und 37) erreicht werden. Deshalb können die folgenden Überlegungen nur für die mit Carbamazepin stimulierte LNCaP gelten.

Dem IGF-1 Rezeptor kommt besonders im fortgeschrittenen Prostatakarzinom Bedeutung zu. Der IGF-1 Rezeptor erlangt die Fähigkeit, den Androgenrezeptor auch in Abwesenheit der entsprechenden Steroide zu aktivieren (Culig et al., 1994). Dementsprechend kann vermutet werden, dass aus der Herunterregulation des IGF-1 Rezeptors durch Carbamazepin eine verminderte Androgenrezeptor-Aktivität

resultiert, was unter anderem zu sinkenden PSA-Spiegeln führen kann. Wieso die Aktivität des PSA aber auch bei einer Stimulation mit Lamotrigin verringert wird (Abbildung 28 und 29), bleibt zu diskutieren. Möglicherweise spielen hier wiederum die Effekte der gestiegenen hIGF-BP-3 Konzentration (Abbildung 34) eine Rolle. Die durch das hIGF-BP-3 verringerte Menge an freiem IGF-1 führt ebenfalls zu einer verminderten Aktivierung des Androgenrezeptors. Dies resultiert vermutlich in dem beobachteten Abfall des PSA nach Stimulation der LNCaP mit Lamotrigin (Abbildung 28 und 29), da hier keine Veränderungen am IGF-1 Rezeptor nachweisbar waren (Abbildung 35). Ob dies letztendlich der hauptsächliche Weg ist, der zu einer Verminderung des PSA Spiegels sowohl nach Stimulation mit Carbamazepin als auch mit Lamotrigin führt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.5. Rektifizierung der IGF- und Androgen-Achse unter Berücksichtigung des ER β Einflusses

Auf den besonderen Zusammenhang zwischen dem PSA und dem hIGF-BP-3 wurde schon in Punkt 4.1.1. hingewiesen. Zunächst sollen an dieser Stelle noch einmal zusammenfassend die einzelnen Komponenten dieser IGF-Achse und ihre Beziehungen zueinander dargestellt werden.

Betrachtet man die komplexen Interaktionen von PSA in der Pathologie des Prostatakarzinoms wird die weitgreifende Bedeutung einer Reduktion des PSA-Spiegels deutlich. Laut Djavan et al. (2001) stellen PSA, IGF-1, IGF-1 Rezeptor, hIGF-BP-3 und der Androgenrezeptor ein intensiv rückgekoppeltes System dar, welches folgendermaßen funktionieren könnte:

IGF-1 ist in der Lage, den Androgenrezeptor in LNCaP Zellen zu stimulieren oder zu aktivieren, was unter anderem in einer steigenden Produktion von PSA zu sehen ist. Diese Serinprotease spaltet daraufhin hIGF-BP-3, was wiederum zu erhöhten Konzentrationen an freiem IGF-1 führt. IGF-1 wirkt dann antiapoptotisch in Prostatakarzinomzellen und lässt letztendlich die Mitoserate steigen. Dies resultiert aber wieder in einer gesteigerten PSA-Produktion (Culig et al., 1994). Es entsteht ein „Teufelskreis“, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die proliferativen Faktoren PSA und IGF-1 erhöht sind und der proapoptotische Faktor hIGF-BP-3 verringert ist. Hier wird deutlich, welche Bedeutung der Rektifizierung der IGF-Achse zukommt.

So ergibt sich die Frage, auf welche Weise die Histondeacetylaseinhibitoren Carbamazepin und Lamotrigin positiv auf diesen Kreislauf einwirken können.

Zum einen konnte die Hochregulation des ER β beschrieben werden, zum anderen die Hochregulation des hIGF-BP-3. Teilweise wurde auch eine Herunterregulation des IGF-1 Rezeptors beobachtet.

Einen Zusammenhang zwischen diesen völlig unterschiedlichen Proteinen lässt sich in der Arbeit von Stettner et al., (2007) finden. In dieser Arbeit wurde die Expression des ER β mittels siRNA verhindert. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass das PSA und der IGF-1 Rezeptor in Anwesenheit des ER β nach Stimulation in ihrer Expression verringert waren, in Abwesenheit des ER β blieb diese Herunterregulation jedoch aus. Der so gefundene Einfluss des ER β auf die IGF-Achse lässt einen rektifizierenden Einfluss des ER β auf die IGF-Achse vermuten.

Aus dieser Beobachtung könnte folgender Schluss gezogen werden: Die Wirkung der Histondeacetylaseinhibitoren Carbamazepin und Lamotrigin beruht nicht in der spezifischen Aktivierung bzw. Inaktivierung von Onkogenen, sondern der Haupteffekt lässt sich mit der Hochregulation des ER β und der daraus resultierenden Rektifizierung der IGF-Achse beschreiben.

Für diesen beschriebenen Mechanismus ist aber die Wechselwirkung des PSA mit der IGF-Achse über den Androgenrezeptor essentiell. Zu diskutieren ist deshalb, warum in der Androgenrezeptor-negativen Zelllinie PC 3 ebenfalls bei einer Hochregulation des ER β eine Hochregulation des hIGF-BP-3 zu beobachten ist. Zur Bestätigung der Hypothese, dass die Hochregulation des hIGF-BP-3 und die damit verbundene Rektifizierung der IGF-Achse einzig durch die Hochregulation des ER β begründet ist, müsste noch eine andere Verbindung außer dem Androgenrezeptor zwischen dem ER β und der IGF-Achse bestehen. Gestützt wird diese Vermutung einer weiteren Verbindung indirekt durch die Tatsache, dass in den vorliegenden Experimenten bei der Stimulation der PC-3 mit Carbamazepin keine Hochregulation des ER β zu beobachten war (Abbildung 22). Ebenso blieb dann aber auch eine Rektifizierung des hIGF-BP-3 aus (Abbildung 32). Im Gegenzug dazu konnte aber nach der Stimulation der PC 3 mit Lamotrigin eine Hochregulation des ER β beobachtet werden (Abbildung 23). Hier ist dann ebenfalls das hIGF-BP-3 hochreguliert (Abbildung 36).

Zu untersuchen wäre deswegen, ob durch die Stimulation mit Lamotrigin andere HDACi-Klassen betroffen sind, als durch die Stimulation mit Carbamazepin.

Welcher Art ein weiterer Einfluss des ER β auf die IGF-Achse in Abwesenheit eines Androgenrezeptors ist und wie dieser vermittelt wird, bleibt zu klären.

Ebenso die Frage, warum für die nachgewiesene Proliferationsreduktion nach der Stimulation der PC 3 mit Carbamazepin kein Expressions-Korrelat gefunden werden kann und ob deswegen von einem rein toxischen Effekt ausgegangen werden muss.

4.6. Fazit und Ausblick

Da gerade im fortgeschrittenen hormonrefraktären Prostatakarzinom wenig Therapieoptionen zur Verfügung stehen, ist es wichtig, alternative Wege zur Therapie zu evaluieren (Isaacs, 2005). So sprach sich auch McCarty (2004) für eine multifokale Signalmodulationstherapie zur Behandlung des Prostatakarzinoms aus. Er befürwortet den Einsatz von Substanzen, die auf die Regulierung aberranter Signalwege abzielen. Dies gilt einerseits für die deregulierte IGF-Achse (Pollak et al., 2004) als auch für die Wiederherstellung des ER β (Stuart et al., 2007 und Bonkhoff et al., 2008).

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sind mit Carbamazepin und Lamotrigin zwei weitere Histondeacetylaseinhibitoren aus der Klasse der Antiepileptika mit positiven Effekten auf das Prostatakarzinom gefunden worden. Es konnte vor allem eine Hochregulation der antiproliferativ wirkenden Proteine hIGF-BP-3 und ER β gezeigt werden. Zusätzlich konnte eine verminderte Expression und Sekretion der Serinprotease PSA erzielt werden.

Resümierend kann wohl von einem rektifizierenden Einfluss des ER β auf die IGF-Achse ausgegangen werden, was unter anderem in einer verminderten Proliferation der LNCaP und PC 3 und Herunterregulierung der PSA-Expression und Sekretion in der LNCaP resultiert.

Weiterführend müsste geklärt werden, ob der rektifizierende Einfluss des ER β nur, wie in Stettner (2007) beschrieben, über den Androgenrezeptor vermittelt ist, oder ob eventuell noch alternative Verbindungen bestehen, wie es die Experimente an der PC 3 vermuten lassen. Außerdem stellt sich die Frage der therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten der beiden Antiepileptika im fortgeschrittenen kastrationsresistenten Prostatakarzinom. Hinsichtlich der Wirkung im

Prostatakarzinom in vivo existieren zur Zeit zu wenig Daten. Lediglich aus der Behandlung von Epileptikern in der Neurologie lassen sich eventuelle Nebenwirkungen ableiten. Ebenfalls ist nichts über eine eventuelle Dosierung bekannt. Insgesamt stehen aber durch das immer größer werdende Spektrum der Histondeacetylaseinhibitoren interessante Möglichkeiten offen, alternative Wege zu finden, das Prostatakarzinom in fortgeschrittenen Stadien therapieren zu können.

5. Zusammenfassung

Einige Antiepileptika, wie z.B. das Valproat, haben höchstwahrscheinlich in ihrer Funktion als HDACi einen antiproliferativen und proapoptotischen Einfluss auf das Prostatakarzinom. So wurde bereits eine Hochregulation des ER β und eine Rektifizierung der IGF-Achse unter dem Einfluss des Valproats beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit den Antiepileptika Carbamazepin und Lamotrigin das Spektrum der Histondeacetylaseinhibitoren zu erweitern.

Dazu wurden die humanen Prostatakarzinomzelllinien der LNCaP, der PC-3 und die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit Carbamazepin und Lamotrigin für jeweils 24 Stunden stimuliert, anschließend ein Vitalitätstest (AlamarBlue) und ein Proliferationstest (BRD-U) durchgeführt. Des Weiteren erfolgte eine Identifizierung der in ihrer Expression veränderten Gene mittels Real-Time PCR. Um zu sehen, ob sich der beobachtete Effekt beim PSA auch auf Proteinebene fortsetzt, wurde aus den Zell-Überständen der PSA-Gehalt bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass Carbamazepin und Lamotrigin sowohl in der LNCaP als auch in der PC 3 eine Verminderung der Vitalität und Proliferationsrate bewirken. Ebenso verursachten beide in der LNCaP eine Hochregulation des ER β , während dieser Effekt in der PC 3 nur durch das Lamotrigin hervorgerufen wurde. Eine Rektifizierung der IGF-Achse konnte nur in den Experimenten nachgewiesen werden, in denen auch eine Hochregulation des ER β beobachtet wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Carbamazepin und Lamotrigin zwei weitere Antiepileptika mit Eigenschaften von Histondeacetylaseinhibitoren gefunden wurden. Während man bei der LNCaP davon ausgehen kann, dass durch eine Hochregulation des ER β eine Rektifizierung der Achse PSA- IGF-1- hIGF-BP-3 über Wechselwirkung mit dem Androgenrezeptor erfolgt, muss bei der PC 3 von einer anderen Verbindung des ER β und der IGF-Achse ausgegangen werden, da in der PC 3 kein Androgenrezeptor exprimiert wird. Durch den Nachweis der Hochregulation des ER β in der MCF-7 konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Inhibierung von Histondeacetylasein auch in anderen hormonabhängigen Tumoren zu finden ist.

Abschließend sind mit Carbamazepin und Lamotrigin zwei weitere Medikamente gefunden worden, die vielversprechende Möglichkeiten zur Behandlung des Prostatakarzinoms bieten.

6.Literaturverzeichnis

Abate-Shen C, Shen MM (2000): Molecular genetics of Prostate cancer. *Genes Dev* 14, 2410-34

Behrens D, Gill JH, Fichtner I (2007): Loss of tumourigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 274, 19–29.

Bonkhoff H, Berges R (2008): The Evolving Role of Oestrogens and Their Receptors in the Development and Progression of Prostate Cancer. *Eur J Urol* 7, 1-10

Böcker W, Denk H, Heitz U: Pathologie. Dritte völlig überarbeitete Auflage; Urban&Fischer, München.Jena 2004, 895-8

Burfeind P, Chernicky CL, Rininsland F, Ilan J (1996): Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7263–68.

Burgis E: Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie. Zweite, aktualisierte Auflage; Urban&Fischer, München.Jena 2001, 293-96

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K: Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. 2.Auflage; Urban&Fischer Verlag, München 2000, 93

Carter BS, TH Beaty (1992): Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8), 3367-71

Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M (1998): Plasma insulin like growth factor-I and prostate risk: a prospective study. *Science* 279, 563-66

Chen, Qiang Zeng, Gary MK Tse (2008): Estrogen and Its Receptors in Cancer. *Med Res Rev* 28(6), 954-74

Cheng J, Lee EJ, Madison L D, Lazennec G (2004): Expression of estrogen receptor

beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. FEBS Lett 566, 169–72

Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Guidice LC, Rosenfeld RG (1992): Prostate specific-antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. J Clin Endocrinol Metab 75, 1046-53

Cohen P, Peehl DM, Graves HC, Rosenfeld RG (1994): Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. J Endocrinol 142, 407-15

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H (1994): Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor I, keratinocyte growth factor and epidermal growth factor. Cancer Res 54(20), 5474-78

De Marzo AM, Marchi VL (1999): Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. Am J Pathol 155(6), 1985-92.

Djavan B, Waldert M, Seitz C, Marberger M (2001): Insulin-like growth factors and prostate cancer. World J Urol 19, 225-33

Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M (2004): The Activity of Antiepileptic Drugs as Histone Deacetylase Inhibitors. Epilepsia 45, 737-44

Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H (2003): Differential expression of the estrogen receptor beta (ER beta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic and recurrent prostatic adenocarcinoma. Prostate 54, 79-87

Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H (1994): Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. J Biol Chem 269, 25742-46

Furlanetto RW, Harwell SE, Frick KK (1994): Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro. *Mol Endocrinol* 8, 510-17

Giovannucci E (1999): Nutritional factors in human cancers. *Adv Exp Med Biol* 472, 29-42

Gray SG, Ekström TJ (2001): The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 262(2), 75-83

Grzmil M, Hemmerlein B, Thelen P, Schweyer S, Burfeind P (2004): Blockade of the type I IGF receptor expression in human prostate cancer cells inhibits proliferation and invasion, up regulates IGF binding protein-3, and suppresses MMP-2 expression. *J Pathol* 202, 50-9

Hammerer P, Graefen M, Steuber T, Huland H (2000): Chemoprevention of prostatic carcinoma. *Urologe A* 39, 304-8

Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulson R, Brewster SF, Macaulay VM (2002): Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res* 62(10), 2942-50.

Isaacs JT (2005): New strategies for the medical treatment of prostate cancer. *BJU Int* 96 Suppl.2, 35-40

Iwamura M, Sluss PM, Casamento JB, Cockett AT (1993): Insulin-like growth factor I: action and receptor characterization in human prostate cancer lines. *Prostate* 22, 243-52

Jankevicius F, Miller SM, Ackermann R (2002): Nutrition and risk of prostate cancer. *Urol Int* 68, 69-80

Jemal A, Siegel R (2007): Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57(1), 43-66

Kaicer E, Blat C, Imbenotte J, Troalen F, Cussenot O, Calvo F, Harel L (1993): IGF binding protein-3 secreted by the prostate adenocarcinoma cells (PC-3)- differential effect on PC-3 and normal prostate cell growth. *Growth Regul* 3, 180-9

Löffler G, Petrides PE: *Biochemie und Pathobiochemie*. Sechste, korrigierte Auflage; Springer-Verlag, Berlin 1998, 219, 229, 851

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648), 251-60

Marks PA, Richon VM, Kelly WK, Chiao JH, Miller T (2004): Histone deacetylase inhibitors: development as cancer therapy. *Novartis Found Symp* 259, 269-281

McCarty MF (2004): Targeting multiple signaling pathways as a strategy for managing prostate cancer: multifocal signal modulation therapy. *Integr Cancer Ther* 3(4), 349-80

Mira E, Manes S, Lacalle RA, Marquez G, and Martinez-A C (1999): Insulin-like growth factor I-triggered cell migration and invasion are mediated by matrix metalloproteinase-9. *Endocrinology* 140, 1657-64

Moschos SJ, Mantzoros CS (2002): The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 63, 317-32

Nelson PS, Montgomery B (2007): Unconventional therapy for prostate cancer: good, bad or questionable? *Nat Rev Cancer* 3, 845-58

Oh Y, Muller HL, Ng L, Rosenfeld R (1995): Transforming growth factor- β induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J Biol Chem* 270(13), 589-92

Pollak M, Schernhammer E, Hankinson S (2004): Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 4, 505-18

Rajah R, Valentinis B, Cohen P (1997): Insulin like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53 and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 272, 12181-88

Rajah R, Kharo A, Lee PD, Cohen P (1999): Insulin-like growth factorbinding protein-3 is partially responsible for high-serum-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *J Endocrinol* 163, 487-94.

Robert-Koch-Institut (2009):

http://www.rki.de/cln_151/nn_204124/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Praevalenz/Lokalisationen/C61,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/C61.pdf

Rokhlin OW, Glover RB, Guseva NV, Taghiyev AF, Kohlgraf KG, Cohen MB (2006): Mechanisms of Cell Death Induced by Histone Deacetylase Inhibitors in Androgen Receptor-Positive Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 4, 113-23

Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003): Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9(8), 437-48

Shabbeer S, Kortenhorst MSQ, Kacchap S, Galloway N, Rodriguez R, Carducci MA (2007): Multiple Molecular Pathways Explain zhe Anti-Proliferative Effect of Valproic Acid on Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *The Prostate* 67, 1099-1110

Sökeöand J, Schulze H, Rübben H: *Urologie*. 13., korrigierte und aktualisierte Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2004, 301-14

Stettner M, Kaulfuß S, Burfeind P, Schweyer S, Strauss A, Ringert R-H and Thelen P (2007): The relevance of estrogen receptor- β expression to the antiproliferative

effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Mol Can Ther* 6(10), 2626-33

Stuart J. Ellem and Gail P. Risbridger (2007): Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens. *Nat Rev* 7, 621-27

Sutkowski DM, Goode RL, Baniel J, Teater C, Cohen P, McNulty AM, Hsiung HM, Becker GW, Neubauer BL (1999): Growth regulation of prostatic stromal cells by prostatic-specific antigen. *J Natl Cancer Inst* 91, 1663-69

Taichman, RS, Loberg RD (2007). The evolving biology and treatment of prostate cancer. *J Clin Invest* 117(9), 2351-61.

Thelen P, Schweyer S, Hemmerlein B, Wuttke W, Seseke F, Ringert RH (2004): expressional changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 24, 25-31

Treack O, Pfeiler G, Mitter D, Latrich C, Piendl G, Ortmann O (2007): Estrogen receptor {beta}1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *J Endocrinol* 193, 421–433.

Williams SA, Sing P, Isaacs JT and Denmeade (2007): Does PSA play a Role as a Promoting Agent during the Initiation and/or Progression of Prostate Cancer?. *The Prostate* 67, 312-29

Wong ML, Medrano JF (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39(1), 75-85

Xia Q, Sung J, Chowdhury W, Chen CI, Höti N, Shabbeer S, Carducci M, Rodriguez R (2006): Chronic Administration of Valproic Acid Inhibits Prostate cancer Cell Growth In Vitro and in Vivo. *Cancer Res* 66, 7237-44

Yu H, Rohan T (2000): role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 92, 1472-89

Zi X, Zhang J, Agarwal R, Pollak M (2000): Silibinin up-regulates insulin-like growth factor-binding protein 3 expression and inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Res* 60(20), 5617-20

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Paul Thelen für die hervorragende und gewissenhafte Betreuung während der Anfertigung dieser Dissertation bedanken. Durch seine Ruhe und Geduld beim Erarbeiten der verschiedenen Sachverhalte dieser Arbeit hat er mir geholfen, auch in schwierigen Situationen nie das Ziel aus den Augen zu verlieren.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Marion Strippe bedanken. Ihre Erfahrungen und ihre Hilfsbereitschaft haben mir im Laboralltag sehr weitergeholfen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich meinem Bruder, der nie müde wurde, mir die Feinheiten im Umgang mit Computern nahezubringen.

Lebenslauf

Ich, Stefan Sürig, wurde am 07.01.1983 in Wolfenbüttel als Sohn von Jutta und Uwe Sürig geboren. 1986 wurde mein Bruder Peter Sürig geboren. Ich besuchte ab dem Sommer 1990 die Grundschule am Geitelplatz in Wolfenbüttel und wurde 1994 in die Orientierungsstufe Wallstraße versetzt. Seit dem Sommer 1996 besuchte ich dann das Gymnasium Große Schule in Wolfenbüttel, das ich dann im Juni 2003 mit dem Erlangen der allgemeinen Hochschulreife abschloss.

Direkt im Anschluss leistete ich meine neun Monate Grundwehrdienst in Nienburg an der Weser und in Munster.

Seit April 2004 bin ich wohnhaft in Göttingen in der Robert-Koch-Straße 7 und begann im April 2004 mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im Frühjahr 2006 legte ich mein erstes Staatsexamen ab.

Das zweite Staatsexamen werde ich voraussichtlich im Juni 2010 absolvieren.