

**Aus der Abteilung Urologie**

(Prof. Dr. med. R.-H. Ringert)

im Zentrum Chirurgie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Funktionelle Analyse des Prostate-Derived-Ets-Factors (PDEF)**

**in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Karoline Anna Schulz**

aus Neumünster

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 :**

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1	Die Prostata .....	5
1.2	Das Prostatakarzinom.....	5
1.3	Die Therapie des Prostatakarzinoms .....	7
1.4	Molekulare Grundlagen.....	9
1.4.1	Der Androgenrezeptor (AR).....	9
1.4.2	Prostate-Derived-Ets-Factor (PDEF) .....	13
1.4.3	Das Prostata-spezifische Antigen (PSA).....	16
1.4.4	Prostate Cancer Gene 3 (PCA3).....	17
1.4.5	Die Insulin-like-Growth-Factor (IGF)-Familie.....	18
1.4.6	NKX3.1 .....	19
<b>2</b>	<b>Das Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
3.1	Die Zelllinie LNCaP.....	24
3.2	RNA-Interferenz mit siRNA .....	25
3.3	Die Transfektion.....	27
3.3.1	Vorbereitung der Zellen auf die Transfektion: Ausplattieren .....	27
3.3.2	Experimentelle Durchführung der Transfektion .....	28
3.4	RNA-Isolierung und RNA-Quantifizierung.....	30
3.5	Reverse Transkription .....	31
3.6	Real-time-quantitative PCR (RT-PCR).....	32
3.6.1	Quantifizierung des RT-PCR-Produkts.....	33

---

3.6.2	Experimentelle Durchführung der RT-PCR.....	36
3.7	Quantifizierung des sezernierten PSA-Proteins .....	39
3.8	Messung der Zellvitalität und Zellproliferation .....	39
3.9	Statistische Auswertung .....	41
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
4.1	Expression des Zielgens PDEF .....	42
4.2	Zellvitalität und Zellproliferation.....	45
4.3	Expression des AR .....	46
4.4	Expression von PSA.....	47
4.5	Expression von PCA3 .....	48
4.6	Expression ausgewählter Mitglieder der IGF-Familie .....	49
4.7	Expression von NKX3.1 .....	52
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1	PDEF und die Androgenachse .....	55
5.2	PDEF und PCA3 .....	59
5.3	Auswirkungen von PDEF auf die IGF-Achse.....	60
5.4	PDEF und NKX3.1 .....	61
5.5	PDEF und die Zellvitalität und Zellproliferation .....	63
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Prostata

Die Prostata hat mit einem Normalgewicht von 15g in etwa die Größe einer Kastanie und umgreift unterhalb des Blasenausgangs ringförmig den Blasen Hals und die Harnröhre. Sie besteht aus zahlreichen Drüsen, gefäß- und nervenreichem Bindegewebe und glatten Muskelfasern. Überzogen wird die Prostata von einer festen bindegewebigen Kapsel. Das Drüsengewebe der Prostata wird histologisch und funktionell in drei Zonen unterteilt: Die periphere Zone, die zentrale Zone und die Transitionalzone (McNeal 1988).

Die Prostata ist eine exokrine Drüse. Das von ihr gebildete und gespeicherte Sekret wird während der Ejakulation über die in die Pars prostatica der Urethra mündenden Ausführungsgänge abgegeben. Ihre Funktion steht im Wesentlichen unter dem Einfluss der Geschlechtshormone, so werden Proliferation und Sekretion der Drüse durch Testosteron reguliert (Junqueira und Carneiro 1996).

## 1.2 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom stellt die maligne Entartung des Prostatagewebes dar. In Deutschland wurden im Jahr 2006 über 60.000 Prostatakarzinome diagnostiziert. Damit war die Prostata mit 26% die häufigste Lokalisation bösartiger Neubildungen beim Mann, gefolgt von Darm (über 36.000, 16%) und Lunge (circa 32.500, 14%). Etwa 10% aller Krebstodesfälle bei Männern waren durch das Prostatakarzinom verursacht. Dies

---

entspricht über 11.500 Männern, die im Jahr 2006 in Deutschland an dieser Erkrankung verstarben (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010). Im Vergleich mit den Staaten der Europäischen Union lag die Neuerkrankungsrate im Jahr 2002 in Deutschland an fünfter Stelle. Die höchsten Raten fanden sich für Schweden und Finnland. Griechenland, Polen und Lettland wiesen die niedrigsten Neuerkrankungsraten auf (Robert Koch-Institut 2007).

Das Prostatakarzinom entsteht mit 70% am häufigsten in der peripheren Zone, deutlich seltener findet es sich dagegen in der transitionalen Zone (25%) oder in der zentralen Zone (5%) (Bonkhoff und Remberger 1998). Als Risikofaktoren gelten neben Alter und genetischer Disposition auch die Ernährung sowie verschiedene Umweltfaktoren. Der wichtigste dieser Risikofaktoren ist das Alter, so sind etwa 90% aller am Prostatakarzinom erkrankten Männer älter als 60 Jahre (Robert Koch-Institut 2007). Die altersspezifische Erkrankungsrate steigt von knapp 66 pro 100.000 Männer bei den 45- bis unter 60-Jährigen kontinuierlich bis auf über 800 Fälle bei den über 75-Jährigen (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Robert Koch-Institut 2006).

Die Diagnostik des Prostatakarzinoms beinhaltet üblicherweise die Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum. PSA stellt gegenwärtig den gängigen biochemischen Marker für die Entartung des Prostatagewebes dar, dessen Nutzen aufgrund seiner unzureichenden Spezifität jedoch umstritten ist. Des Weiteren erfolgen die digitale rektale Untersuchung und der transrektale Ultraschall (TRUS), bei dem zur eindeutigen histologischen Diagnostik in der Regel Gewebsbiopsien entnommen werden. Ergänzend können weitere bildgebende Mittel wie zum Beispiel

---

Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt werden (Sökeland et al. 2004).

### **1.3 Die Therapie des Prostatakarzinoms**

Solange das Prostatakarzinom in seiner räumlichen Ausdehnung auf die Prostata begrenzt ist, befindet es sich in einem frühen, noch heilbaren Stadium. Die Therapie beinhaltet in diesem Fall üblicherweise die operative Prostataresektion oder die strahlentherapeutische Behandlung. Überschreitet das Prostatakarzinom dagegen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits die Organgrenze, ist eine lokale Behandlung nicht mehr ausreichend. Vielmehr ist in diesem fortgeschrittenen Tumorstadium eine systemische Therapie, in der Regel in Form einer Hormontherapie, indiziert. Der Ansatz ist in dem Fall palliativ, da eine Heilung der Erkrankung zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich ist (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2010).

Bei der Erstdiagnose des Prostatakarzinoms ist dessen Wachstum in 80 bis 90% der Fälle abhängig von den körpereigenen Androgenen Testosteron, Dihydrotestosteron, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion, die ihre Wirkung über den Androgenrezeptor (AR) vermitteln. Ziel der hormonellen Therapieverfahren ist deshalb die Senkung der Androgensynthese oder deren Blockade. Da 95% der Androgene in den Hoden produziert werden, stellt die beidseitige subkapsuläre Orchiektomie eine mögliche chirurgische Therapieform dar. Alternativ kommen aber eher LHRH-Analoga wie Goserelin, Leuprorelin und Buserelin zum Einsatz, die in der Hypophyse die Freisetzung von LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel Stimulierendes Hormon) durch Überstimulation hemmen. LH und FSH regen normalerweise in den

---

Hoden die Testosteronproduktion und -freisetzung an. Die ebenfalls eingesetzten Antiandrogene (zum Beispiel Flutamid, Bicalutamid, Nilutamid und Cyproteronacetat) binden direkt am AR, wobei das Cyproteronacetat zusätzlich eine blockierende Wirkung auf die Hypophysen-Hoden-Achse hat. Es wird eine kompetitive Hemmung der Androgene am AR erzielt und im Fall des Cyproteronacetats zusätzlich eine Senkung der Testosteronsekretion in den Hoden (Wedding et al. 2000).

Nachdem zunächst über 80% der Patienten gut auf diese Hormonablation ansprechen, kommt es im Therapieverlauf in der Regel nach zwölf bis 18 Monaten zu einem Wirkungsverlust und einem kastrationsresistenten Progress des Tumors, der durch einen Wiederanstieg des Serum-PSAs gekennzeichnet ist (Heinlein und Chang 2004, Sadar et al. 1999). Dieses Phänomen stellt das grundlegende Problem in der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms dar und reduziert die Behandlungsmöglichkeiten ab diesem Zeitpunkt auf eine rein symptomatische Therapie. Auch wenn die Genese der Androgenunabhängigkeit bislang noch nicht vollständig aufgeklärt ist, konnten bereits zahlreiche den AR, seine Kofaktoren und auch die Androgensynthese betreffende Mechanismen identifiziert werden, die die Entwicklung zur Androgenunabhängigkeit maßgebend beeinflussen (Knudsen und Penning 2010). Da die klassische Chemotherapie aufgrund einer mangelnden Ansprache des Prostatakarzinoms als alternative Therapiemethode zur Hormonablation eine untergeordnete Rolle spielt, liegt vor allem in der Klärung der Rolle des AR und der weiteren an diesem Prozess beteiligten Faktoren ein großes Potenzial, neue Therapieverfahren zu etablieren und die Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms dadurch entscheidend zu verbessern.

---

## 1.4 Molekulare Grundlagen

### 1.4.1 Der Androgenrezeptor (AR)

Die reguläre Entwicklung und Funktion der Prostata unterliegt der Steuerung durch die Androgene, deren Wirkung über den AR vermittelt wird (Roy et al. 1999). Der AR zählt als Steroidrezeptor zur Familie der nukleären Rezeptoren, die diffus im Zytoplasma vorliegen und erst nach Aktivierung durch ihre Liganden in den Zellkern translozieren, um dort als Transkriptionsfaktoren zu agieren (Beato et al. 1995).

Wie zuvor beschrieben, ist das Prostatakarzinom bei der Erstdiagnose in 80 bis 90% der Fälle noch androgenabhängig, weshalb in der Regel bei organüberschreitenden Tumoren die antiandrogene Therapie zum Einsatz kommt. Das Dilemma stellt schließlich der androgenunabhängige Progress des Tumors dar, der gewöhnlich nach spätestens eineinhalb Jahren der Therapie einsetzt (Heinlein und Chang 2004). Veränderungen der Androgenachse spielen die zentrale Rolle in diesem Geschehen. So sind mittlerweile zahlreiche Mechanismen auf Ebene des AR, seiner Koaktivatoren oder auch der Androgensynthese bekannt, die wesentlich am Progress zur Androgenunabhängigkeit beteiligt sind.

Im Fall des AR findet über verschiedene Deregulationen eine Reaktivierung des Rezeptors unter Hormonablation statt (Abb.1). Bereits 1997 bestätigte die Arbeitsgruppe um Koivisto, dass eine Amplifikation des AR-Gens mit einem sekundären Therapieversagen unter antiandrogener Medikation einhergeht. Während eine Amplifikation des AR im nicht-hormonbehandelten Prostatakarzinom nicht nachgewiesen werden konnte, zeigten 28% der sekundär kastrationsresistenten Karzinome eine Vervielfältigung des Gens. Das Vorkommen der AR-Amplifikation war

abhängig von Grad und Dauer der Ansprache auf eine antiandrogene Therapie. So konnte die Vervielfältigung des Gens in erster Linie in Karzinomen nachgewiesen werden, die vorher mindestens zwölf Monate auf die Behandlung angesprochen hatten. Karzinome, die dagegen früher oder von Beginn an nicht auf die Therapie reagiert hatten, wiesen keine AR-Amplifikation auf (Koivisto et al. 1997).

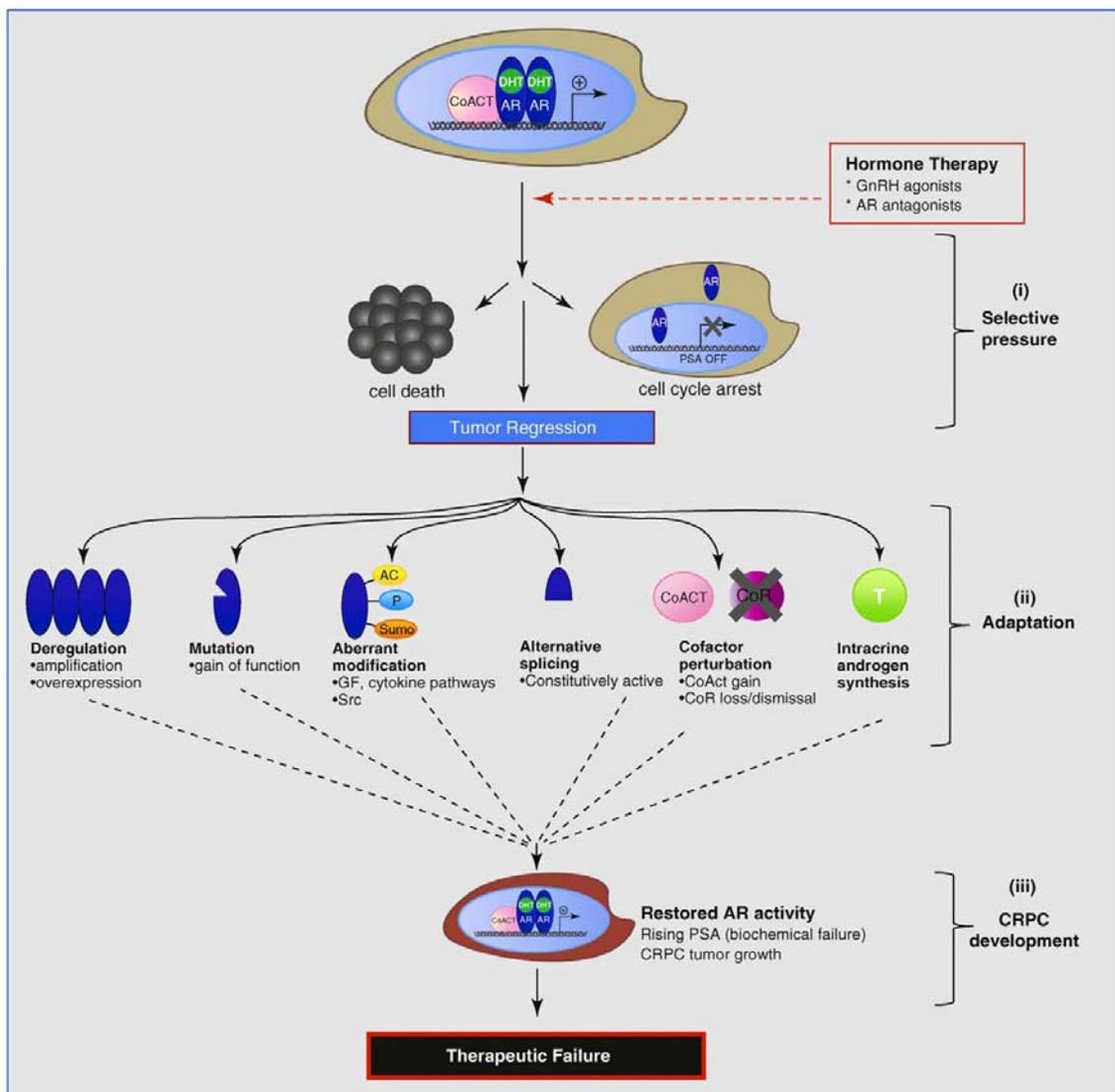


Abb.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen zur AR-Reaktivierung unter antiandrogener Therapie (Auszug aus: Knudsen und Penning 2010, Seite 317)

---

In den Zellen, in denen eine Vervielfältigung des AR-Gens nachweisbar ist, kommt es in der Folge auch zu einer gesteigerten Expression dieser DNA-Abschnitte (Linja et al. 2001). Durch die daraus resultierende erhöhte Rezeptoranzahl können die Androgene auch in sehr niedriger Konzentration noch als Liganden agieren und so den nur scheinbar androgenunabhängigen Tumorprogress unterhalten (Koochekpour 2010). Neben der gesteigerten Expression des AR konnte auch eine erhöhte Stabilität des Genprodukts in wiederkehrenden Tumoren nachgewiesen werden. Zudem wurde der AR in diesen Tumorzellen vermehrt in den Zellkernen lokalisiert. Diese Faktoren führten zusammen mit der gesteigerten Expressionsrate zu einer Hypersensibilität des AR gegenüber niedrigen Androgenkonzentrationen (Gregory et al. 2001).

Eine weitere Ursache für die Reaktivierung des AR stellen Mutationen des Rezeptors dar. Diese bewirken neben einer gesteigerten Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber den Liganden auch eine Erweiterung des Ligandenspektrums um verschiedene andere Steroidhormone (zum Beispiel Progesteron, Östrogen, Cortisol) oder sogar bestimmte Antiandrogene. So führt beispielsweise die somatische AR-Mutation T877A zu einer Aktivierung des Rezeptors durch Flutamid (Knudsen und Penning 2010). Im Fall der Antiandrogene scheint zudem die Hypothese bestätigt, dass die Therapeutika selbst bestimmte Mutationen des AR auslösen, die zum Beispiel eine veränderte Stabilität oder Ligandenspezifität des Rezeptors zur Folge haben (Steinkamp et al. 2009).

Neben den Mutationen führt auch posttranskriptionales alternatives *Splicing* im Prostatakarzinom zu einer Veränderung der AR-Struktur. Der Rezeptor weist nach diesem Prozess unter anderem einen Verlust der Liganden-bindenden Domäne auf und befindet sich dadurch permanent in einem aktivierten Zustand. Diese *Splicing*-Varianten des AR konnten vermehrt im kastrationsresistenten Prostatakarzinom nachgewiesen

---

werden und entgehen nicht nur der Abhängigkeit von ihren Liganden, sondern auch der Blockade durch die Antiandrogene, die die Liganden-bindende Domäne benötigen, um den Rezeptor zu hemmen (Knudsen und Penning 2010).

Ein weiterer der bereits bekannten Wege zur AR-Reaktivierung führt über die posttranslationale Modifikation. Dieser einerseits physiologische Prozess beeinflusst unter anderem durch Phosphorylierung oder Acetylierung die Stabilität, Aktivität und die spezifischen regulatorischen Eigenschaften der Steroidrezeptoren (Faus und Haendler 2006). Im Prostatakarzinom konnte eine posttranslationale Phosphorylierung des AR durch den deregulierten epidermalen Wachstumsfaktor EGF nachgewiesen werden, die in einer kastrationsresistenten Aktivität des Rezeptors resultiert. Andere Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGF-1 steigern die AR-Aktivität bei niedriger Ligandenverfügbarkeit, sodass insgesamt unter bestimmten Umständen eine Beeinflussung der Rezeptoraktivität durch Wachstumsfaktoren angenommen wird (Knudsen und Penning 2010).

Neben diesen den AR direkt betreffenden Mechanismen finden sich im Prostatakarzinom auch Aberrationen auf Ebene seiner Koaktivatoren, die ähnliche Effekte hervorrufen. So werden beispielsweise die Steroidrezeptor-Koaktivatoren SRC-1, SRC-3 und das AR-assoziierte Protein ARA70 im Prostatakarzinom überexprimiert, wobei dies ebenfalls eine Herabsetzung der AR-Aktivierungsschwelle bei niedriger Ligandenkonzentration oder eine agonistische Wirkung der Antiandrogene am Rezeptor zur Folge hat (Heinlein und Chang 2004). Unter den zahlreichen weiteren für die AR-Reaktivierung relevanten Kofaktoren befindet sich ein Transkriptionsfaktor, der eine Beeinflussung der Androgenachse sowohl über die direkte Bindung an den AR als auch unmittelbar auf Ebene des Tumormarkers PSA aufweist. Diese Eigenschaften des

---

ebenfalls im Prostatakarzinom überexprimierten Prostate-Derived-Ets-Factors (PDEF) sind auffallend und deuten auf seine besondere Relevanz in Pathogenese und Progression des Prostatakarzinoms hin. PDEF sollte daher in der vorliegenden experimentellen Arbeit näher charakterisiert werden.

### **1.4.2 Prostate-Derived-Ets-Factor (PDEF)**

PDEF gehört zur E twenty-six (Ets)-Familie, deren Mitglieder alle über eine sogenannte Ets-Domäne verfügen, über die sie mit hoher Affinität an bestimmte DNA-Sequenzen binden (Wasylyk et al. 1998). Sie agieren demnach als Transkriptionsfaktoren und kontrollieren zahlreiche Gene, die eine Rolle bei Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose, Angiogenese, Migration und Invasion spielen. Auch mit verschiedenen malignen Entartungen können die Ets-Faktoren in Zusammenhang gebracht werden. So kommt es im Rahmen der Tumorgenese zu Überexpression oder Verlust bestimmter Mitglieder der Ets-Familie (Sementchenko und Watson 2000).

PDEF kann nur in wenigen primär hormonabhängigen epithelialen Geweben des Körpers nachgewiesen werden. Geringe Mengen seiner Transkripte finden sich beispielsweise in Ovar, Brust- und Speicheldrüse. In der Prostata dagegen zeigt sich eine relativ hohe Expression des Gens. Zudem wird PDEF hauptsächlich in Zellen exprimiert, in denen auch die Expression des AR lokalisiert ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass zwischen PDEF und dem AR eine direkte Interaktion über die Ausbildung von Heterodimeren stattfindet. Über dieses Phänomen kommt es zu einer synergistischen Steigerung der Transkription von PSA, einem Zielgen des aktivierten AR. Des Weiteren ließ sich auch eine direkte Bindung von PDEF an den Promotor des

---

PSA-Gens nachweisen, die ebenfalls in einer gesteigerten Expression des Tumormarkers resultiert. Dies stellt einen androgenunabhängigen Weg der PSA-Genexpression dar, der möglicherweise eine Rolle im fortgeschrittenen Prostatakarzinom spielt. Nachdem PDEF wie zuvor beschrieben nur in wenigen gesunden Geweben des Körpers vorkommt, konnte es im Rahmen einer malignen Entartung auch in anderen Organen, wie beispielsweise Lunge, Kolon und Uterus, nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine (Über-)Expression des Gens im Rahmen von Malignomentstehung und -progression hindeuten (Oettgen et al. 2000). Untersuchungen zu diesem Zusammenhang fanden bisher vorrangig in epithelialen Brust- und Prostatazellen statt, wobei die Effekte von PDEF in der Literatur gegenwärtig sehr kontrovers diskutiert werden.

Einerseits beschreiben Turner et al. einen Verlust der PDEF-Expression in invasiven Brustkrebszellen. Kommt es jedoch zu einer induzierten Reexpression des Gens, führt dies zu einer verminderten Migration und Invasivität der Zellen (Turner et al. 2007). Gu et al. haben PDEF auch in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und LNCaP untersucht und beschreiben für beide Zellmodelle eine verminderte Zelladhäsion bei Herunterregulierung des Gens. Für die AR-negativen PC-3-Zellen konnte außerdem eine gesteigerte Migration und Invasivität bei verminderter PDEF-Expression nachgewiesen werden. Eine PDEF-Überexpression führte in dieser Zelllinie dagegen zu einer verminderten Invasivität. Eine vergleichbare Abnahme von Migration und Invasivität wies die Arbeitsgruppe auch für bestimmte invasive Brustkrebszellen nach (Gu et al. 2007).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Gunawardane et al. in benignen epithelialen Mammazellen durch eine erhöhte PDEF-Expression eine gesteigerte

---

Zellmigration auslösen, die durch Koexpression bestimmter Wachstumsfaktor-Rezeptoren (ErbB2 und CSF-1R) noch maximiert werden konnte. Die Invasivität dieser Zellen ließ sich durch die alleinige Überexpression von PDEF dagegen nicht signifikant steigern, erst bei Koexpression von ErbB2 oder CSF-1R entwickelte sich ein hochinvasiver Phänotyp. Neben diesen Befunden zeigte sich in entarteten epithelialen Mammazellen während der Tumorprogression eine Überexpression von PDEF (Gunawardane et al. 2005). Sood et al. haben die PDEF-Expression in benignem Brust- und Prostatagewebe mit der in entartetem Gewebe beider Organe verglichen. Sowohl in Mamma- als auch in Prostatakarzinomzellen zeigte sich dabei eine Überexpression des Gens. Zudem fand sich mit zunehmender Malignität der Prostatakarzinom-Phänotypen ein relativ höheres Expressionsniveau von PDEF, sodass also eine Korrelation zwischen Tumorstadium und Expressionsrate bestand. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Androgenabhängigkeit der PDEF-Expression untersucht. Nach Stimulation der hormonsensiblen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP mit dem Dihydrotestosteron-Analogon R1881 ließ sich ein Anstieg von PDEF sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachweisen (Sood et al. 2007).

Diese zum Teil widersprüchlichen Befunde deuten dennoch darauf hin, dass die aberrante Expression von PDEF das Prostatakarzinom und möglicherweise auch andere Malignome in Pathogenese und Progression beeinflusst. Die tatsächliche Funktion in den individuellen Malignomen muss aber noch weiter geklärt werden. Im Folgenden werden Prostatakarzinom-relevante Gene vorgestellt, die im funktionellen Zusammenhang mit PDEF stehen und in den Funktionsanalysen dieser Arbeit eine Reaktion auf dessen Expressionsverminderung durch RNA-Interferenz zeigten. Dies

---

ermöglichte eine weitere Charakterisierung der PDEF-Funktion im androgensensiblen Prostatakarzinom.

### **1.4.3 Das Prostata-spezifische Antigen (PSA)**

PSA, eigentlich Kallikrein 3 (hKLLK3), ist eine Serinprotease, die exklusiv von den epithelialen Zellen der Prostata sezerniert wird. Seine Hauptaufgabe besteht in der Verflüssigung des Samenkoagels bei der Ejakulation. Während normalerweise nur geringe Mengen PSA durch Leckage in das Blutserum gelangen, kommt es im Rahmen einer malignen Entartung durch die sich verändernden Organstrukturen zu einer aktiven Sekretion von PSA in den Extrazellularraum und in den Blutkreislauf (Stenman et al. 1999). Aus diesem Grund ist das PSA gegenwärtig der bekannteste biochemische Marker für die Entartung der Prostata. Die Einführung der PSA-Bestimmung im Serum Anfang der Achtziger Jahre ermöglichte beim Screening die Entdeckung eines erheblich höheren Anteils der Prostatakarzinome. Zudem führte der Test zur Erkennung des Malignoms in einem früheren, in 80% noch auf das Organ begrenzten Stadium. Bei hoher Sensitivität bis über 90% besteht jedoch eine geringe Spezifität des Tests, so kann zum Beispiel auch die Benigne Prostatahyperplasie (BPH) oder die Prostatitis zu einer Erhöhung des PSA-Werts führen (Hernandez und Thompson 2004, Steuber et al. 2006). Diese geringe Spezifität ist der Grund für die andauernde Suche nach weiteren potenziellen Tumormarkern, die die PSA-Bestimmung ergänzen oder gar ersetzen könnten (Laxman et al. 2008).

Die PSA-Expression unterliegt immer der Stimulation durch Androgene. Im Promotor des Gens wurden verschiedene Regionen identifiziert, sogenannte *androgen-response*

---

*elements* (AREs), mit denen der aktivierte AR interagiert und dadurch die Genexpression einleitet (Cleutjens et al. 1996). Bei erfolgreicher antiandrogener Therapie des Prostatakarzinoms lassen sich demzufolge in der Regel abfallende PSA-Werte im Serum ermitteln. Kommt es im Verlauf jedoch zur AR-Reaktivierung, zeigt sich hierunter ein Wiederanstieg der PSA-Expression (Wang et al. 2003).

#### **1.4.4 Prostate Cancer Gene 3 (PCA3)**

PCA3 wurde ursprünglich als DD3 bezeichnet und als differenziell exprimierter Marker im Prostatakarzinom entdeckt. Seine Expression konnte bislang in keinem anderen menschlichen Gewebe nachgewiesen werden. Im gesunden Prostatagewebe wird es ebenfalls nicht oder nur in äußerst geringen Mengen exprimiert (Bussemakers et al. 1999). Sind die Zellen jedoch maligne entartet, ist die Expression von PCA3 deutlich gesteigert. In diesem Fall korreliert die Höhe der Expression mit dem Malignitätsgrad des Tumors (Kamradt et al. 2003). In der Spezifität für das Prostatakarzinom ist PCA3 dem PSA, das im Gegensatz auch bei BPH und Prostatitis erhöht sein kann, deutlich überlegen. Hieraus resultiert seine Verwendung als neu etablierter Tumormarker, wofür seine Quantifizierung nach Prostatamassage im Urinsediment vorgenommen wird. Diese Methode stellt eine wertvolle Ergänzung beziehungsweise Alternative zur Prostatabiopsie bei erhöhten PSA-Serumwerten dar (Hessels und Schalken 2009).

Die Funktion von PCA3 ist aktuell noch ungeklärt. Da jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Genprodukt nachgewiesen werden konnte, wird davon ausgegangen, dass es sich um eine nicht-kodierende *messenger* RNA handelt (Schalken et al. 2003). Zwischen PCA3 und der Androgenachse besteht eine enge Verknüpfung. So lässt sich

---

die Expression des Gens nur in malignen Prostatazellen nachweisen, in denen auch der AR und PSA exprimiert werden (van Bokhoven et al. 2003).

#### **1.4.5 Die Insulin-like-Growth-Factor (IGF)-Familie**

Eine weitere wichtige Funktion in der Molekularbiologie des Prostatakarzinoms hat die IGF-Familie. Sie umfasst Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, die in vielen verschiedenen Geweben des Körpers produziert werden und in ihrer Struktur und Funktion dem Insulin gleichen. Neben zwei Peptiden, IGF-1 und IGF-2, existieren zwei Zelloberflächen-Rezeptoren, IGF-1-Rezeptor (IGF-1R) und IGF-2-Rezeptor (IGF-2R). Außerdem sind sechs hochaffine IGF-bindende Proteine (IGFBP-1 bis IGFBP-6) bekannt, die die Bioverfügbarkeit der IGFs regulieren (Russell et al. 1998).

Auch das Prostatagewebe wird durch die IGF-Familie beeinflusst. Sowohl IGF-1 als auch IGF-2 können Wachstum und Proliferation von epithelialen Prostatazellen steigern. Während für IGF-2 keine Korrelation besteht, gehen hohe IGF-1-Plasmaspiegel mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für das Prostatakarzinom einher (Chan et al. 1998). Der IGF-1R hat zudem nach Aktivierung durch seine Liganden IGF-1 und IGF-2 zusätzlich einen antiapoptotischen Effekt sowohl auf benigne als auch auf entartete Prostatazellen. So führt eine Herunterregulierung des IGF-1R in Tumorzellen zu massivem Zellsterben (Baserga 1999). IGFBP-3 dagegen inhibiert das Zellwachstum. Dies geschieht auf der einen Seite über die Bindung und verminderte Bioverfügbarkeit von IGF-1 und andererseits auch über einen IGF-unabhängigen Mechanismus. Dabei konnte für IGFBP-3 eine proapoptotische Wirkung über einen eigenen IGFBP-3-Rezeptor nachgewiesen werden (Rajah et al. 1997).

---

Unter Hormontzug kann eine Aktivierung des AR alternativ auch über die IGF-Achse erfolgen. Auch der in diesem Fall durch IGF-1 vermittelten Aktivierung folgt die übliche Stimulation der PSA-Expression durch den AR (Culig et al. 1994). Die vielfältigen Verflechtungen von IGF- und Androgenachse werden außerdem daran deutlich, dass für PSA wiederum eine Proteaseaktivität gegenüber IGFBP-3 besteht, die in einer Spaltung des Proteins resultiert (Cohen et al. 1992). Im Prostatakarzinom ist die Expression von IGF-1, IGF-2 und IGF-1R deutlich gesteigert, die des IGFBP-3 dagegen vermindert (Nickerson et al. 2001).

#### **1.4.6 NKX3.1**

NKX3.1 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des epithelialen Prostatagewebes spielt (Simmons und Horowitz 2006). Seine Bedeutung für die Prostatakarzinom-Entstehung und -Progression wird in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. NKX3.1 reguliert unter anderem die Proliferation der epithelialen Prostatazellen und ein Verlust des Gens resultiert in Hyperplasie und Dysplasie des Gewebes (Bhatia-Gaur et al. 1999). Ein Verlust der NKX3.1-Expression konnte in einem signifikanten Anteil früher Prostatakarzinome nachgewiesen werden und korrelierte mit dem Progress des Tumors, was zu der Annahme führte, dass NKX3.1 ein Tumorsuppressorgen sei (Bowen et al. 2000).

Auf der anderen Seite weisen Prostatakarzinomzellen vor allem im fortgeschrittenen, organüberschreitenden Stadium vermehrt eine Überexpression des Gens auf (Xu et al. 2000). Possner et al. konnten eine gesteigerte NKX3.1-Expression nach Stimulation von hormonsensitiven LNCaP-Prostatakarzinomzellen mit dem Androgen

---

Dihydrotestosteron aufzeigen. Die Applikation von Tectorigenin, einem Phytoöstrogen mit suppressiven Eigenschaften im Prostatakarzinom, bewirkte wiederum ein vermindertes Vorkommen von NKX3.1. Neben diesen Befunden sprach eine Abnahme von AR und PSA auf mRNA- und Proteinebene infolge der direkten Herunterregulierung von NKX3.1 mit siRNA gegen die Funktion von NKX3.1 als Tumorsuppressorgen (Possner et al. 2008).

---

## 2 Das Ziel dieser Arbeit

Die Hauptproblematik in der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms besteht in der Androgenunabhängigkeit, die sich früher oder später unter antiandrogener Therapie ausbildet. Das zentrale Problem in dieser Entwicklung stellt die Reaktivierung des AR dar. Einerseits erlaubt die Amplifikation des AR-Gens und die damit verbundene vermehrte Expression des Rezeptors den Androgenen, auch in sehr niedrigen Konzentrationen als Liganden zu wirken und somit den Tumorprogress zu unterhalten. Mutationen des AR erweitern zudem das Ligandenspektrum um alternative körpereigene Steroidhormone oder sogar die Antiandrogene. Neben weiteren den AR betreffenden Mechanismen ruft auch die Überexpression multipler Koaktivatoren des Rezeptors ähnliche Effekte hervor. Dem Transkriptionsfaktor PDEF konnte eine direkte Interaktion mit dem AR nachgewiesen werden, die eine synergistische Steigerung der PSA-Expression zur Folge hat. Darüber hinaus findet eine direkte Bindung von PDEF an den PSA-Promotor statt, die in einer androgenunabhängigen PSA-Expression resultiert. Die Vermutung, dass PDEF aufgrund dieser Eigenschaften eine wichtige Rolle in Genese und Progression des Prostatakarzinoms spielt, wird durch seine Überexpression in diesem Malignom bekräftigt. In anderen Organen wurde PDEF bereits als deutlich tumorassoziierter Marker identifiziert (Ghadersohi et al. 2004). Daneben hatte sich in früheren eigenen Arbeiten zum Prostatakarzinom eine Herunterregulierung von PDEF im Rahmen der positiven Effekte von Valproat oder Tectorigenin auf die Expression anderer bedeutender Gene gezeigt (Thelen et al. 2004, Thelen et al. 2005). In aktuellen Untersuchungen insbesondere in Hinblick auf Migration und Invasion von Tumorzellen wird PDEF jedoch weiterhin kontrovers diskutiert. Einerseits konnte bei Über- oder Reexpression des Gens in AR-negativen

---

PC-3-Prostatakarzinomzellen und invasiven Mammakarzinomzellen eine herabgesetzte Invasivität beziehungsweise Migration und Invasivität nachgewiesen werden. Eine verminderte Expression von PDEF dagegen führte in PC-3- und LNCaP-Prostatakarzinomzellen zu einer herabgesetzten Zelladhäsion, wobei für die PC-3-Zellen auch eine gesteigerte Migration und Invasivität aufgezeigt wurde.

Andererseits ließ sich in benignen epithelialen Mammazellen durch eine erhöhte PDEF-Expression eine Steigerung der Zellmigration und, in Gegenwart bestimmter Wachstumsfaktor-Rezeptoren, auch der Invasivität erzielen. Dennoch konnte sowohl in Mamma- als auch in Prostatakarzinomzellen eine Überexpression von PDEF nachgewiesen werden, wobei im Prostatakarzinom eine Korrelation zwischen Tumorstadium und Expressionsrate bestand.

Diese Befunde erlauben aufgrund ihrer Heterogenität keine endgültige Einordnung von PDEF in den Kontext mit Pathogenese und Progression des Prostatakarzinoms. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Transkriptionsfaktor und sein Zusammenspiel mit den multiplen anderen am Tumorgeschehen beteiligten Faktoren besser zu charakterisieren. Aus diesem Grund wurde PDEF in der vorliegenden Arbeit gezielt in der für das Prostatakarzinom repräsentativen AR-positiven Zelllinie LNCaP herunterreguliert, um dessen Funktion in einem relevanten Zellmodell zu untersuchen. Die zugrundeliegende Technik der RNA-Interferenz stellt gegenwärtig die am häufigsten genutzte Methode für funktionelle Genanalysen dar und basiert auf der sequenzspezifischen Herunterregulierung einzelner Gene mittels doppelsträngiger RNA-Moleküle. Die anschließenden Expressionsanalysen Prostatakarzinom-assoziiierter Gene sollten einen weiteren Einblick in die Funktion von PDEF ermöglichen und

klären, ob es einen potenziellen Ansatzpunkt für alternative Therapiemethoden des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms darstellen könnte.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Die Zelllinie LNCaP

Die LNCaP-Zellen stellen eine bekannte Zelllinie in der experimentellen Forschung auf dem Gebiet des Prostatakarzinoms dar. Da mit der Expression von AR, PSA, PDEF und weiteren Genen viele Parallelen mit dem klinischen Erscheinungsbild des androgenabhängigen Prostatakarzinoms bestehen, diente diese hormonsensible Zellreihe als Grundlage für die nachfolgenden Versuche.

LNCaP-Zellen wurden erstmalig 1977 aus einer supraklavikulären Lymphknoten-Metastase eines 50-jährigen Mannes mit Prostatakarzinom gewonnen (*lymph node of cancer of the prostate* = LNCaP). Sie weisen einen aneuploiden männlichen Karyotyp mit 76 bis 91 Chromosomen auf. Sowohl im Zytosol als auch im Nukleus dieser Zellen lässt sich ein hochaffiner AR nachweisen. Auf Stimulation mit 5-alpha-Dihydrotestosteron reagieren die Zellen mit einsetzendem Wachstum und der Produktion saurer Phosphatase, womit sich die Androgensensibilität dieser Zellreihe demonstrieren lässt (Horoszewicz et al. 1983).

Bei den LNCaP-Zellen handelt es sich um adhärente epitheliale Zellen, die mit einer Verdopplungszeit von 60 Stunden in Aggregaten oder auch einzeln wachsen. Für die Versuche dieser Arbeit wurden sie bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% im Feuchtinkubator kultiviert (Heraeus, Hanau, Deutschland). Als Medium diente RPMI 1640 (PAN-Systems, Nürnberg, Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum (PAA, Cölbe, Deutschland), 1% L-Glutamin, 2% Aminosäurelösung und 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma<sup>®</sup>, Taufkirchen, Deutschland).

### 3.2 RNA-Interferenz mit siRNA

Das Verfahren der RNA-Interferenz, auch RNAi genannt, stellt gegenwärtig die am häufigsten genutzte Methode dar, um die Expression einzelner Gene zu unterdrücken. Das zugrundeliegende Phänomen wurde erstmals 1999 von Fire beschrieben, der durch Injektion doppelsträngiger RNA-Moleküle in Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) eine effiziente sequenzspezifische Herunterregulierung bestimmter Gene erzielen konnte (Fire 1999). In den darauffolgenden Jahren konnte dieses experimentelle *gene silencing* auch in weiteren Spezies nachgewiesen werden, einschließlich zahlreicher Eukaryoten wie Pilzen, Fruchtfliegen, Mäusen und schließlich auch menschlicher Zelllinien.

RNA-Interferenz stellt einen natürlichen Mechanismus der Zellen dar, der posttranskriptional stattfindet und durch die Unterdrückung spezifischer mRNA-Sequenzen die Translation derselben und somit die Entstehung des Genprodukts verhindert beziehungsweise stark reduziert. Ursprünglich dient dies der Aufrechterhaltung der Genomstabilität, indem beispielsweise mutagene Effekte von Transposons oder repetitive Sequenzen blockiert werden. Zudem stellt *gene silencing* eine wichtige Komponente des viralen Abwehrsystems dar. Trigger für die Aktivierung der RNA-Interferenz sind doppelsträngige RNA-Moleküle, die zum Beispiel fehlerhaft transkribierte Sequenzen oder virale RNA enthalten. Nach Erkennen eines solchen RNA-Moleküls läuft der Prozess der RNA-Interferenz in zwei Schritten ab (Abb.2). Im ersten Initiationsschritt wird die Doppelstrang-RNA durch eine spezielle RNase, den sogenannten *Dicer*, in kurze doppelsträngige RNA-Moleküle zerschnitten. Diese Moleküle bestehen aus 21 bis 23 Nukleotiden und werden als *small interfering RNA* (siRNA) bezeichnet. Im zweiten Effektorschritt wird die siRNA in den sogenannten *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) eingebunden. Eine RISC-assoziierte

Helikaseaktivität entwindet anschließend den Doppelstrang, sodass einer der beiden siRNA-Stränge den RISC zu seiner komplementären mRNA-Sequenz geleiten kann. Der RISC bindet schließlich über die siRNA an den komplementären mRNA-Abschnitt, der in der Folge herausgetrennt und abgebaut wird (Hannon 2002, Dykxhoorn et al. 2003). Anschließend ist das Ablesen dieser mRNA-Sequenz und seine Translation in das spezifische Protein nicht mehr möglich.

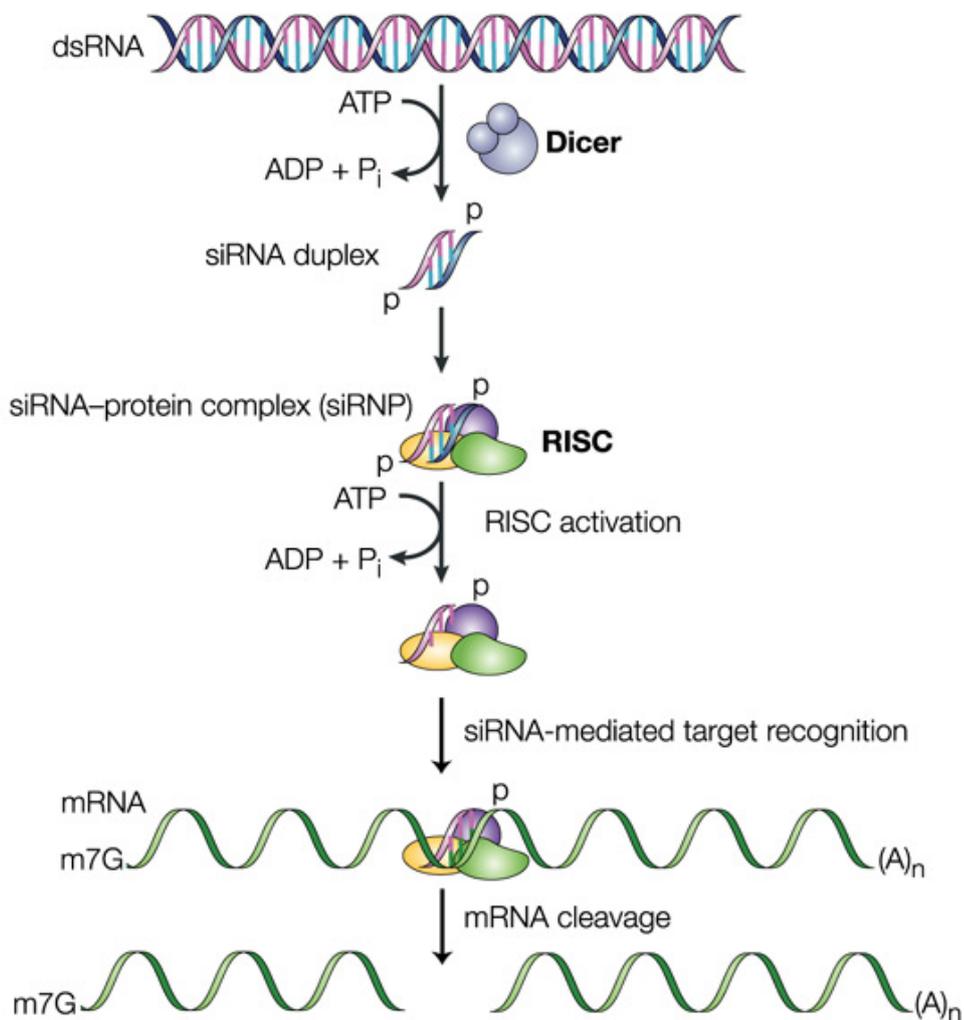


Abb.2: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz (Auszug aus: Dykxhoorn et al. 2003, Seite 458)

---

Für die Funktionsanalyse eines bestimmten Gens kommt in der molekularbiologischen Forschung synthetisch hergestellte siRNA zum Einsatz, die üblicherweise mittels Transfektion, Mikroinjektion oder Elektroporation in die Zielzelle transferiert wird. Für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuche wurde die im folgenden Kapitel beschriebene Methode der Transfektion gewählt.

Um unspezifische Effekte auf die Genexpression in der Zielzelle durch den Vorgang der Transfektion mit siRNA zu kontrollieren, sollte bei den Versuchen immer eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Hierfür eignet sich beispielsweise die Transfektion mit einer weiteren siRNA, für die kein komplementäres Transkript in der Zielzelle vorliegt. Für diese Kontrolle wurde siRNA gegen das Luciferasegen verwendet. Luciferase ist ein Enzym, das im nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* vorkommt und ihm über eine Decarboxylierungsreaktion seine Biolumineszenz ermöglicht. Durch sein einzigartiges Vorkommen in dieser Spezies hat das Luciferasegen sich als geeignetes Kontrollgen bei vielen Versuchen etabliert.

### **3.3 Die Transfektion**

#### **3.3.1 Vorbereitung der Zellen auf die Transfektion: Ausplattieren**

Bei der Kultivierung von LNCaP-Zellen kommt es in der Regel über Proteinbrücken zu einer Anhaftung der Zellen in Aggregaten am Boden der Kulturflasche. Als erster Schritt des Ausplattierens erfolgte deshalb das Absaugen des RPMI-Überstands, wobei die adhärenen Zellen am Grund der Kulturflasche zurückblieben. Anschließend wurden 2 ml Trypsin (Sigma<sup>®</sup>, Taufkirchen, Deutschland) auf die Zellen gegeben. Trypsin ist

eine Serinprotease, die somit Eiweißbindungen an spezifischer Stelle spaltet. Werden Zellen dem Trypsin nur kurzzeitig ausgesetzt, bleiben sie selbst unbeschadet, während extrazelluläre Proteine, in diesem Fall die Proteinbrücken, gespalten werden. Nachdem die Zellen nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten erfolgreich voneinander und vom Boden der Kulturflasche gelöst worden waren, wurden zur Verdünnung zusätzlich 2 ml RPMI in die Kulturflasche gegeben. Anschließend wurde der gesamte Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach einer Spülung der Zellkulturflasche mit weiteren 2 ml Medium und Übertragen der Spülflüssigkeit in das Zentrifugenröhrchen erfolgte die Zentrifugation bei  $1,9 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$  für zehn Minuten. Anschließend konnte der Überstand des am Boden des Zentrifugenröhrchens befindlichen Zellpellets abgesaugt werden und es folgte eine Resuspension der Zellen mit 4 ml RPMI 1640. Nach Zählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer wurden nach entsprechender Verdünnung für jede geplante Transfektion 2,5 ml Medium mit  $8 \times 10^4$  Zellen in je einen Napf einer 6-Napfplatte gegeben. Nach 24 Stunden hafteten die Zellen wieder ausreichend am Boden der Platte, sodass die Transfektion erfolgen konnte.

### 3.3.2 Experimentelle Durchführung der Transfektion

Als Grundlage für die Transfektion diente das Protokoll des Herstellers für das Oligofectamine™-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), das aber vor allem für die Waschschritte und die Inkubationszeit stark modifiziert wurde.

Zu Beginn der Transfektion wurde Opti-MEM® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), ein Kulturmedium, 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Für jede Probe wurden anschließend 15 µl Opti-MEM® mit 3 µl Oligofectamine™ in einem

---

Eppendorfgefäß zusammengegeben und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Oligofectamine™ ist ein Reagenz, das Oligonukleotide (zum Beispiel siRNA) bindet und in eukaryote Zellen schleust. Parallel wurden in einem weiteren Eppendorfgefäß 175 µl Opti-MEM® mit 10 µl siRNA gegen das Gen PDEF (siPDEF, Stealth™ siRNA duplex oligoribonucleotides, Invitrogen, Paisley, Großbritannien) versetzt. Für die Kontrolltransfektion wurde die gleiche Menge siRNA gegen das Luciferasegen verwendet (siLuc, EUROGENTEC, Seraing, Belgien). Abschließend wurden jeweils 18 µl des Opti-MEM®/Oligofectamine™-Gemisches zu der Lösung mit der jeweiligen siRNA gegeben. Der dadurch entstandene Transfektionsansatz benötigte weitere 20 Minuten zur Inkubation bei Raumtemperatur.

Die am Vortag ausplattierten LNCaP-Zellen wurden einmalig mit 800 µl RPMI 1640 gewaschen. Anschließend wurde die gleiche Menge an Medium wieder hinzugefügt und nach ausreichender Inkubation der entsprechende Transfektionsansatz gegen PDEF beziehungsweise Luciferase auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden daraufhin im Feuchtinkubator gelagert und nach vier Stunden erneut mit 500 µl RPMI 1640 versorgt. Nach weiteren 40 Stunden im Feuchtinkubator wurde das gesamte Medium ausgetauscht, wobei der dadurch von den Zellen entfernte Transfektionsansatz in einem Eppendorfgefäß aufgefangen wurde und später der Quantifizierung des PSA-Proteins diente. Es folgte eine weitere 17-stündige Inkubationszeit, bevor anschließend die Isolierung der RNA stattfinden konnte.

### 3.4 RNA-Isolierung und RNA-Quantifizierung

Nachdem die Transfektion der LNCaP-Zellen mit der siRNA erfolgt und die Gesamtkubationszeit von 61 Stunden abgelaufen war, wurde die RNA aus den Zellen isoliert. Hierfür wurden diese erneut mithilfe von 2 ml Trypsin je Napf vom Boden der 6-Napfplatte gelöst und mit 2 ml RPMI 1640-Medium jeweils in ein Zentrifugenröhrchen übertragen. Nach Zentrifugation bei  $1,9 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$  für zehn Minuten und Absaugen des Überstands befand sich jeweils nur noch das Zellpellet in den Röhrchen. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung mit dem Qiagen® RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

Der erste Schritt umfasst zunächst die Lyse der Zellen durch RLT-Puffer in Gegenwart des RNase-Inaktivators Mercaptoethanol (Sigma®, Taufkirchen, Deutschland). Die makromolekularen zellulären Bestandteile werden anschließend durch Zentrifugation von der RNA getrennt, die im folgenden Schritt an die Matrix der RNeasy-Minisäule bindet und durch darauffolgende Waschkvorgänge von Salzen, Metaboliten und anderen makromolekularen Zellkomponenten befreit wird. Abschließend wird die RNA durch 50 µl RNase-freies Wasser von der Matrix der Minisäule eluiert und liegt darin gelöst in einem Eppendorfgefäß vor.

Die isolierte RNA stellt ein Gemisch aus ribosomaler RNA, transfer RNA, *messenger* RNA (mRNA) und anderen dar, wobei nur die mRNA als Analyt für die quantitative Polymerasekettenreaktion (PCR) dient. Bevor nun weitere Schritte zur Durchführung der PCR unternommen werden können, muss die RNA auf mögliche Degradationen untersucht und ihre Konzentration bestimmt werden. Dies erfolgte aus jeweils 1 µl der RNA-Proben mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies,

---

Waldbronn, Deutschland) und des dazugehörigen RNA 6000 Nano LabChip<sup>®</sup> Kits (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Für die Messungen wird die RNA zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und schließlich mittels Fluoreszenz ein Elektropherogramm und ein Gel-Bild erstellt. Hierüber können die oben genannten Parameter ermittelt werden, sodass am Ende des Messvorgangs ein absoluter Wert für den RNA-Gehalt pro 1 µl Probe vorliegt.

### **3.5 Reverse Transkription**

Als Ausgangsmaterial für die PCR wird komplementäre DNA (cDNA) benötigt, weshalb die gewonnene RNA zunächst mithilfe der Reversen Transkription in diese umgeschrieben werden muss. Die Reverse Transkription wird durch das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert, das ursprünglich in Retroviren vorkommt und im Rahmen der Virusvermehrung in der Wirtszelle die retrovirale RNA in cDNA umschreibt. Der Ablauf der Reversen Transkription beinhaltet folgende Schritte: RNA und Primer werden zusammen auf 70°C erhitzt, wobei die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen werden. In der anschließenden Auskühlphase bis auf Raumtemperatur kommt es zur Anlagerung der Primer an die RNA (Hybridisierung). Durch Zugabe von Puffern, Nucleotiden, RNase-Inhibitoren und Reverse Transkriptase kann nun bei 37°C die circa eine Stunde dauernde Synthese eines zur RNA komplementären DNA-Strangs erfolgen (Mülhardt 2006).

Das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA erfolgte mithilfe des Omniskript<sup>®</sup> RT Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) im Thermocycler Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (GenTech, New York, USA). Für ein Gesamtvolumen von 20 µl

---

wurden zunächst 5,8 µl Mastermix nach Vorgabe des Herstellers unter Verwendung von Random Primer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) erstellt. Die übrigen 14,2 µl setzten sich aus dem jeweiligen Volumen der RNA-Lösung, in dem 500 ng RNA enthalten waren, und RNase-freiem Wasser zusammen. Nach Zugabe des Mastermixes wurde die Reverse Transkription nach folgendem Protokoll im Thermocycler durchgeführt: 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 37°C, 5 Minuten bei 93°C und Abkühlung auf 4°C. Das 20 µl umfassende Probenvolumen, das nun die neu entstandene cDNA enthielt, wurde mit DNase-freiem Puffer auf 100 µl aufgefüllt und stand anschließend für die nachfolgenden Versuche zur Verfügung.

### **3.6 Real-time-quantitative PCR (RT-PCR)**

Die RT-PCR stellt gegenwärtig das gebräuchlichste Verfahren zur Quantifizierung von Nucleinsäuren dar. Sie basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR), wobei durch den Einsatz eines fluoreszierenden Farbstoffs zusätzlich die quantitative Messung der neu entstandenen DNA ermöglicht wird. Das für die Versuche dieser Arbeit verwendete SYBR<sup>®</sup> Green I (QuantiTect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR Kit; EUROGENTEC, Seraing, Belgien) bindet an neu entstehende doppelsträngige DNA-Moleküle und emittiert dabei ein Fluoreszenzsignal. Dieses Signal wird in jedem Zyklus der RT-PCR am Ende der Elongationsphase detektiert, wobei seine Intensität proportional mit der Akkumulation des PCR-Produkts zunimmt. Eine PCR besteht aus bis zu 50 Zyklen und mehr, die jeweils in drei Phasen unterteilt werden. In der ersten Phase der Denaturierung findet bei 94°C die Aufspaltung der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge statt. Es folgt die

---

Annealingphase, in der sich die Primer unter Abkühlung auf eine für sie jeweils spezifische Temperatur an die DNA anlagern. In der abschließenden Elongationsphase wird schließlich am Primer beginnend der zu der einzelsträngigen DNA komplementäre Strang synthetisiert, wobei die Temperatur vom Arbeitsoptimum der verwendeten DNA-Polymerase abhängt.

### **3.6.1 Quantifizierung des RT-PCR-Produkts**

Die bei der RT-PCR gewonnenen Daten werden als sigmoide Kurve in einem Amplifikationsdiagramm dargestellt, in dem die Fluoreszenz (Y-Achse) gegen die Anzahl der Zyklen (X-Achse) aufgetragen wird. In den frühen Phasen der PCR findet eine weitgehend exponentielle Vervielfachung der DNA-Fragmente statt. Mit zunehmender Zyklenzahl kommt es vermehrt zu störenden Ereignissen, beispielsweise durch die temperaturbedingte Abnahme der Enzymaktivität und eine verminderte Verfügbarkeit der Ausgangsprodukte, wodurch die Synthese sich verlangsamt. Die Kurve zeigt nur noch ein lineares Wachstum und erreicht schließlich mit der Beendigung der Vervielfältigungsreaktion eine Plateauphase. Bevor die in der RT-PCR ermittelten Daten anschließend für die Quantifizierung der Genexpression verwendet werden können, bedarf es der Festlegung einer Ausgangslinie (Baseline) und eines Schwellenwerts (Threshold). Die Baseline ergibt sich in den Zyklen vor Anstieg des Fluoreszenzsignals aus der unspezifischen Basisfluoreszenz, die durch das Vorkommen großer Mengen doppelsträngiger DNA-Moleküle in der Ausgangsprobe ausgelöst werden kann. Der Threshold liegt oberhalb der Baseline und berechnet sich aus der zehnfachen Standardabweichung der Basisfluoreszenz. Die Zykluszahl, bei der die

Amplifikationskurve den Threshold schneidet, wird mit dem Ct-Wert (Ct Threshold Cycle) angegeben (Abb.3). Dieser ist umso kleiner, je mehr Zielsequenzen sich in der zu untersuchenden Probe befinden. Der Ct-Wert steht in direkter Beziehung zum Ausgangswert der DNA in den Proben und wird für die absolute Quantifizierung der Genexpression verwendet.

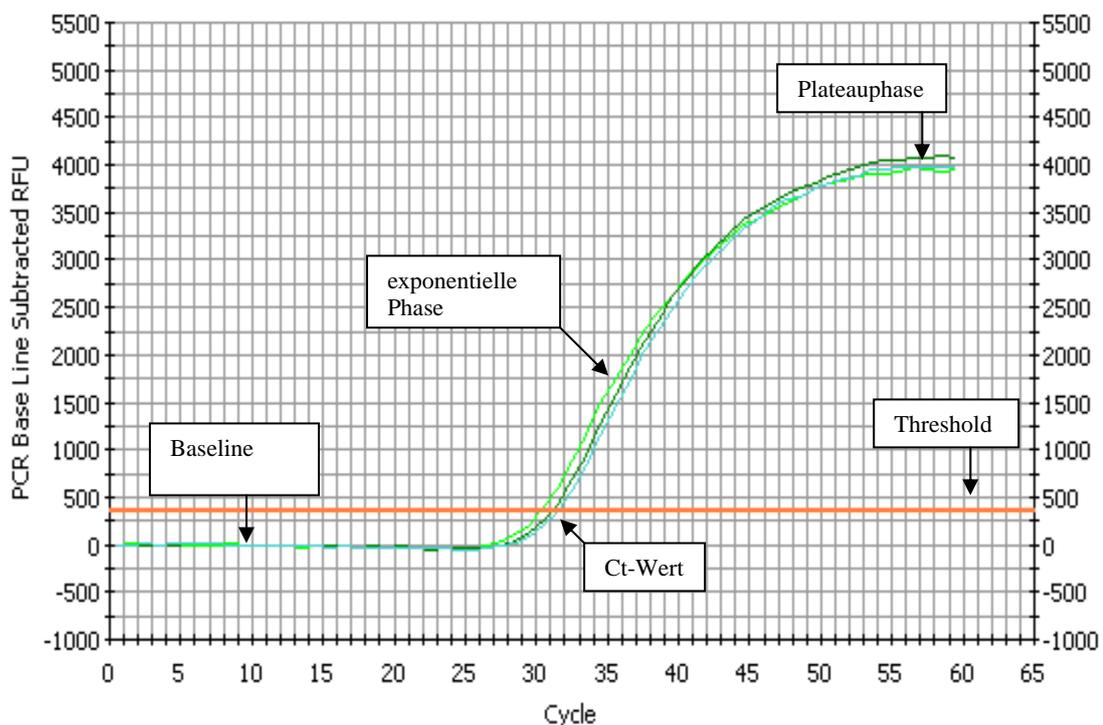


Abb.3: Amplifikationsdiagramm einer RT-PCR

Für die Erfassung des RT-PCR-Produkts stehen zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung: Die relative und die absolute Quantifizierung. Bei der erstgenannten Methode wird die Expression eines Zielgens durch den Vergleich mit der Expression eines nicht-regulierten Referenzgens ermittelt, wofür üblicherweise *Housekeeping*-Gene

---

betrachtet werden. *Housekeeping*-Gene werden in jeder menschlichen Zelle exprimiert und sichern die Basisfunktionen für das Überleben der Zelle (Velculescu et al. 1999). Dies geschieht unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen. In dieser Arbeit wurde als *Housekeeping*-Gen ARP (*acidic ribosomal protein*) mitgeführt, wobei dies nicht der relativen Quantifizierung sondern dem Ausschluss einer generellen Zellschädigung durch die RNA-Interferenz diene.

Während bei der relativen Quantifizierung zwei verschiedene Gene ins Verhältnis gesetzt werden, dient bei der absoluten Quantifizierung eine Standardkurve des zu untersuchenden Gens der Bestimmung des absoluten PCR-Produkts. Dafür wird eine logarithmische Verdünnungsreihe mindestens fünf verschiedener Konzentrationen für die Zielsequenz erstellt. Anschließend kann mithilfe der Ct-Werte und der dazugehörigen bekannten Zielsequenzkonzentrationen eine Standardkurve erstellt werden. Die Ct-Werte der zu untersuchenden Proben können anschließend über diese Kurve einer absoluten Produktkonzentration zugeordnet werden.

Am Ende jeder RT-PCR wird die Qualität des Produkts über die Schmelzpunktanalyse ermittelt. Dafür werden die Proben unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung langsam bis auf 95°C erwärmt. Bei der darunter stattfindenden Aufspaltung der doppelsträngigen DNA kommt es zur Dissoziation des SYBR<sup>®</sup> Green I, in deren Folge die Fluoreszenz nachlässt und die Schmelzpunktkurve abfällt. Der durch eine Differenzialfunktion als Gipfel der Schmelzpunktkurve (Peak) ermittelte Schmelzpunkt ist charakteristisch für das jeweilige RT-PCR-Produkt, wobei falsch amplifizierte Moleküle, beispielsweise Primer-Dimere, in der Regel einen niedrigeren Schmelzpunkt als das spezifische Amplikon aufweisen. Die Schmelzpunktkurve einer RT-PCR, in der ausschließlich das spezifische Produkt entstanden ist, ist demnach durch nur einen einzigen Peak bei einer

definierten Temperatur gekennzeichnet (Abb.4). Der Schmelzpunkt eines PCR-Produkts ist von dessen Länge und GC-Gehalt abhängig.

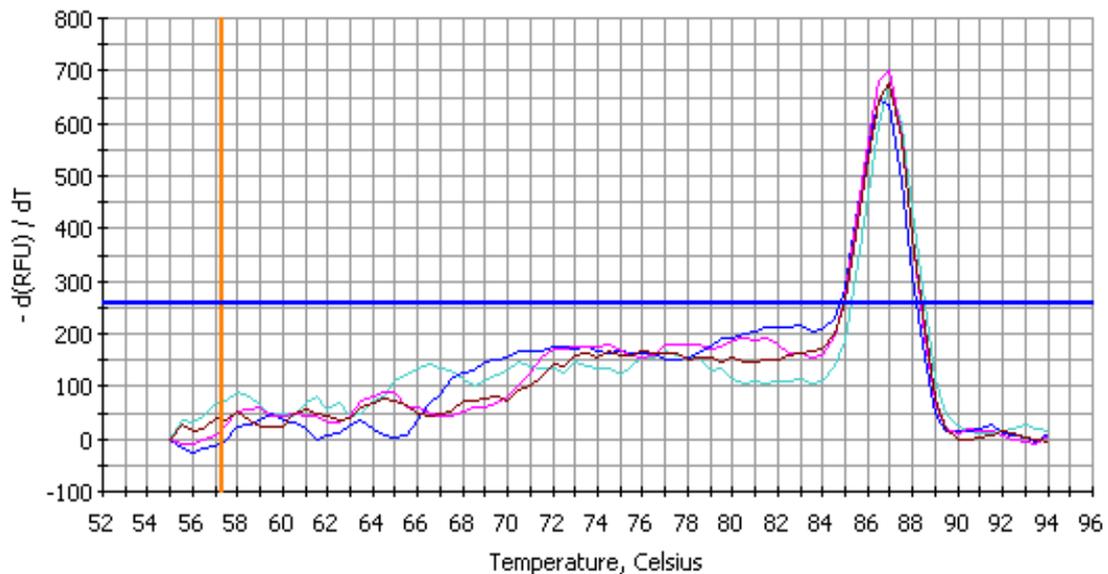


Abb.4: Schmelzpunktkurve einer RT-PCR

### 3.6.2 Experimentelle Durchführung der RT-PCR

Im Anschluss an die Reverse Transkription wurde mithilfe der dabei entstandenen cDNA die Expression folgender Gene durch die RT-PCR quantifiziert: PDEF, AR, PSA, PCA3, IGF-1, IGF-2, IGF-1R, IGFBP-3, NKX3.1 und ARP. Unter Verwendung des QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kits wurde zur Quantifizierung von PDEF folgender Reaktionsansatz erstellt: 1 µl Validated Primer (QIAGEN, Hilden, Deutschland), 10 µl Mastermix und 4 µl RNase-freies Wasser. Die RT-PCR-Ansätze aller übrigen Gene enthielten folgende Komponenten: je 0,2 µl der beiden spezifischen sense- und antisense-Primer (QIAGEN, Hilden, Deutschland), 10 µl Mastermix und 4,6

µl RNase-freies Wasser. Anschließend wurden jedem Ansatz 5 µl der synthetisierten cDNA zugefügt. Die bei jeder PCR mitgeführte cDNA-freie Kontrolle wurde stattdessen mit weiteren 5 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Die Amplifizierung der cDNA erfolgte mit dem iCycler Thermal Cycler (BioRad, München, Deutschland) nach folgendem Protokoll: 2 Minuten bei 50°C, 10 Minuten bei 95°C, 50 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 95°C und 1 Minute bei der primerspezifischen Annealingtemperatur. Für die darauffolgende Schmelzpunktanalyse wurde die Temperatur von 55°C ausgehend alle 10 Sekunden in 0,5°C-Schritten bis auf 95°C erhöht.

Nachdem die Amplifizierung und die anschließende Schmelzpunktanalyse abgeschlossen waren, wurde das erstellte Amplifikationsdiagramm unter Anwendung der iCycler IQ<sup>®</sup> Real-time-detection-Gerätesoftware (BioRad, München, Deutschland) bearbeitet und analysiert. Um mithilfe der ermittelten Ct-Werte die absolute Quantifizierung der Genexpression vornehmen zu können, musste zunächst aus der fünf Proben umfassenden Verdünnungsreihe die Standardkurve für die jeweilige Zielsequenz erstellt werden. Dies geschah mit Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), wobei die Kurve sich aus dem umgekehrt proportionalen Verhältnis zwischen Ct-Wert und dem Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge ergab. Mithilfe dieser Eichgerade konnten schließlich die absoluten DNA-Konzentrationen der unbekanntenen Proben bestimmt werden.

Der für die PDEF-Amplifikation verwendete Validated Primer ist bei Qiagen zu beziehen und seine spezifische Annealingtemperatur liegt bei 55°C (Hs\_SPDEF\_1\_SG QuantiTect Primer Assay, QT00073311, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Primer für die weiteren untersuchten Gene wurden mit dem primer3 on-line Primer-Design-

Programm bestimmt. In der nachfolgenden Tabelle wird ihre Sequenz und die jeweils dazugehörige primerspezifische Annealingtemperatur (AT) aufgeführt (Tab.1).

<b>Gen</b>	<b>sense-Primer-Sequenz</b>	<b>antisense-Primer-Sequenz</b>	<b>AT</b>
AR	5'-AGG AAC TCG ATC CTA TCA TTG C-3'	5'-CTG CCA TCA TTT CCG GAA-3'	61°C
PSA	5'-TGA ACC AGA GGA GTT CTT GAC-3'	5'-CCC CAG AAT CAC CCG AGC AG-3'	61°C
PCA3	5'-GGT GGG AAG GAC CTG ATG ATA C-3'	5'-GGG CGA GGC TCA TCG AT-3'	60°C
IGF-1	5'-TGG ATG CTC TTC AGT TCG GTG-3'	5'-AGG GGT GCG CAA TAC ATC T-3'	60°C
IGF-2	5'-CGT TGA GGAGTG CTG TTT CC-3'	5' GGA CTG CTT CCA GGT GTC AT-3'	61°C
IGF-1R	5'-CCG AAG GTC TGT GAG GAA GA-3'	5'-AAT GGC GGA TCT TCA CGT AG-3'	60°C
IGFBP3	5'-GAA CTT CTC CTC CGA GTC CAA-3'	5'-GAG TTA CAC GAC TCA GGG TC-3'	61°C
NKX3.1	5'-CCG AGA CGC TGG CAG AGA CC-3'	5'-GCT TAG GGG TTT GGG GAA G-3'	59°C
ARP	5'-CGA CCT GGA AGT CCA ACT AC-3'	5'-ATC TGC TGC ATC TGC TTG-3'	59°C

*Tab.1: Sequenzen und primerspezifische Annealingtemperatur der genspezifischen Primer*

### **3.7 Quantifizierung des sezernierten PSA-Proteins**

Die Quantifizierung des von den LNCaP-Zellen sezernierten PSA-Proteins erfolgte am Ende ihrer 44-stündigen Inkubationszeit mit siRNA im Rahmen der Transfektion. Der Zellüberstand wurde dafür aufgefangen und zunächst im Verhältnis 1:10 verdünnt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der in ihm enthaltenen PSA-Proteinmenge mit dem Elecsys<sup>®</sup> System 2010 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz). Nach Bestimmung des RNA-Gehalts der Proben mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers wurde dieser Wert als repräsentativ für die Anzahl der Zellen gewählt und mit der PSA-Sekretion ins Verhältnis gesetzt. So wurden die für die unterschiedlich transfizierten Zellen bestimmten PSA-Proteinmengen direkt miteinander vergleichbar.

Die Quantifizierung des Proteins wurde ergänzend zur Genamplifikation von PSA durchgeführt, um das Verhalten des Tumormarkers nach Unterdrückung von PDEF nicht nur auf molekularer, sondern zusätzlich auf Proteinebene beurteilen zu können.

### **3.8 Messung der Zellvitalität und Zellproliferation**

Um eine potenzielle Zelltoxizität der RNA-Interferenz und den Einfluss der PDEF-Unterdrückung auf Zellebensfähigkeit und Zellteilung zu evaluieren, wurden mit den unterschiedlich transfizierten Zellen Vitalitäts- und Proliferationstests durchgeführt. Beim dazu einerseits angewandten AlamarBlue-Assay (Serotec, Düsseldorf, Deutschland) wird der nicht fluoreszierende blaue Farbstoff AlamarBlue durch verschiedene Enzyme stoffwechselaktiver Zellen in die reduzierte Form überführt, wobei fluoreszierendes Pink entsteht (Gonzalez und Tarloff 2001). Die Vitalität der Zellen lässt sich rein visuell durch Bestätigung dieses Farbumschlags nachweisen. Für

---

die Messung der Zellproliferation kam der BrdU-Test (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) zum Einsatz. Er basiert auf dem kompetitiven Einbau des Pyrimidinanalogs 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle der Base Thymidin in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen. Das eingebaute BrdU lässt sich anschließend mithilfe eines Antikörpers detektieren und photometrisch quantifizieren, wodurch sich die Proliferationsrate der Zellen ermitteln lässt.

Für die Anwendung der beiden Assays ist es notwendig die Transfektion mit der jeweiligen siRNA in 96-Napfplatten vorzunehmen. Beim vorangehenden Ausplattieren wurde deshalb aufgrund der kleineren Gefäßgröße dieser Platten die Zelldichte auf  $5 \times 10^3$  Zellen pro Ansatz reduziert. Die Transfektion erfolgte dann nach dem in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Protokoll, wobei auch hier die Substanzmengen pro Ansatz entsprechend verringert wurden (3  $\mu\text{l}$  Opti-MEM<sup>®</sup> und 0,6  $\mu\text{l}$  Oligofectamine<sup>™</sup>, 16  $\mu\text{l}$  Opti-MEM<sup>®</sup> und 1  $\mu\text{l}$  siRNA, 80  $\mu\text{l}$  RPMI 1640 Medium). Nach Ablauf einer 52-stündigen Inkubationszeit wurden 10  $\mu\text{l}$  AlamarBlue beziehungsweise 10  $\mu\text{l}$  BrdU je Ansatz zugegeben und vier Stunden auf den Zellen belassen. Anschließend erfolgte die visuelle Inspektion des AlamarBlue-Tests sowie die quantitative Auswertung des BrdU-Tests im Spektrophotometer.

---

### 3.9 Statistische Auswertung

Sowohl die graphische Darstellung als auch die statistische Auswertung der in den zuvor beschriebenen Experimenten erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism<sup>®</sup> 4.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA). Die Expression der unterschiedlichen Gene wurde in einer Dreifachbestimmung in der RT-PCR ermittelt, also aus jeweils drei Proben der mit siPDEF beziehungsweise siLuc transfizierten Zellen. Nach anschließender absoluter Quantifizierung mithilfe der Ct-Werte und der Standardkurve wurden die Ergebnisse in Säulendiagrammen dargestellt. Als Signifikanztest kam aufgrund der Unabhängigkeit der beiden Stichproben voneinander der ungepaarte t-Test zur Anwendung. Der darin ermittelte p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass Unterschiede in Messwertreihen zweier Stichproben auch zufällig hätten gemessen werden können. Beträgt diese Wahrscheinlichkeit weniger als 5% ( $p < 0,05$ ), gilt der Unterschied der Ergebnisse als signifikant. Bei der Bestimmung des PSA-Proteins ergab sich für die unterschiedlich transfizierten Zellen eines repräsentativen Experiments jeweils nur ein Wert, sodass diese durch die graphische Darstellung miteinander verglichen wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression des Zielgens PDEF

PDEF werden im Zusammenhang mit verschiedenen Tumorerkrankungen sowohl maligne als auch protektive Eigenschaften zugesprochen. Um seine Expression im Prostatakarzinom darzustellen, wurde diese in entarteten Zelllinien unterschiedlichen Malignitätsgrads gegenüber nicht-malignen Zellen analysiert. Es ergab sich eine stark gesteigerte Expression des Gens in den Karzinomzelllinien LNCaP, VCaP und PC-3 im Vergleich mit den immortalisierten nicht-malignen epithelialen Zelllinien BPH-1, PNT2 und RwPE-1, die in der nachfolgende Graphik zur Darstellung kommt (Abb.5).

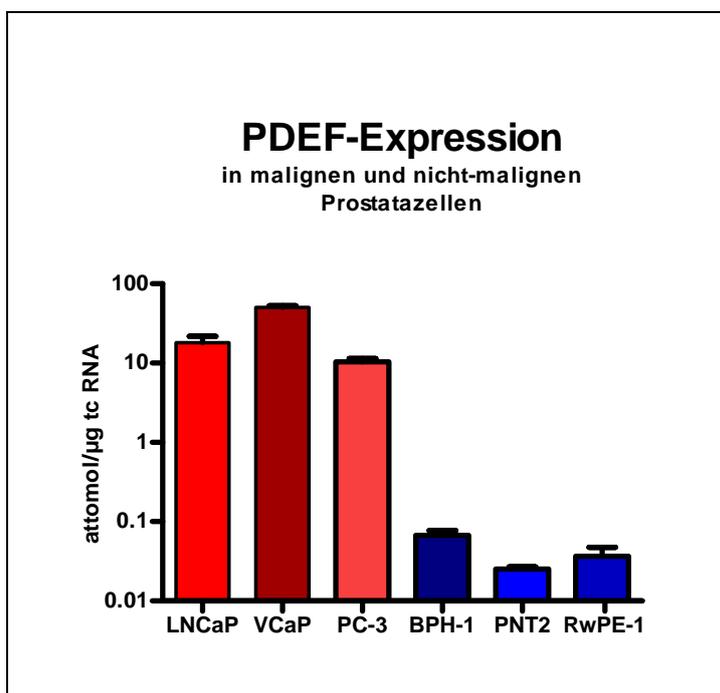


Abb.5: PDEF-Expression in malignen und nicht-malignen Prostatazellen

Diese Graphik veranschaulicht die unterschiedliche Expressionsrate des Gens PDEF in malignen gegenüber nicht-malignen immortalisierten epithelialen Prostatazellen.

Der erhebliche Expressionsunterschied besteht in dieser Deutlichkeit nur für PDEF, nicht aber für das *Housekeeping*-Gen ARP (Abb.6).

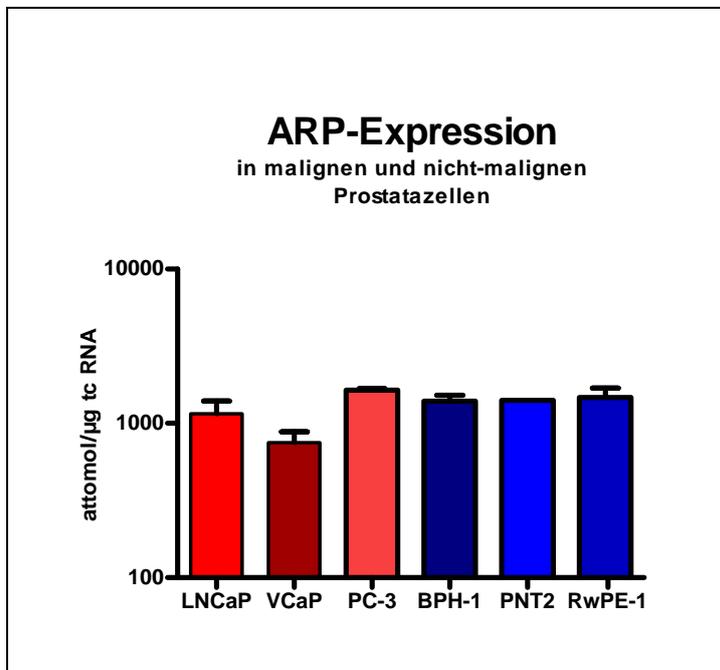


Abb.6: ARP-Expression in malignen und nicht-malignen Prostatazellen

Diese Graphik veranschaulicht die Expressionsrate des Housekeeping-Gens ARP in malignen gegenüber nicht-malignen epithelialen Prostatazellen.

Die bis zu tausendfach höhere Expression von PDEF in Tumorzellen spricht für seine malignen Eigenschaften im Karzinom. Um eine funktionelle Analyse von PDEF im Prostatakarzinom durchzuführen, wurde dessen Expression mittels siRNA herunterreguliert, also dem Niveau in einer Normalzelle genähert, mit der Frage, ob sich dadurch auch ein weniger maligner Phänotyp zeigt. Infolge der Transfektion der LNCaP-Zellen mit siPDEF ließ sich auf mRNA-Ebene tatsächlich eine signifikante Herunterregulierung von PDEF um über 80% gegenüber den Kontrollzellen ermitteln. Die mRNA-Expression des *Housekeeping*-Gens ARP war durch die Transfektion mit siPDEF nicht signifikant beeinflusst (Abb.7, Abb.8).

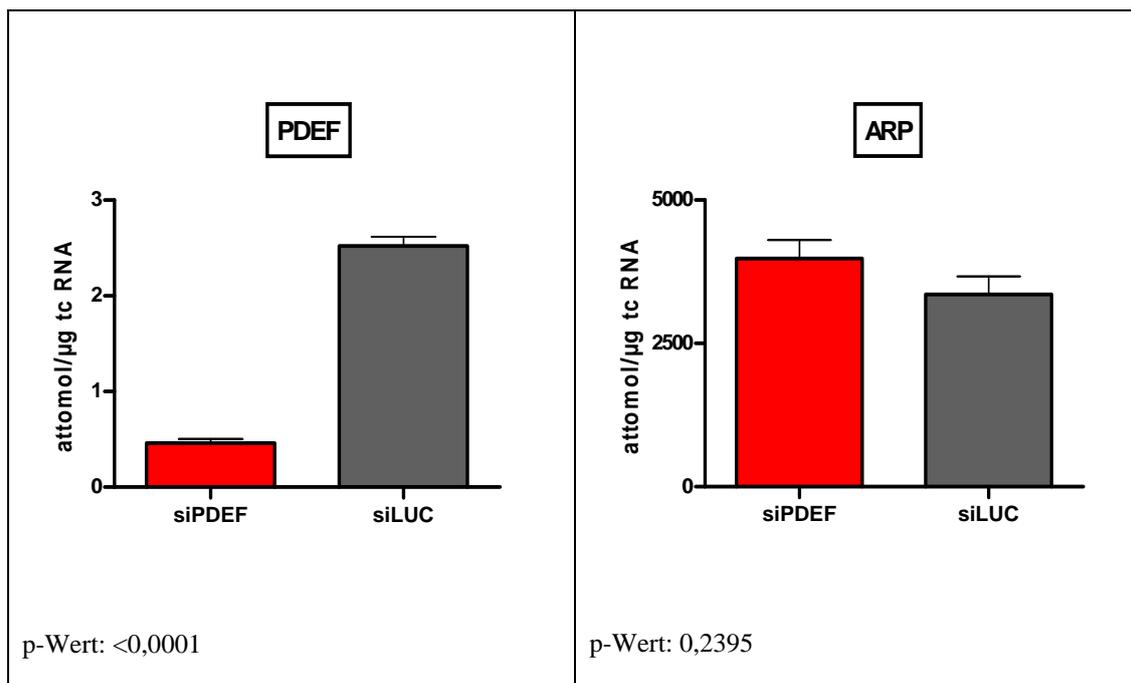


Abb.7: mRNA-Expression PDEF, Abb.8: mRNA-Expression ARP

Dargestellt ist die Herunterregulierung der PDEF-mRNA-Expression nach Transfektion mit siPDEF. Die Expression des Housekeeping-Gens ARP ist durch die RNA-Interferenz nicht wesentlich beeinflusst. Als Kontrolle dienen mit siLUC transfizierte Zellen.

## 4.2 Zellvitalität und Zellproliferation

Um den Einfluss der PDEF-Unterdrückung auf Lebensfähigkeit und Teilungsverhalten der LNCaP-Zellen zu evaluieren, wurden nach der Transfektion mit siRNA Vitalitäts- und Proliferationstests durchgeführt. Bei der Vitalität der unterschiedlich transfizierten Zellen zeigten sich im AlamarBlue-Assay keine signifikanten Unterschiede. In Hinblick auf die Zellproliferation ergab sich im BrdU-Test eine geringfügig, aber signifikant verminderte Proliferation der mit siPDEF transfizierten Zellen gegenüber der mit siLuc transfizierten Kontrolle (Abb.9,Abb.10).

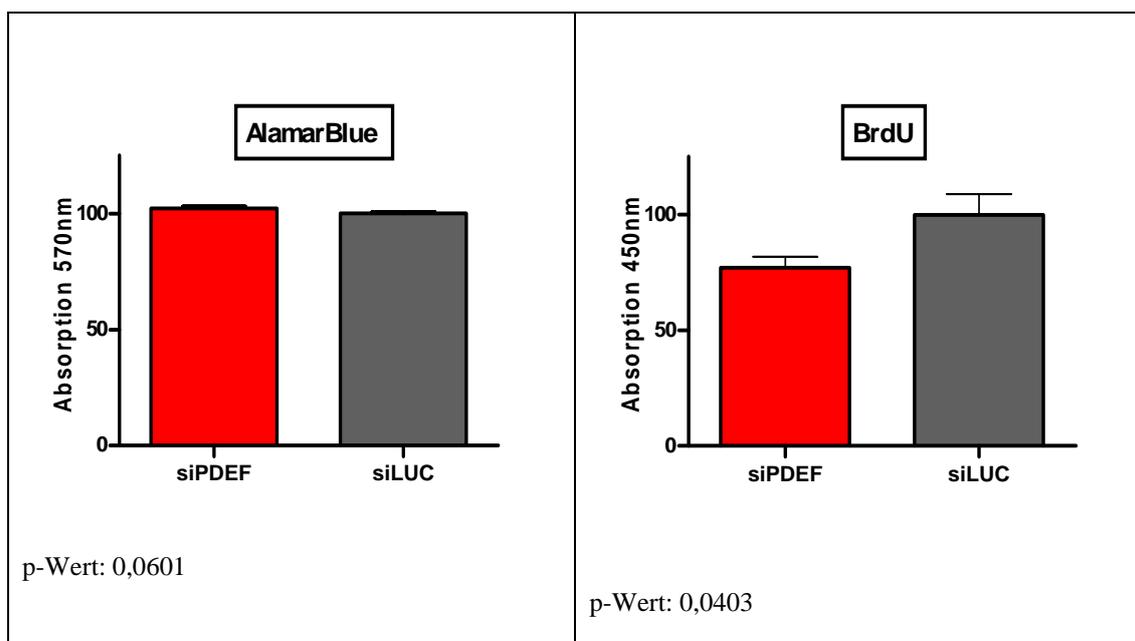


Abb.9: Zellvitalität mit AlamarBlue, Abb.10: Zellproliferation mit BrdU

Diese graphischen Darstellungen geben die Ergebnisse der Vitalitäts- und Proliferationstests wieder, die sich der Transfektion der Zellen mit siPDEF beziehungsweise siLuc anschlossen.

Die Zellvitalität und die Expression des *Housekeeping*-Gens ARP zeigten sich nach der Herunterregulierung von PDEF durch siRNA unbeeinflusst. Inwieweit die verminderte Zellproliferation mit einem entsprechenden Expressionsprofil wesentlicher Prostatakarzinom-assoziiierter Gene einhergeht, wurde im Folgenden analysiert.

### 4.3 Expression des AR

Der AR wurde bereits als bedeutender Faktor im Prostatakarzinom vorgestellt. Mit der Unterdrückung von PDEF zeigte sich tatsächlich auch eine Verminderung des AR auf mRNA-Niveau. Es wurde eine Abnahme der Expressionsrate auf nur 6% erzielt (Abb.11).

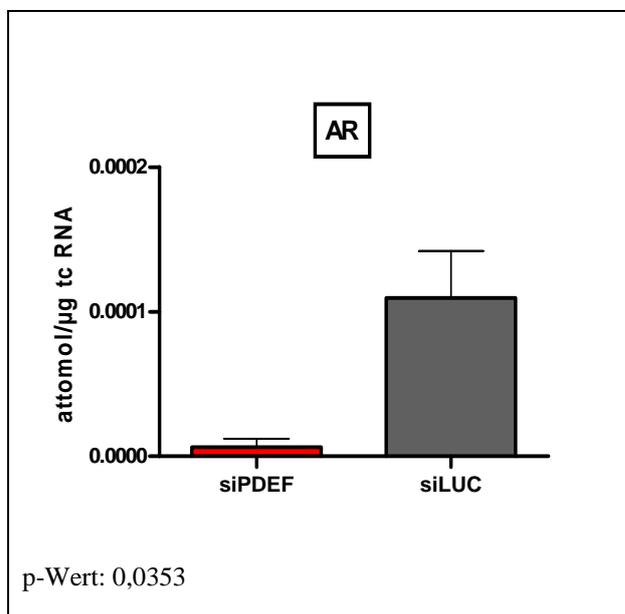


Abb.11: mRNA-Expression AR

Diese Graphik veranschaulicht die verminderte mRNA-Expression des AR nach PDEF-Unterdrückung. Als Kontrolle dienen mit siLuc transfizierte Zellen.

#### 4.4 Expression von PSA

Nach der deutlichen Verminderung der AR-Expression war zu erwarten, dass auch das durch den Rezeptor regulierte PSA geringer exprimiert würde. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine signifikante Herunterregulierung des Tumormarkers, diese fiel jedoch nur gering aus (Abb.12). In der zusätzlich durchgeführten Quantifizierung des PSA-Proteins ließ sich aber ebenfalls zumindest keine signifikante Veränderung der Sekretion im Vergleich zu den mit siLuc transfizierten Kontrollzellen nachweisen (Abb.13).

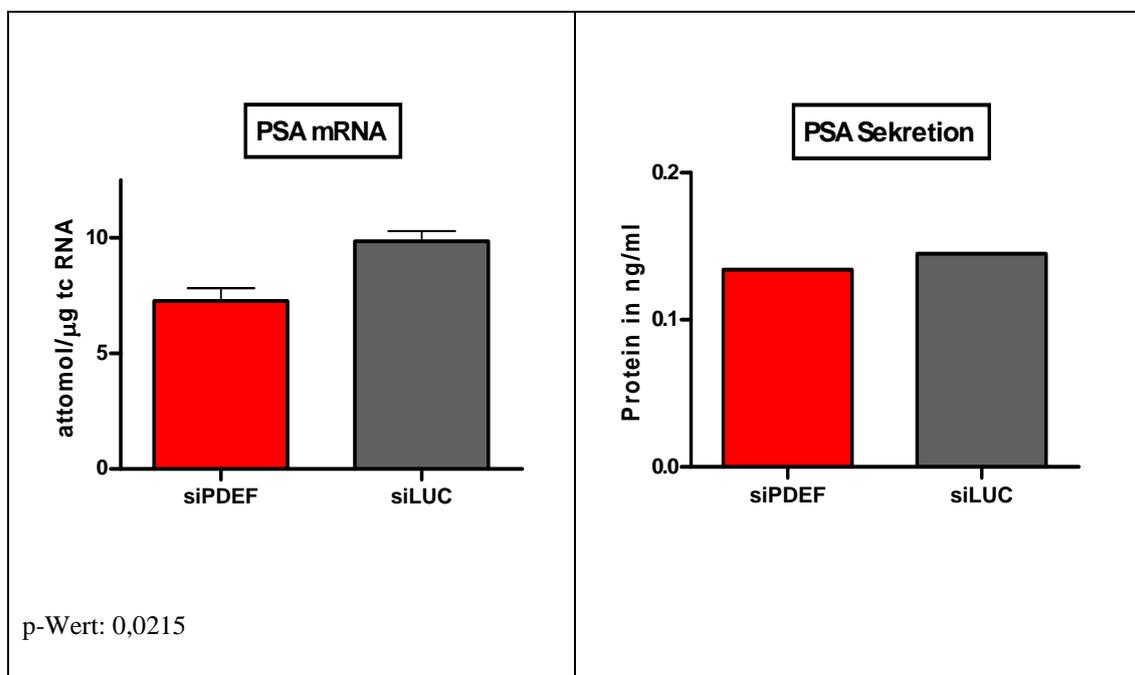


Abb.12: mRNA-Expression PSA, Abb.13: Sekretion PSA-Protein

Veranschaulicht werden mRNA-Expression und Protein-Sekretion von PSA. Während das PSA nach Transfektion mit siPDEF auf mRNA-Ebene vermindert vorliegt, zeigt sich auf Proteinebene kein signifikanter Unterschied. Als Kontrolle dienen mit siLuc transfizierte Zellen.

## 4.5 Expression von PCA3

Im Gegensatz zu PSA war PCA3 infolge der PDEF-Unterdrückung massiv vermindert. In den mit siPDEF transfizierten Zellen zeigte sich eine um über 99% im Vergleich mit den Kontrollzellen verminderte Expression des Gens (Abb.14).

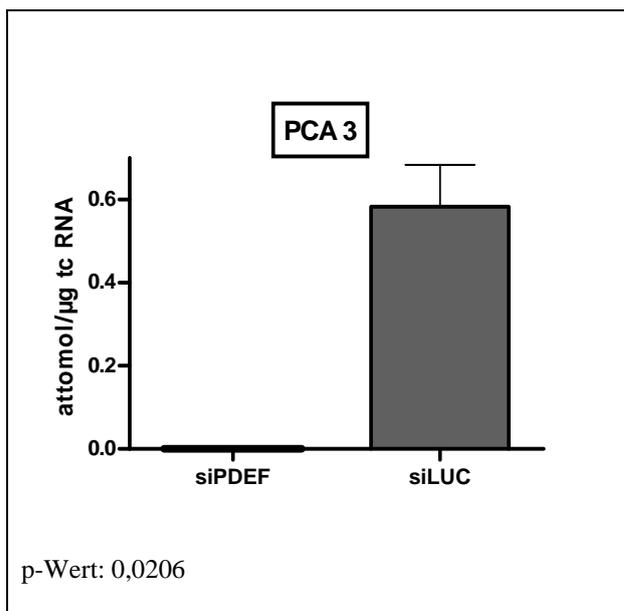


Abb.14: mRNA-Expression PCA3

Die Expression der PCA3-mRNA ist nach der Unterdrückung von PDEF um über 99% gegenüber den Kontrollzellen vermindert.

## 4.6 Expression ausgewählter Mitglieder der IGF-Familie

Als Repräsentanten der IGF-Familie erfolgte die Analyse folgender Mitglieder: IGF-1, IGF-2, IGF-1R und IGFBP-3. Die Suppression von PDEF bewirkte eine signifikant verminderte Expression von IGF-1, IGF-2 und IGF-1R (Abb.15, Abb.16, Abb.17).

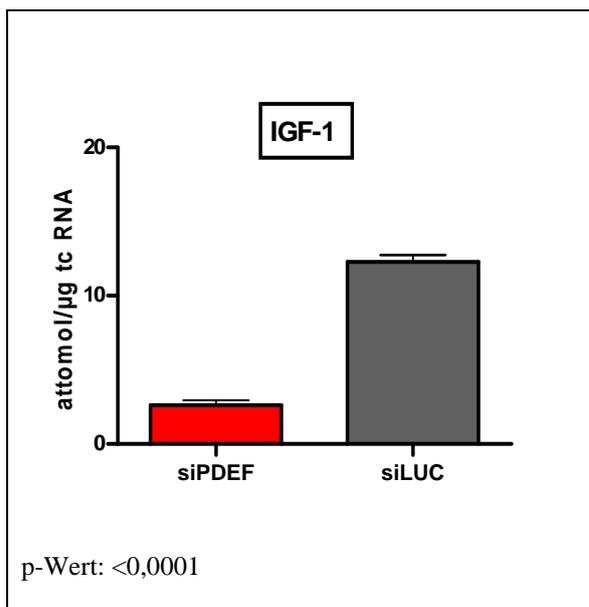


Abb.15: mRNA-Expression IGF-1

Dargestellt wird die Verminderung der mRNA-Expression von IGF-1 nach Transfektion mit siPDEF. Als Kontrolle werden mit siLuc transfizierte Zellen verwendet.

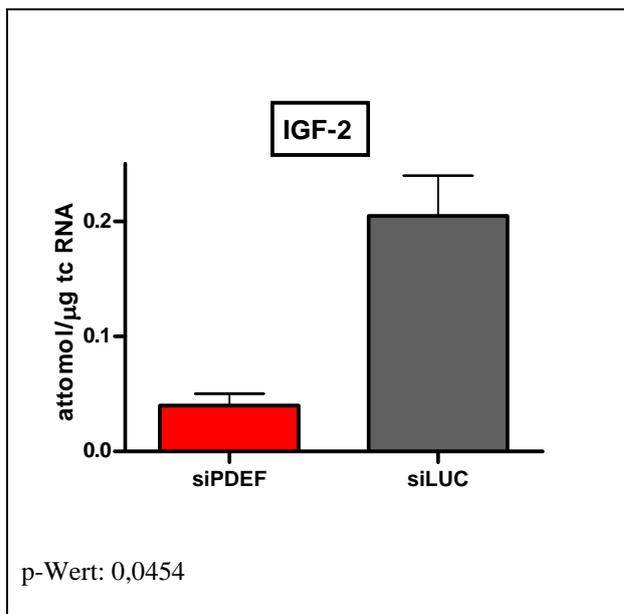


Abb.16: mRNA-Expression IGF-2

Nach der Transfektion der LNCaP-Zellen mit siPDEF ist die Expression von IGF-2 signifikant gegenüber den Kontrollzellen vermindert.

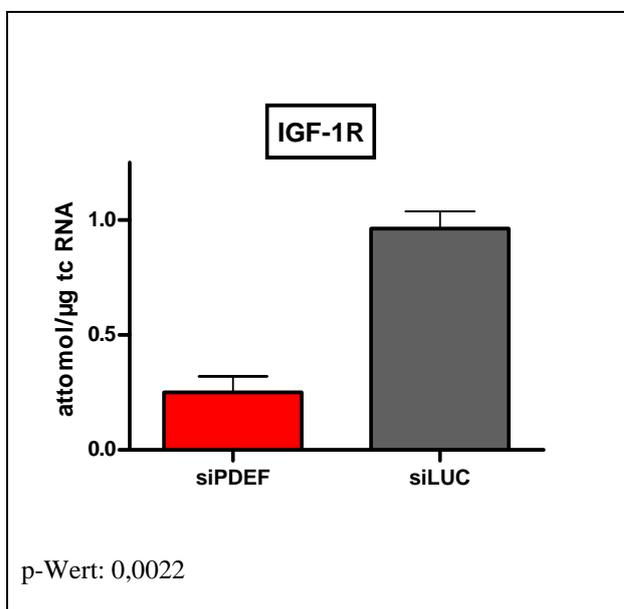


Abb.17: mRNA-Expression IGF-1R

Die mRNA-Expression von IGF-1R ist im Vergleich zu den mit siLuc transfizierten Kontrollzellen nach Transfektion mit siPDEF um 74% vermindert.

IGFBP-3, ein regulatorisches Element der IGF-Achse, zeigte nach der Unterdrückung von PDEF dagegen eine deutlich gesteigerte Expression (Abb.18).

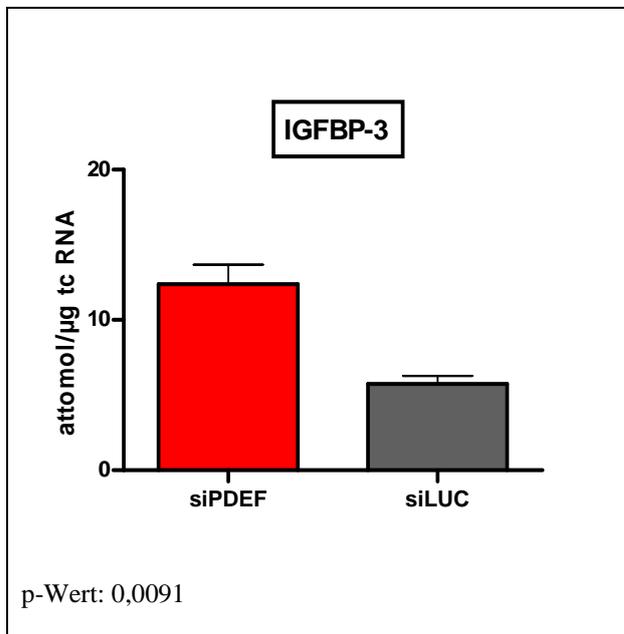


Abb.18: mRNA-Expression IGFBP-3

Diese graphische Darstellung zeigt die gesteigerte mRNA-Expression von IGFBP-3 nach siPDEF-Transfektion. Als Kontrolle dienen Zellen, die mit siLuc transfiziert wurden.

### 4.7 Expression von NKX3.1

Das androgenregulierte, aber dennoch als Tumorsuppressor bezeichnete Gen NKX3.1 reagierte auf die Suppression von PDEF in den Experimenten mit einer signifikant abnehmenden Expressionsrate (Abb.19).

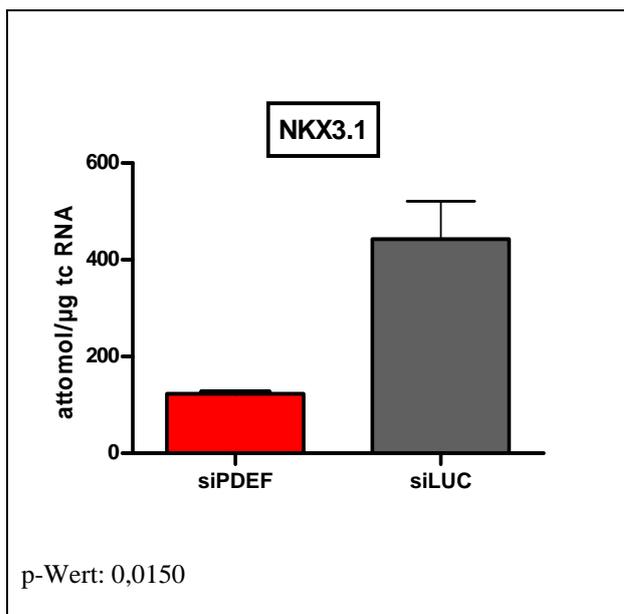


Abb.19: mRNA-Expression NKX3.1

Veranschaulicht wird die Verringerung der NKX3.1-mRNA-Expression nach Transfektion mit siPDEF im Vergleich mit den Kontrollzellen.

---

## 5 Diskussion

PDEF ist ein Koaktivator des AR und wurde in den vergangenen Jahren als in Malignomen überexprimiert und deutlich tumorassoziiert definiert. Einige jüngere Publikationen zu hormonell beeinflussbaren Karzinomen stellen dagegen die rein maligne Funktion von PDEF in Frage und verbinden diesen Transkriptionsfaktor mit einem verminderten Invasionspotenzial von Tumorzellen. Diese Befunde liegen aber nur für Mammakarzinome und AR-negative Prostatakarzinome vor. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit eine PDEF-Funktionsanalyse durch RNA-Interferenz an einem repräsentativen, AR-positiven Zellmodell, den LNCaP-Zellen, durchgeführt werden. Die Hauptproblematik in der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms liegt charakteristisch in der Androgenunabhängigkeit, das heißt in einer deutlich gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber androgenen Stimuli, die sich in der Regel spätestens nach einhalb Jahren antiandrogener Therapie ausbildet und zu einem kastrationsresistenten Progress der Erkrankung führt (Heinlein und Chang 2004). Die zentrale Rolle in diesem Geschehen spielt die Reaktivierung des AR, die unter anderem auf diverse Aberrationen auf Ebene des Rezeptors selbst zurückzuführen ist. Doch auch zahlreiche seiner Kofaktoren bewirken durch ihre Überexpression eine Aktivitätssteigerung beim AR, die ebenfalls zu einem Tumorprogress bei niedriger Androgenkonzentration oder auch gänzlich unabhängig von den üblichen Liganden führt (Knudsen und Penning 2010). Im Jahr 2000 wurde in diesem Zusammenhang erstmals PDEF von Oettgen et al. vorgestellt. PDEF gehört der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren an, von denen bereits zahlreiche mit verschiedenen Malignomen in den Zusammenhang gebracht werden können und die kürzlich auch im Prostatakarzinom in der Ausprägung von TMPRSS2-ERG-Fusionen besondere Bedeutung erlangt haben (Cai et al. 2009). Die

---

Expression von PDEF ist außerhalb der Prostata selten, wohingegen es im Rahmen von Tumorerkrankungen vermehrt auch in anderen Organen wie Lunge oder Kolon nachgewiesen werden kann. In der Prostata ist seine Expression eng an die Zellen gebunden, die auch den AR exprimieren. PDEF kann mit dem AR eine direkte Bindung eingehen, die in einer gesteigerten Aktivität des Rezeptors resultiert. Des Weiteren kommt es aber auch zu einer direkten Aktivierung des PSA-Promotors durch PDEF, die ebenfalls zu einer vermehrten Expression des Tumormarkers führt (Oettgen et al. 2000). PDEF ist demnach in der Lage, an mehreren Punkten Einfluss auf die Androgenachse zu nehmen und im Fall der direkten Aktivierung des PSA-Promotors sogar über einen androgenunabhängigen Mechanismus. Im Prostatakarzinom ist eine Überexpression des Transkriptionsfaktors beschrieben worden, die hier für zelluläre Modelle bestätigt wurde (Abb.5). Zudem besteht eine Korrelation zwischen der Expressionsrate und dem Tumorstadium, sodass die aggressiveren Phänotypen ein höheres Expressionsniveau von PDEF aufweisen (Sood et al. 2007). All diese Faktoren lassen kaum einen Zweifel daran zu, dass es sich bei PDEF um einen wichtigen malignen Faktor in der Prostatakarzinom-Entstehung und in seinem Progress zur Androgenunabhängigkeit handelt. Dennoch wird der Einfluss des Transkriptionsfaktors in der Literatur bis heute sehr kontrovers diskutiert. Vor allem in Bezug auf Migration und Invasivität von Tumorzellen wird PDEF auch im Prostatakarzinom in den letzten Jahren als protektiver Faktor dargestellt. Dies ist mit bisherigen Befunden wenig in Einklang zu bringen und motivierte zu einer funktionellen Analyse des Gens durch seine Herunterregulierung mittels siRNA. Die dadurch erzielten Effekte auf zahlreiche bekannte Prostatakarzinom-assoziierte Gene sollten eine genauere Charakterisierung von PDEF ermöglichen, auch

---

in Hinblick auf den Transkriptionsfaktor als potenziellen Angriffspunkt für neuartige Therapiestrategien in der Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms.

### **5.1 PDEF und die Androgenachse**

Der AR spielt sowohl bei der physiologischen Entwicklung und Funktion als auch bei der malignen Entartung der Prostata eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der Karzinogenese kommt es zu einem Funktionswandel des Rezeptors. Während im gesunden Organ über ihn die Zelldifferenzierung gesichert und die Zellproliferation unterdrückt wird, führt eine somatische Genomalteration im Rahmen der Malignomentwicklung zur Übermittlung von Signalen, die hingegen Zellproliferation und -überleben gewährleisten (Nelson 2007). Das Fortschreiten des Prostatakarzinoms trotz Androgenblockade wird schließlich durch die Reaktivierung des AR ausgelöst, die durch zahlreiche Aberrationen auf Rezeptorebene bedingt ist. Doch auch seine Aktivierung durch Kofaktoren wie PDEF spielt bei diesem kastrationsresistenten Tumorprogress eine Rolle (Knudsen und Penning 2010, Oettgen et al. 2000). Die primäre Expression von PDEF in Zellen, in denen auch der AR exprimiert wird, könnte zudem ein Hinweis auf die zusätzliche Einflussnahme von PDEF auf die Transkriptionsrate des Rezeptors sein, die jedoch noch nicht experimentell belegt werden konnte (Oettgen et al. 2000). Untermauert wird diese These jedoch durch die vor allem im kastrationsresistenten Prostatakarzinom auftretende Überexpression des AR (Linja et al. 2001).

Der Therapieansatz beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom muss aufgrund dieser Schlüsselposition die Verhinderung oder Aufhebung der AR-Reaktivierung sein. Neben

---

dem AR selbst böte sich hier PDEF als Angriffspunkt an, das möglicherweise durch seine Funktion als AR-Koaktivator maßgeblich am Fortschreiten des Prostatakarzinoms beteiligt ist. Sollte sich die hier gezeigte Beeinflussung der AR-Transkription durch PDEF in vivo bestätigen, resultierte seine Blockade außerdem in der direkten Verminderung der AR-Funktion im Gewebe, wodurch auch die Aberrationen am Rezeptor selbst oder seiner zahlreichen weiteren Koaktivatoren wirkungslos blieben. Darüber hinaus würde durch die PDEF-Blockade auch sein androgenunabhängiger Einfluss auf den PSA-Promotor unterdrückt werden.

Bei der hier vorgestellten experimentellen Herunterregulierung von PDEF konnte eine Expressionsverminderung auf verbleibende 18% bewirkt werden. In der Folge war die mRNA-Expression des AR sogar um über 90% verringert. Diese mit der PDEF-Suppression einhergehende Expressionsverminderung des AR ließe sich mit der Hypothese, dass PDEF als Transkriptionsfaktor auch die Rezeptorexpression selbst beeinflusst, erklären. In der Annahme, dass Rezeptormoleküle der mRNA entsprechend vermindert in den Zellen vorlagen, wäre hiermit ein AR-vermittelter Tumorprogress sowohl durch die Androgene als auch durch die alternativen Liganden oder aberranten Kofaktoren deutlich eingeschränkt. Ein endgültiger Beweis für die vollzogene Herunterregulierung des AR auch auf Proteinebene steht aber wegen des Fehlens eines funktionsfähigen kommerziellen PDEF-Antikörpers in diesem Projekt noch aus.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind mit den Aussagen der Arbeitsgruppen, die eine gesteigerte Migration und Invasivität von Tumorzellen nach Verminderung oder Verlust von PDEF beschreiben, weniger in Einklang zu bringen. Die dem PDEF folgende Herunterregulierung des AR wäre in diesem Zusammenhang kaum zu erklären, da gerade der Rezeptor und seine Aberrationen für den Tumorprogress essenziell sind.

---

Zurückzuführen sind diese gegensätzlichen Ergebnisse möglicherweise auf die unterschiedlichen Zellmodelle, die in den Experimenten verwendet wurden. Eine Steigerung von Migration und Invasivität nach PDEF-Interferenz konnte bisher nur in der gänzlich AR-negativen Prostatakarzinomzelle PC-3 sowie in verschiedenen invasiven Mammakarzinomzelllinien nachgewiesen werden. In den LNCaP-Zellen wurde dagegen lediglich die Zelladhäsion als vermindert beschrieben, wenn PDEF herunterreguliert war (Gu et al. 2007, Turner et al. 2007). LNCaP-Zellen sind wenig invasive und gut differenzierte Zellen, die mit AR und PSA zentrale Faktoren der Androgenachse exprimieren und dadurch dem klinisch imponierenden Prostatakarzinom entsprechen. PC-3-Zellen dagegen stellen eine deutlich fortgeschrittenere, invasive und schlecht differenzierte Prostatakarzinomzelllinie dar, die den AR und weitere Komponenten der Androgenachse nicht mehr exprimiert und auf diese Weise tatsächlich androgenunabhängig ist (Bonaccorsi et al. 2006, Nachshon-Kedmi et al. 2003). Eine solche Ausprägung des Prostatakarzinoms entspricht aber nicht dem klinischen Erscheinungsbild, bei dem Patienten im fortgeschrittenen Stadium - in der Regel mit massiven Knochenmetastasen - bis zu vierstellige PSA-Werte aufweisen, denen eine aktive Androgenachse zugrunde liegen muss. Nach dem Verlust von AR und PSA in PC-3-Zellen ist es denkbar, dass PDEF vermehrt mit anderen Signaltransduktionswegen interagiert. Andererseits könnte der Transkriptionsfaktor mit Wegfall der Androgenachse auch vollkommen wirkungslos geworden sein und Zellmigration und -invasivität werden ausschließlich durch die zahlreichen weiteren am Tumorprogress beteiligten Faktoren beeinflusst.

Wie bereits beschrieben ist der Tumormarker PSA konsekutiv mit dem AR verbunden. So wird seine Expression vorrangig durch den Rezeptor reguliert, der an bestimmte

---

Regionen des PSA-Promotors bindet und auf diese Weise die Transkription des Gens initiiert (Cleutjens et al. 1996). Darüber hinaus ist auch PDEF an der PSA-Expression beteiligt (Oettgen et al. 2000). Infolge der hier experimentell herbeigeführten PDEF-Unterdrückung war die mRNA-Expression von PSA zwar tatsächlich signifikant vermindert, das Ausmaß stellte sich jedoch deutlich geringer dar, als nach dem Einfluss auf den AR erwartet. Die ebenfalls durchgeführte Proteinquantifizierung für die PSA-Sekretion blieb auch fast unverändert. Eine Erklärung für diese Ergebnisse, die trotz deutlicher Unterdrückung zweier wichtiger Regulatoren des Tumormarkers erhoben wurden, liefert eventuell der Zeitpunkt, zu dem das PSA-Protein bestimmt wurde. Es ist denkbar, dass eine verminderte Expression von AR und PDEF nach 44 Stunden nicht mehr in einer signifikanten Verringerung des PSA-Proteins erhalten bleibt. Da eine Quantifizierung des Tumormarkers zu einem anderen Zeitpunkt nicht erfolgte, kann dies im Rahmen dieser Arbeit nicht eruiert werden und muss in folgenden Experimenten geklärt werden, die an mehreren Zeitpunkten Daten aufnehmen und nicht nur das hier auf maximale PDEF-Verminderung abzielende Zeitfenster analysieren.

Im Vergleich zu PSA zeigte jedoch ein weiterer relevanter und klinisch eingesetzter Tumormarker eine wesentlich deutlichere Reaktion auf die PDEF-Suppression. Dieses zusätzlich zum PSA analysierte PCA3 hat sich aktuell als malignomspezifischerer Tumormarker erwiesen.

## 5.2 PDEF und PCA3

PCA3 wird exklusiv in entarteten Prostatazellen exprimiert und stellt aufgrund dieser überlegenen Spezifität einen ergänzenden Tumormarker zum PSA dar. Die Regulation und Funktion des Gens, für das bisher kein Proteinprodukt identifiziert wurde, ist weitgehend ungeklärt. Da die Expression von PCA3 jedoch durch Stimulation mit Dihydrotestosteron gesteigert werden kann und bei Androgenablation wie die von PSA abfällt, wird eine Verbindung des Gens mit der Androgenachse gefolgert (Clarke et al. 2009, Schalken et al. 2003). Eine weitere Arbeitsgruppe fand zudem eine Expression von PCA3 ausschließlich in Prostatakarzinomzelllinien, in denen auch der AR und PSA vorliegen, und nimmt eine Regulierung des Gens durch den AR an (van Bokhoven et al. 2003). Ferner basiert die Quantifizierung von PCA3-Transkripten im Urinsediment beim etablierten klinischen Testverfahren auf einer Kalibrierung in Relation zu PSA-mRNA (Hessels et al. 2003).

Auch den hier vorgestellten Experimenten zufolge ist die PCA3-Expression mit der von AR und PSA verknüpft. Die Unterdrückung von PDEF bewirkte eine sehr deutliche Herunterregulierung der PCA3-Expression um über 99%. Da auch der AR nach der Transfektion mit siPDEF in seiner Expression deutlich eingeschränkt war, ist die Annahme eines AR-regulierten PCA3 naheliegend.

### 5.3 Auswirkungen von PDEF auf die IGF-Achse

Die IGF-Familie umfasst Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren sowie IGF-bindende Proteine, die die Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren regulieren (Russell et al. 1998). Die beiden Wachstumsfaktoren IGF-1 und IGF-2 sind Liganden des IGF-1R und haben eine wachstums- und proliferationssteigernde Wirkung auf epitheliale Prostatazellen (Chan et al. 1998). Der aktivierte IGF-1R hat zudem antiapoptotische Effekte sowohl auf gesunde als auch auf maligne Zellen der Prostata (Baserga 1999). IGFBP-3 dagegen vermindert das Zellwachstum, unter anderem durch Bindung von IGF-1, und hat eine proapoptotische Wirkung über einen eigenen Rezeptor (Rajah et al. 1997).

Die IGF- und die Androgenachse sind über verschiedene Regulationsmechanismen miteinander verknüpft. Eine wesentliche Rolle spielt dabei der Wachstumsfaktor IGF-1, der in der Lage ist den AR direkt zu aktivieren und dadurch die PSA-Expression und -Sekretion zu steigern (Culig et al. 1994). In den hier vorgestellten Experimenten konnten durch die deutliche Einschränkung der PDEF-Expression die im Prostatakarzinom deregulierten Elemente der IGF-Achse in Richtung Normalbedingungen korrigiert werden. So wurden IGF-1 und IGF-2 vermindert, genauso wie deren Rezeptor IGF-1R. Die Expression von IGFBP-3, die im Prostatakarzinom herabgesetzt ist, wurde dagegen wieder deutlich hochreguliert. Diese Effekte sind durch die zahlreichen Interaktionen von IGF- und Androgenachse zu erklären. Neben den bereits erläuterten Verflechtungen führt eine Aktivierung des AR in LNCaP-Zellen zur Expressionssteigerung des IGF-1R (Monti et al. 2007). Durch die Herunterregulierung des AR infolge der PDEF-Suppression wird offenbar der gegenteilige Effekt erzielt. Die Erkenntnis, dass das Antiandrogen Finasterid zu einer

verminderten Expression von IGF-1 und IGF-1R führt, bekräftigt die Annahme, dass diese beiden Proteine durch den AR reguliert werden (Meinbach und Lokeshwar 2006).

In einer weiteren Arbeit zum IGF-1R wurde dessen Expression in PC-3-Zellen mittels *antisense* RNA herunterreguliert. In der Folge zeigten die Zellen neben vermehrter Apoptose eine Verminderung von Proliferation und Invasivität (Bähr und Groner 2005).

Für IGFBP-3 konnte sowohl in LNCaP- als auch in PC-3-Prostatakarzinomzellen nachgewiesen werden, dass Proliferation, Migration und Invasion der Zellen durch IGFBP-3 unterdrückt werden (Massoner et al. 2009).

Eine verminderte Expression von PDEF wurde in der PC-3-Zelllinie mit einer Steigerung von Migration und Invasion in den Zusammenhang gebracht (Gu et al. 2007), während in den hier aufgeführten Ergebnissen die Herunterregulierung des Gens eine verringerte Expression des IGF-1R und eine gesteigerte des IGFBP-3 bewirkte, worunter in den oben genannten Arbeiten Proliferation, Migration und Invasion der malignen Zellen zurückgingen. Der Zusammenhang von PDEF und Migration oder Invasion bleibt somit kontrovers.

#### **5.4 PDEF und NKX3.1**

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NKX3.1 in Prostatakarzinom-Entstehung und -Progression ist noch nicht endgültig geklärt. Einerseits wurden ihm die Funktionen eines Tumorsuppressorgens zugesprochen, da sein Verlust in einer signifikanten Anzahl früher Prostatakarzinome beschrieben wurde und mit einem Tumorprogress einherging (Bowen et al. 2000). Auf der anderen Seite konnte eine androgeninduzierte Expressionssteigerung von NKX3.1 nachgewiesen werden und auf die Suppression des

---

Gens reagierten LNCaP-Zellen mit einer verminderten Expression von AR und PSA sowie einer abnehmenden Zellproliferation (Possner et al. 2008).

Nach Transfektion der LNCaP-Zellen mit siRNA gegen PDEF war die Expression von NKX3.1 signifikant vermindert. Vor dem Hintergrund der vorgestellten Ergebnisse zu Androgen- und IGF-Achse sowie dem Tumormarker PCA3 würde man bei NKX3.1 als vermeintlichem Tumorsuppressorgen eher mit einer gesteigerten Expression rechnen, wie sie sich zum Beispiel auch bei IGFBP-3 mit seinen wachstumshemmenden und proapoptischen Eigenschaften nach Unterdrückung von PDEF deutlich zeigte. Auch Bax, ein Proapoptosegen, dessen Expression im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls bestimmt wurde, war nach PDEF-Unterdrückung deutlich hochreguliert (Daten nicht gezeigt).

Eine abnehmende Expression von NKX3.1 infolge der PDEF-Unterdrückung lässt dagegen eher die Annahme zu, dass es sich bei dem Gen ebenfalls um einen malignen Faktor im Prostatakarzinom handelt. Nachdem infolge der siPDEF-Transfektion AR und PSA als zentrale Mitglieder der Androgenachse signifikant vermindert exprimiert wurden, würde zudem eine Androgenregulation von NKX3.1 die ebenfalls auftretende verminderte Expression dieses Gens erklären.

Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Funktion dieses sehr kontrovers diskutierten Transkriptionsfaktors im Prostatakarzinom endgültig aufzuklären.

## 5.5 PDEF und die Zellvitalität und Zellproliferation

Die Zellvitalität und -proliferation wurde am Ende der Transfektion mit siPDEF mit dem AlamarBlue- und BrdU-Assay bestimmt. Während die Kontrolle der Vitalität in erster Linie die weitgehende Integrität sicherstellen sollte, wurde die Bestimmung der Proliferation auch zur Ermittlung möglicher Abweichungen der generellen Zellcharakteristika infolge der PDEF-Unterdrückung durchgeführt. Im AlamarBlue-Test zeigte sich eine gleichbleibende Lebensfähigkeit der unterschiedlich transfizierten Zellen, sodass eine akute Zellschädigung durch den Vorgang der Transfektion ausgeschlossen werden konnte. Die Zellproliferation war in den mit siPDEF transfizierten Zellen dagegen signifikant im Vergleich mit den Kontrollzellen vermindert.

Wie bereits erwähnt wird die verminderte Expression von PDEF mit einer gesteigerten Migration und Invasivität von PC-3-Prostatakarzinomzellen in den Zusammenhang gebracht (Gu et al. 2007). Im Rahmen dieses Tumorprogresses würde man auch eine gesteigerte Zellproliferation erwarten, die sich in den hier vorgestellten Versuchen mit der LNCaP-Zelllinie jedoch nicht zeigte. Im Gegenteil fiel nach der Unterdrückung von PDEF ein signifikant vermindertes Proliferationsverhalten der Zellen auf, sodass die PDEF-Unterdrückung sogar einen antiproliferativen Effekt hatte. Dies ist im Einklang mit den in den vorangehenden Kapiteln beschriebenen Expressionsveränderungen der verschiedenen Prostatakarzinom-relevanten Gene. So waren AR, IGF-1, IGF-2 und IGF-1R, die eine proliferationssteigernde Wirkung im Prostatakarzinom haben und teilweise auch Migration und Invasion auslösen, in ihrer Expression deutlich eingeschränkt. Ebenso die Tumormarker PSA und insbesondere PCA3, deren verminderter Nachweis den Tumorregress und nicht das Fortschreiten des

---

Prostatakarzinoms kennzeichnet. Das in Hinblick auf Proliferation, Migration und Invasivität von Prostatakarzinomzellen nachweisbar protektive IGFBP-3 war dagegen deutlich hochreguliert. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse scheint das vermehrte Auftreten von Migration und Invasion nach Herunterregulierung von PDEF im Prostatakarzinom auf die AR-negative PC-3-Zelllinie begrenzt zu sein, deren Unzulänglichkeit als Modell für das Prostatakarzinom in dieser Arbeit bereits angedeutet wurde.

---

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war eine funktionelle Analyse von PDEF als einem Gen, dessen Rolle in der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms sehr kontrovers diskutiert wird. Seine Herunterregulierung mittels RNA-Interferenz und die Betrachtung der dadurch erzielten Effekte auf ausgewählte Gene sollte weitere Informationen über die Bedeutung von PDEF im Tumorgeschehen liefern und mit der aktuellen Literatur abgeglichen werden. Derzeit existieren gegensätzliche Aussagen über die Funktion des Transkriptionsfaktors. Während auf der einen Seite beschrieben wird, dass seine Expression dem Fortschreiten des Prostatakarzinoms entgegenwirke, ist es auf der anderen Seite als aktivierendes Element in der Androgenachse charakterisiert worden, das im Prostatakarzinom überexprimiert ist. Durch die Transfektion der LNCaP-Zellen mit siRNA wurde die angestrebte Herunterregulierung von PDEF um über 80% erreicht. Eine Auswirkung der PDEF-Verminderung ließ sich bei wesentlichen Prostatakarzinom-assoziierten Genen, darunter vor allem Mitglieder der Androgen- und IGF-Achse, verzeichnen. Ergänzend wurde die Zellproliferation betrachtet, die nach PDEF-Unterdrückung abnahm.

An der Progression des hormonsensiblen Prostatakarzinoms sind vorrangig der AR und verschiedene Mitglieder der IGF-Familie beteiligt, die wachstumsstimulierende, proliferative und antiapoptotische Effekte vermitteln. In der Folge steigt die Expression von PSA und PCA3, die aus diesem Grund als Tumormarker eingesetzt werden. Dagegen sind Gene herunterreguliert, die das Zellwachstum hemmen oder Apoptose einleiten können, wie beispielsweise IGFBP-3.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung von PDEF diesen Aberrationen entgegenwirkt und sie wieder ausgleicht. Dies zeigte sich sowohl im

---

Expressionsprofil der hier aufgeführten Gene als auch bei der Proliferation der Tumorzellen, die durch die Unterdrückung von PDEF eingeschränkt war. Diese Ergebnisse sprechen gegen protektive Eigenschaften von PDEF bei der Tumorzellinvasion, die unter anderem in weiteren Zellmodellen des Prostatakarzinoms beobachtet wurde. Vielmehr scheint das Gen in LNCaP-Zellen sowohl über die Androgen- als auch über die IGF-Achse Prozesse zu beeinflussen, die Wachstum, Proliferation und Überleben der Zellen fördern und so zu einem Fortschreiten der Tumorerkrankung beitragen. Aus diesem Grund könnte die Herunterregulierung oder Blockade von PDEF in der Zukunft eine alternative Therapiestrategie darstellen, die im hormonsensiblen Prostatakarzinom und auch nach Reaktivierung des AR eine positive Beeinflussung des Tumorprogresses ermöglichte.

---

## 7 Literaturverzeichnis

Bähr C, Groner B (2005): The IGF-1 receptor and its contributions to metastatic tumor growth—novel approaches to the inhibition of IGF-1R function. *Growth Factors* 23(1), 1-14

Baserga R (1999): The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res* 253(1), 1-6

Beato M, Herrlich P, Schutz G (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search for a plot. *Cell* 83, 851-7

Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR et al. (1999): Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 13(8), 966-77

Bonaccorsi L, Muratori M, Marchiani S, Forti G, Baldi E (2006): The androgen receptor and prostate cancer invasion. *Mol Cell Endocrinol* 246(1-2), 157-62

Bonkhoff H, Remberger K (1998): Morphogenese der benignen Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms. *Pathologie* 19(1), 12-20

---

Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, Gasser TC, Koivisto P, Lack EE, Kononen J et al. (2000): Loss of NKX3.1 Expression in Human Prostate Cancers Correlates with Tumor Progression. *Cancer Res* 60(21), 6111-5

Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB (1999): DD3: A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Res* 59(23), 5975-9

Cai C, Wang H, Xu Y, Chen S, Balk SP (2009): Reactivation of androgen receptor-regulated TMPRSS2:ERG gene expression in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 69(15), 6027-32

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 Cancer Risk: A Prospective Study. *Science* 279(5350), 563-6

Clarke RA, Zhao Z, Guo AY, Roper K, Teng L, Fang ZM, Samaratunga H, Lavin MF, Gardiner RA (2009): New genomic structure for prostate cancer specific gene PCA3 within BMCC1: implications for prostate cancer detection and progression. *PLoS One* 4(3), e4995

Cleutjens KBJM, van Eekelen CCEM, Van der Korput HAGM, Brinkman AO, Trapman J (1996): Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271, 6379-88

---

Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice 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(4), 1046-53

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), 5474-8

Deutsche Krebsgesellschaft e.V.: [http://www.krebsgesellschaft.de/db\\_prostatakrebs\\_therapie,108267.html](http://www.krebsgesellschaft.de/db_prostatakrebs_therapie,108267.html) (Abrufdatum 21.01.2010)

Dyxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6), 457-67

Faus H, Haendler B (2006): Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60(9), 520-8

Fire A (1999): RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 15(9), 358-63

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und Robert Koch-Institut (2006): [http://infomed.mds-ev.de/sindbad.nsf/778bf5d6b54bb45fc1256e9f004097fb/04a6f0365435865ac125711b002dd87d/\\$FILE/KID2006\\_online\\_2006-06.pdf](http://infomed.mds-ev.de/sindbad.nsf/778bf5d6b54bb45fc1256e9f004097fb/04a6f0365435865ac125711b002dd87d/$FILE/KID2006_online_2006-06.pdf) (Abrufdatum 14.03.2010)

---

Ghadersohi A, Odunsi K, Lele S, Collins Y, Greco WR, Winston J, Liang P, Sood AK (2004): Prostate derived Ets transcription factor shows better tumor-association than other cancer-associated molecules. *Oncol Rep* 11(2), 453-8

Gonzalez RJ, Tarloff JB (2001): Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro* 15(3), 257-9

Gregory CW, Johnson RT Jr, Mohler JL, French FS, Wilson EM (2001): Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res* 61(7), 2892-8

Gu X, Zerbini LF, Otu HH, Bhasin M, Yang Q, Joseph MG, Grall F, Onatunde T, Correa RG, Libermann TA (2007): Reduced PDEF expression increases invasion and expression of mesenchymal genes in prostate cancer cells. *Cancer Res* 67(9), 4219-26

Gunawardane RN, Sgroi DC, Wrobel CN, Koh E, Daley GQ, Brugge JS (2005): Novel role for PDEF in epithelial cell migration and invasion. *Cancer Res* 65(24), 11572-80

Hannon GJ (2002): RNA interference. *Nature* 418(6894), 244-51

Heinlein CA, Chang C (2004): Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocr Rev* 25(2), 276-308

---

Hernandez J, Thompson IM (2004): Prostate-Specific Antigen: A Review of the Validation of the Most Commonly Used Cancer Biomarker. *Cancer* 101(5), 894-904

Hessels D, Schalken JA (2009): The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. *Nat Rev Urol* 6(5), 255-61

Hessels D, Klein Gunnewiek JMT, van Oort I, Karthaus HFM, van Leenders GJL, van Balken B, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA (2003): DD3<sup>PCA3</sup>-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Eur Urol* 44(1), 8-16

Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP (1983): LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Res* 43(4), 1809-18

Junqueira LC, Carneiro J: Prostata; in: *Histologie*, 4. Auflage; hrsg. v. Junqueira LC, Carneiro J; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1996, 640-2

Kamradt J, Stöckle M, Wullich B (2003): Molekulare Diagnostik beim Prostatakarzinom. *Urologe A* 42(5), 641-9

Knudsen KE, Penning TM (2010): Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* 21(5), 315-24

---

Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, Trapman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T et al. (1997): Androgen Receptor Gene Amplification: A Possible Molecular Mechanism for Androgen Deprivation Therapy Failure in Prostate Cancer. *Cancer Res* 57(2), 314-9

Koochekpour S (2010) : Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl* 12(5), 639-57

Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, Lonigro RJ, Tsodikov A, Wei JT, Tomlins SA et al. (2008): A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res* 68(3), 645-9

Linja MJ, Savinainen KJ, Saramäki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T (2001): Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 61(9), 3550-5

Massoner P, Colleselli D, Matscheski A, Pircher H, Geley S, Jansen Dürr P, Klocker H (2009): Novel mechanism of IGF-binding protein-3 action on prostate cancer cells: inhibition of proliferation, adhesion, and motility. *Endocr Relat Cancer* 16(3), 795-808

McNeal JE (1988): Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 12(8), 619-33

Meinbach DS, Lokeshwar BL (2006): Insulin-like growth factors and their binding proteins in prostate cancer: cause or consequence? *Urol Oncol* 24(4), 294-306

---

Monti S, Proietti-Pannunzi L, Sciarra A, Lolli F, Falasca P, Poggi M, Celi FS, Toscano V (2007): The IGF axis in prostate cancer. *Curr Pharm Des* 13(7), 719-27

Mülhardt C: Reverse Transkription (cDNA-Synthese); in: *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 5. Auflage; hrsg. v. Mülhardt C; Spektrum Akademischer Verlag München 2006, 122-3

Nachshon-Kedmi M, Yannai S, Haj A, Fares FA (2003): Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food Chem Toxicol* 41(6), 745-52

Nelson WG (2007): Prostate cancer prevention. *Curr Opin Urol* 17(3),157-67

Nickerson T, Chang F, Lorimer D, Smeekens SP, Sawyers CL, Pollak M (2001): In vivo progression of LAPC-9 and LNCaP prostate cancer models to androgen independence is associated with increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR). *Cancer Res* 61(16), 6276-80

Oettgen P, Finger E, Sun Z, Akbarali Y, Thamrongsak U, Boltax J, Grall F, Dube A, Weiss A, Brown L et al. (2000): PDEF, a Novel Prostate Epithelium-specific Ets Transcription Factor, Interacts with the Androgen Receptor and Activates Prostate-specific Antigen Gene Expression. *J Biol Chem* 275(2), 1216-25

---

Possner M, Heuser M, Kaulfuss S, Scharf JG, Schulz W, Ringert RH, Thelen P (2008): Functional analysis of NKX3.1 in LNCaP prostate cancer cells by RNA interference. *Int J Oncol* 32(4), 877-84

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(18), 12181-8

Robert Koch-Institut (2007): [http://www.rki.de/cln\\_116/nn\\_199850/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/prostata,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/prostata.pdf](http://www.rki.de/cln_116/nn_199850/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/prostata,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/prostata.pdf) (Abrufdatum 02.02.2008)

Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2010): [http://www.rki.de/cln\\_169/nn\\_204124/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2010.pdf](http://www.rki.de/cln_169/nn_204124/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2010.pdf) (Abrufdatum 14.03.2010)

Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY, Chatterjee B (1999): Regulation of androgen action. *Vitam Horm* 55, 309-52

Russell PJ, Bennett S, Stricker P (1998): Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* 44(4), 705-23

---

Sadar MD, Hussain M, Bruchofsky N (1999): Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence. *Endocr Relat Cancer* 6(4), 487-502

Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G (2003): New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3<sup>PCA3</sup>), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology* 62(5), 34-43

Sementchenko VI, Watson DK (2000): Ets target genes: Past, present, and future. *Oncogene* 19(55), 6533-48

Simmons SO, Horowitz JM (2006): NKX3.1 binds and negatively regulates the transcriptional activity of SP-family members in prostate-derived cells. *Biochem J* 393(1), 397-409

Sood AK, Saxena R, Groth J, Desouki MM, Cheewakriangkrai C, Rodabaugh KJ, Kasyapa CS, Geradts J (2007): Expression characteristics of prostate-derived Ets factor support a role in breast and prostate cancer progression. *Hum Pathol* 38(11), 1628-38

Sökeland J, Schulze H, Rübber H: Prostatakarzinom; in: *Urologie*, 13. Auflage; hrsg. v. Sökeland J, Schulze H, Rübber H; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 2004, 301-314

---

Steinkamp MP, O'Mahony OA, Brogley M, Rehman H, Lapensee EW, Dhanasekaran S, Hofer MD, Kuefer R, Chinnaiyan A, Rubin MA (2009): Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res* 69(10), 4434-42

Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Finne P (1999): Prostate-specific antigen. *Semin Cancer Biol* 9(2), 83-93

Steuber T, Graefen M, Huland H (2006): Einfluß der PSA-Bestimmung auf Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms - eine aktuelle Standortbestimmung. *Blickpunkt der Mann* 4(3), 19-25

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(1), 25-31

Thelen P, Scharf JG, Burfeind P, Hemmerlein B, Wuttke W, Spengler B, Christoffel V, Ringert RH, Seidlová-Wuttke D (2005): Tectorigenin and other phytochemicals extracted from leopard lily *Belamcanda chinensis* affect new and established targets for therapies in prostate cancer. *Carcinogenesis* 26(8), 1360-7

Turner DP, Moussa O, Sauane M, Fisher PB, Watson DK (2007): Prostate-derived ETS factor is a mediator of metastatic potential through the inhibition of migration and invasion in breast cancer. *Cancer Res* 67(4), 1618-25

---

van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS (2003): Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 57(3), 205-25

Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM et al. (1999): Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 23(4), 387-8

Wang C, Yeung F, Liu PC, Attar RM, Geng J, Chung LW, Gottardis M, Kao C (2003): Identification of a novel transcription factor, GAGATA-binding protein, involved in androgen-mediated expression of prostate-specific antigen. *J Biol Chem* 278(34), 32423-30

Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A (1998): Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 23(6), 213-6

Wedding U, Höffken K, Hörtl W (2000): Medikamentöse Therapie des hormonsensiblen und hormonresistenten Prostatakarzinoms. *Onkologe* 6(2), 137-43

Xu LL, Srikantan V, Sesterhenn IA, Augustus M, Dean R, Moul JW, Carter KC, Srivastava S (2000): Expression profile of an androgen regulated prostate specific homeobox gene NKX3.1 in primary prostate cancer. *J Urol* 163(3), 972-9