

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

II. Medizinische Klinik und Poliklinik - Onkologie, Hämatologie,  
Knochenmarktransplantation mit der Sektion Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

**Validierung neuer potentieller Biomarker im Prostatakarzinom  
mittels vergleichender Gen- und Proteinexpressionsanalyse**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Frederike Mundt  
aus Hamburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.02.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. F. Honecker**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. T. Steuber**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. A. Lebeau**

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 DAS PROSTATAKARZINOM (PCA) .....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Risikofaktoren .....	2
1.1.3 Früherkennung und Diagnostik .....	3
1.1.4 Stadieneinteilung .....	4
1.1.5 TNM-Klassifikation des PCa.....	4
1.1.6 Gleason- <i>Grading</i> , Gleason- <i>Score</i> .....	5
1.1.7 Therapie .....	5
1.1.8 Nachsorge .....	6
1.2 BIOMARKER IM PCA .....	7
1.2.1 Das prostataspezifische Antigen (PSA).....	7
1.2.2 Varianten des PSA.....	9
1.2.3 Weitere Biomarker .....	10
1.3 DIE IN DIESER ARBEIT UNTERSUCHTEN GENE UND PROTEINE.....	11
1.3.1 ARG2 (Arginase 2).....	11
1.3.2 eIF4a3 (Eukaryotic translation initiation factor 4a3) .....	11
1.3.3 FKBP4 (FK506-binding protein 4).....	12
1.3.4 GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).....	12
1.3.5 Myc (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) ).....	12
1.3.6 PAWR (PRKC apoptosis WT1 regulator).....	12
1.3.7 PPA2 (Pyrophosphatase 2) .....	12
1.3.8 Die Peroxiredoxine PRDX3 (Peroxiredoxin 3) und PRDX4 (Peroxiredoxin 4) 13	
1.3.9 PSMA (Prostate-specific membran-antigen; auch bezeichnet als folate hydrolase FOLH1) .....	13
1.3.10 UCHL1 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1) .....	13
1.4 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR.....	13
1.5 ZIEL DIESER ARBEIT .....	14

<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
2.1 MATERIAL .....	15
2.1.1 Patientenproben .....	15
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	20
2.1.3 Kits.....	21
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	22
2.1.5 Oligonukleotide .....	24
2.1.6 Protein- und Nukleotid-Leitern .....	24
2.1.7 Antikörper.....	25
2.1.8 Weitere Materialien .....	25
2.1.9 Geräte.....	25
2.1.10 Software.....	26
2.2 METHODEN .....	26
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden .....	30
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
3.1 GENEXPRESSIONSANALYSE.....	33
3.1.1 Intraindividuelle Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene von benignen Prostata- und PCa-Gewebeproben.....	34
3.1.2 Interindividuelle Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene von cDNA aus benignen Prostata- und PCa-Gewebeproben .....	44
3.2 PROTEINEXPRESSIONSANALYSE.....	48
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>62</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>64</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>8. LEBENS LAUF.....</b>	<b>76</b>
<b>9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### Vorsätze für Maßeinheiten

k	Kilo
c	Zenti
m	Milli
μ	Mikro
n	Nano
p	Pico

### Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
A	Ampere
bp	Basenpaare
Da	Dalton
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
M	Mol pro Liter
min	Minute
mol	Mol
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
V	Volt

### Abkürzungen

%fPSA	Prozentualer Anteil von freiem PSA am Gesamt-PSA
Akt1	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AMACR	<i>α-Methylacyl Coenzyme A Racemase</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARG2	Arginase 2
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BPH	Benigne Prostatahyperplasie

---

BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>ComplementaryDNA</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
<i>cPSA</i>	Komplexiertes PSA
C <sub>T</sub> -Wert	Schwellenwert-Zyklus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4a3	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4a3</i>
ERSPC	<i>European Randomized Study Of Screening for Prostate Cancer</i>
FKBP4	<i>FK506-binding protein 4</i>
FOLH1	<i>Folate hydrolase</i>
fPSA	Freies PSA
for/fw	Vorwärts
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Human
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDR	<i>High-Dose-Rate</i>
HIFU	Hochintensiver Fokussierter Ultraschall
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ID	<i>Identification</i>
m	Murin
mRNA	<i>MessengerRNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
Myc	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
n/a	<i>Not available</i> , nicht vorhanden
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAWR	<i>PRKC apoptosis WTI regulator</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

---

PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert
Phi	<i>Prostate Health Index</i>
PLCO	<i>Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Screening Study</i>
PPA2	Pyrophosphatase 2
präOP PSA	Präoperativer PSA-Wert
PRDX3	Peroxiredoxin 3
PRDX4	Peroxiredoxin 4
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	<i>Prostate-specific membran-antigen</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rev	Rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPLP0	<i>Ribosomal protein, large, P0</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RT-qPCR	quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMA	<i>Tissue microarrays</i>
TNM	TNM-Klassifikation von Tumoren zur Stadieneinteilung von malignen Tumoren
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRUS	Transrektaler Ultraschall
Tween20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
UCHL1	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UV	Ultraviolett
WT-1	<i>Wilms tumor 1</i>

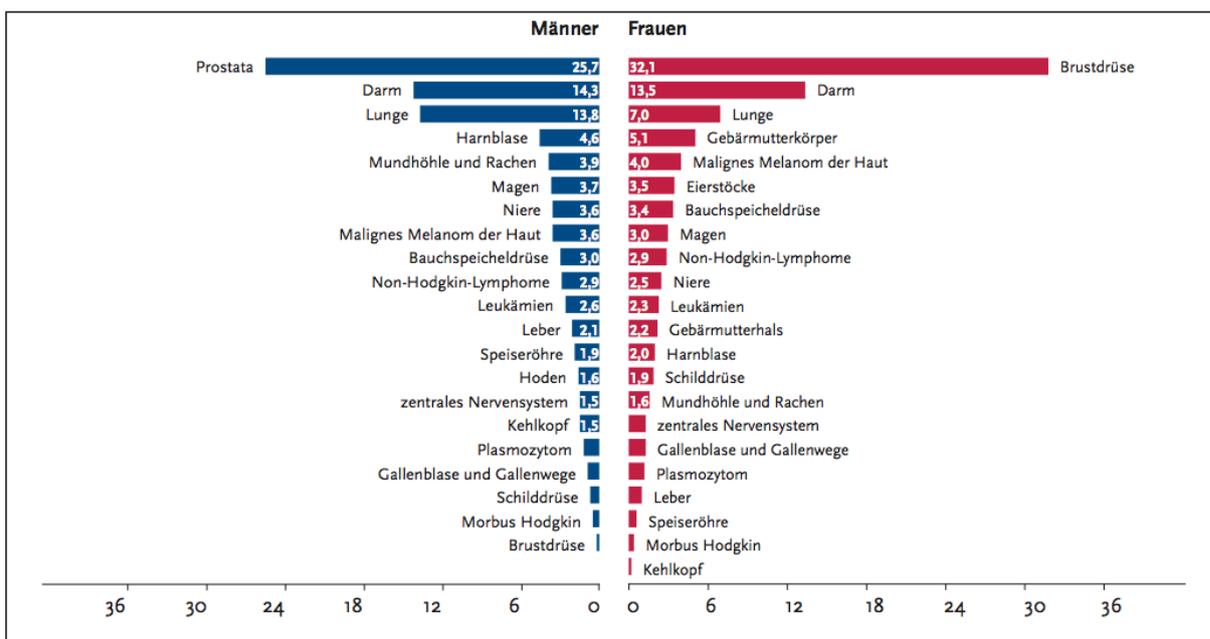
# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom (PCa)

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Zentrum für Krebsregisterdaten in Deutschland hat 2012 folgende epidemiologische Daten in „Krebs in Deutschland 2007/08“ veröffentlicht (Anon, 2012):

Das PCa ist in Deutschland das häufigste Karzinom des Mannes und die dritthäufigste Krebstodesursache des Mannes. Früherkennungsuntersuchungen und das Prostata-spezifische Antigen (PSA) - Screening haben zu einem Anstieg der Inzidenz in der Altersgruppe der 50-69-Jährigen geführt. Es wurden für 2012 67.600 Neuerkrankungen in Deutschland prognostiziert. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2008 bei 70 Jahren. Die Zahl der Neuerkrankungen ist von 1999 bis 2008 um circa 50% gestiegen, die Sterberate geht seit 2003 leicht zurück. Im Jahr 2008 sind mehr als 12.000 Patienten an den Folgen eines PCa verstorben. Das relative 5-Jahres-Überleben des PCa lag in den Jahren 2007 und 2008 bei 92% und hat damit nach dem Hodenkrebs die zweitbeste Überlebensrate aller Krebserkrankungen in Deutschland (Anon, 2012).



**Abbildung 1: Die häufigsten Tumorlokalisationen in Deutschland.** Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil der jeweiligen Tumorlokalisation an den Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2008 (ohne den nicht-melanotischen Hautkrebs) (Anon, 2012). Jede vierte Krebsneuerkrankung des Mannes ist ein PCa.



Godwin in einer Meta-Analyse von 14 Veröffentlichungen weder einen positiven noch einen negativen Zusammenhang für das Auftreten oder den Schweregrad nachweisen konnten (Stratton & Godwin, 2011). Rauchen als Risikofaktor für die Entstehung wird in aktuellen Studien unterschiedlich bewertet (Huncharek et al., 2010; Rohrmann et al., 2012). Lokale Entzündungsreaktionen der Prostata könnten bei der Entstehung des PCa eine Rolle spielen, da Inzidenzen bei Patienten mit sexuell-übertragbaren Krankheiten (Dennis & Dawson, 2002) und Prostatitis (Dennis et al., 2002) in der Anamnese erhöht zu sein scheinen.

### 1.1.3 Früherkennung und Diagnostik

Die „Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms“, herausgegeben vom Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V., empfiehlt in ihrer 1. Aktualisierung von 2011 folgendes:

Patienten, die voraussichtlich eine Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren haben und älter als 40 Jahre alt sind, sollten über die Möglichkeit einer Früherkennungsuntersuchung und die eventuellen Auswirkungen von Testergebnissen informiert werden. Ist eine PCa-Früherkennungsuntersuchung gewünscht, empfiehlt die Leitlinie die Bestimmung des PSA im Serum und eine digital rektale Untersuchung (Anon, 2011).

**Tabelle 1: Empfehlung zum weiteren Vorgehen nach Bestimmung von Serum-PSA-Werten** in Anlehnung an die „Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms“, herausgegeben vom Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (Anon, 2011)

PSA-Wert	Empfehlung
< 2 ng/ml	Kontrolle in einem Intervall von zwei Jahren, gegebenenfalls individuell längere Intervalle (je nach Alter, initialem PSA-Wert, etc.)
> 2 ng/ml	Kontrolle in einem Intervall von einem Jahr oder kürzer (je nach Höhe des initialen PSA-Werts, Einflussfaktoren prüfen, etc.)

Eine Prostatabiopsie wird laut Leitlinie empfohlen, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien zutrifft (Anon, 2011):

- Ein PSA-Wert von  $\geq 4$  ng/ml bei erstmaliger Früherkennungsuntersuchung (und nach erneuter Kontrolle)
- Auffälliger PSA-Anstieg (nach Ausschluss einer Änderung im Labor-Messverfahren)
- Suspekte digital rektale Untersuchung

Die Gewinnung von Biopsie-Material erfolgt mittels Stanzbiopsie unter transrektaler Ultraschallkontrolle. Palpatorisch suspekte Gebiete sollten laut Leitlinie gezielt biopsiert werden. Die Biopsien sollten unter einer Antibiotikaprophylaxe gewonnen werden und die Anzahl der Biopsien sollte zehn bis zwölf betragen (Anon, 2011).

Catalona et al. zeigten, dass die Kombination von digital rektaler Untersuchung und PSA-Wert die Anzahl von diagnostizierten PCa im Gegensatz zur digital rektalen Untersuchung alleine erhöht. Sie zeigten außerdem, dass die Einbeziehung des transrektalen Ultraschalls (TRUS) in die Indikationsstellung zur Biopsie nicht sinnvoll ist. In ihrer Studie wären 40% der detektierten Karzinome übersehen worden, wenn Auffälligkeiten in der TRUS Voraussetzung für eine Biopsie gewesen wären (Catalona et al., 1994).

#### **1.1.4 Stadieneinteilung**

Die Stadieneinteilung des PCa geschieht nach TNM- beziehungsweise aktueller UICC-Klassifikation (Wittekind & Meyer, 2010).

Die wichtigsten prognostischen Faktoren sind die TNM-Beurteilung, das Gleason-*Grading* und die Beurteilung der chirurgischen Resektionsränder (Anon, 2011).

#### **1.1.5 TNM-Klassifikation des PCa**

Die TNM-Klassifikation dient der Stadieneinteilung von malignen Tumoren. T beschreibt den Primärtumor, N beschreibt die Lymphknotenbeteiligung, M beschreibt die Fernmetastasen (Wittekind & Meyer, 2010). Für das PCa gilt die in Tabelle 2 gezeigte Einteilung.

**Tabelle 2: TNM-Klassifikation des PCa** (Wittekind & Meyer, 2010).

T1	Weder tastbar noch sichtbar
T1a	Weniger als 5% des Gewebes ist betroffen
T1b	Mehr als 5% des Gewebes ist betroffen
T1c	Durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Auf Prostata begrenzt
T2a	Weniger als die Hälfte eines Lappens ist betroffen
T2b	Mehr als die Hälfte eines Lappens ist betroffen
T2c	Beide Lappen sind betroffen
T3	Ausbreitung über Prostatakapsel hinaus
T3a	Ausbreitung über Prostatakapsel hinaus, Samenblase nicht infiltriert
T3b	Ausbreitung über Prostatakapsel hinaus, Samenblase infiltriert
T4	Andere Nachbarstrukturen als Samenblase sind infiltriert oder Tumor ist fixiert
N1	Regionäre Lymphknoten befallen
M1a	Nichtregionäre Lymphknoten befallen
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Andere Fernmetastasen

### 1.1.6 Gleason-Grading, Gleason-Score

Das Gleason-Grading, entwickelt von Dr. Donald F. Gleason, stellt eine Möglichkeit der histologischen Beurteilung der Architektur des PCa-Gewebes dar. Gleason sah die Einteilung in fünf histologische Muster vor, deren Differenzierung von „1“ nach „5“ abnimmt (Gleason, 1966; Humphrey, 2004). Es wird eine Summe aus dem vorherrschenden histologischen Muster und dem am zweitstärksten vertretenen histologischen Muster gebildet (Gleason, 1966; Humphrey, 2004). Der Wert der Summe ergibt den Gleason-Score (Humphrey, 2004).

### 1.1.7 Therapie

Die „Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms“, herausgegeben vom Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V., empfiehlt in ihrer 1. Aktualisierung von 2011 folgendes:

Beim lokal begrenzten, nicht-metastasierten PCa kommen sowohl eine frühe lokale Therapie mit kurativer Intention als auch die Möglichkeiten des verzögerten Vorgehens (*Active Surveillance*) und einer palliativen Therapie, je nach Patientenwunsch, -alter, Komorbiditäten und Karzinomeigenschaften in Frage. Mögliche lokale Therapien mit kurativer Intention sind die radikale Prostatektomie, gegebenenfalls mit zusätzlicher Lymphadenektomie, die externe perkutane Strahlentherapie (gegebenenfalls mit

ergänzender hormonablativer Therapie) und die Brachytherapie (*Low-Dose-Rate, LDR*, und *High-Dose-Rate, HDR*, letztere in Kombination mit perkutaner Strahlentherapie). Der „Hochintensive Fokussierte Ultraschall“ (HIFU) bei der Therapie des lokal begrenzten PCa ist aktuell noch ein experimentelles Verfahren und sollte laut S3-Leitlinie nur in prospektiven Studien Anwendung finden (Anon, 2011).

Laut Definition nach Parker beinhaltet *Active Surveillance* eine Überwachung mittels regelmäßiger PSA-Testung und wiederholten Biopsien. Wenn sich hier der Anhalt für die Progression des Karzinoms wie beispielsweise ein starker PSA-Anstieg oder ein Aufstieg im Gleason-Grading zeigt, schließt sich ein radikales Therapievorhaben an. Im *Active Surveillance* sieht man in Zeiten der steigenden Inzidenzzahlen, die mit dem Screening assoziiert sind, die Möglichkeit der Reduktion von unerwünschten Effekten der Therapien, ohne das Überleben zu beeinträchtigen (Parker, 2004).

Von diesem Konzept muss das *Watchful Waiting* abgegrenzt werden: Hier wird versucht, bei älteren Patienten mit einer Lebenserwartung von weniger als 10 Jahren eine Therapie zu vermeiden (Parker, 2004). Erst bei einem symptomatischen Leiden würde hier ein palliatives Therapieschema Anwendung finden (Parker, 2004; Anon, 2011). Beim lokal fortgeschrittenen, nicht-metastasierten PCa kommen als Therapieoptionen die radikale Prostatektomie mit Lymphadenektomie, die perkutane Strahlentherapie mit hormonablativer Therapie, die HDR-Brachytherapie (in Kombination mit perkutaner Bestrahlung) und Kombinationen dieser Verfahren je nach Patientenwunsch, -alter, Komorbiditäten und Tumoreigenschaften in Frage. Beim metastasierten PCa ist die lokale Therapie in Form von Operation und Bestrahlung sowie eine systemische Therapie in Form von hormonablativer Therapie, die Kombination dieser Verfahren und auch ein palliatives Schema möglich. Bei der Therapie des biochemischen Rezidivs stehen aktuell die perkutane Salvagestrahlentherapie nach primärer operativer Therapie und die Salvageprostatektomie nach primärer Bestrahlung im Vordergrund. Außerdem stehen beim androgen-unabhängigen oder kastrationsresistenten PCa auch die Umstellung der hormonellen Therapie, Chemotherapie und Bestrahlung sowie palliative Therapieschemata zur Verfügung (Anon, 2011).

### **1.1.8 Nachsorge**

Die „Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms“, herausgegeben vom Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und

Deutschen Krebshilfe e.V., empfiehlt in ihrer 1. Aktualisierung von 2011 folgendes:

Die Nachsorge sollte nach einer Therapie mit kurativem Ansatz spätestens nach zwölf Wochen beginnen. Das Ziel der Nachsorge ist die frühe Detektion eines biochemischen Rezidivs in Form eines PSA-Anstiegs. Laut dieser Empfehlung soll der PSA-Wert bei asymptomatischen Patienten in den ersten zwei Jahren vierteljährlich, im dritten und vierten Jahr halbjährlich und ab dem fünften Jahr jährlich bestimmt werden (Anon, 2011).

## **1.2 Biomarker im PCa**

Aktuell ist die Bestimmung des PSA-Werts im Serum ein wichtiger Bestandteil der Früherkennungsuntersuchung des PCa. Nichtsdestotrotz gerät der PSA-Wert immer wieder in die Kritik, weshalb eine Vielzahl neuer Biomarker entwickelt wurde (Artibani, 2012).

### **1.2.1 Das prostataspezifische Antigen (PSA)**

Das PSA ist eine Serinprotease und wird in den Epithelzellen der Prostata produziert (Lilja, 1985). Sävglom et al. zeigten, dass nur ein sehr geringer Teil des PSA aus der Prostata in den Blutkreislauf gelangt. Die PSA-Konzentration in der Samenflüssigkeit war in ihrer Untersuchung  $10^6$ -fach höher als im Blut (Sävglom et al., 2005).

Es ist prostataspezifisch, jedoch nicht karzinomspezifisch (Stamey et al., 1987), wodurch ebenfalls erhöhte Serum-PSA-Werte beispielsweise bei Benigner Prostat hyperplasie (BPH), Prostatitis und nach mechanischer Manipulation wie urologischen Untersuchungen möglich sind.

Stamey et al. zeigten bereits 1987, dass PCa-Patienten erhöhte Serum-PSA-Werte aufweisen (Stamey et al., 1987). Die erhöhten PSA-Serum-Werte sind jedoch nicht auf eine erhöhte Genexpression zurückzuführen, was Qiu et al. bei einer Analyse der mRNA-Expression beobachteten, bei der die PSA-mRNA im PCa-Gewebe signifikant niedriger war als im benignen Gewebe (Qiu et al., 1990). Man geht daher davon aus, dass die erhöhten Blut-PSA-Werte durch eine vermehrte Freisetzung aus einer veränderten Prostata-Struktur entstehen, obwohl dies noch nicht experimentell belegt werden konnte (Lilja et al., 2008).

Seit Einführung des Serum-PSA-Wertes als diagnostischer Marker in den USA 1994 zeigte sich eine klinisch signifikante Verschiebung zu weniger fortgeschrittenen Stadien bei der Erstdiagnosestellung (*Stage-Migration*) (Ung et al., 2002). Diese Entwicklung ist auch in Deutschland zu erkennen, wo im Jahr 2008 76% aller neudiagnostizierten PCa den Stadien T1 und T2 angehörten (Anon, 2012).

Lange war ein Hauptkritikpunkt am Screening mittels Serum-PSA-Wert, dass kein Nachweis für eine Reduktion der PCa-spezifischen Mortalität vorlag. Die zwei aktuellsten und größten Studien kamen diesbezüglich zu folgenden Ergebnissen:

Die *European Randomized Study Of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC) zeigte nach einem *Follow-up* von 11 Jahren eine signifikante Reduktion des relativen Risikos an einem PCa zu versterben um 21% in der Screening-Gruppe der 55-69-Jährigen (Schröder et al., 2012). Laut dieser Studie müssten 1055 Männer zum Screening eingeladen werden, wodurch 37 PCa entdeckt werden würden, um einen Todesfall durch das PCa zu verhindern (Schröder et al., 2012). Es zeigte sich zwar eine signifikante Reduktion in der PCa-spezifischen Mortalität, jedoch nicht in der Gesamtmortalität beliebiger Ursachen (*all-cause mortality*) zwischen Screening-Gruppe und Kontrollgruppe nach 11 Jahren (Schröder et al., 2012).

Die US-Amerikanische *Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Screening Study* fand keinen Unterschied in der Mortalität zwischen der jährlichen Screening-Gruppe und der Kontroll-Gruppe (*usual care* mit teilweise opportunistischen Untersuchungen) (Andriole et al., 2012), wird jedoch wegen methodischer Ungenauigkeiten kritisiert (Schröder, 2012).

Einer potentiellen Reduktion der Mortalität müssen jedoch auch Komplikationen der weiteren Diagnostik (Loeb et al., 2012) und der Therapie wie beispielsweise erektile Dysfunktion und Inkontinenz (Penson et al., 2008) gegenüber gestellt werden. Die Begriffe Überdiagnose und Übertherapie fallen im Zusammenhang mit dem PCa häufig. Es wird davon ausgegangen, dass in der Altersgruppe der 55-67-Jährigen die *Overdetection Rate* bei einem jährlichen Screening bei circa 50% liegt (Draisma et al., 2003).

Ein weiteres Problem zeigt sich bei der Beurteilung von PSA-Werten und der Einführung von Grenzwerten. Einerseits hat der Großteil der Männer mit erhöhten PSA-Werten kein PCa, denn der positiv prädiktive Wert in der ERSPC bei einem Grenzwert von 3 ng/ml lag bei circa 25,5% (Bokhorst et al., 2012), andererseits gibt es keinen Wert, unter dem ein Karzinom ausgeschlossen ist, was Thompson et al. zeigten. In ihrer Untersuchung gab es einen Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit eines PCa und der Höhe des PSA-Wertes zwischen 0,1 und 4 ng/ml, jedoch hatten insgesamt 15,2% der Männer mit PSA-Werten <4 ng/ml ein histologisch nachweisbares Karzinom (Thompson et al., 2004).

## 1.2.2 Varianten des PSA

### 1.2.2.1 Freies PSA (fPSA)

Der größte Anteil des PSA im Serum ist gebunden (Lilja et al., 1991). Die Bestimmung des prozentualen Anteils von freiem PSA am Gesamt-PSA (%fPSA) kann diagnostisch genutzt werden. Catalona et al. schlugen in diesem Zusammenhang vor, bei Patienten mit einem Gesamt-PSA von 4-10 ng/ml und einem freien PSA von  $\leq 25\%$  trotz unauffälliger digital rektaler Untersuchung eine Biopsie vorzunehmen. Sie legten durch ihre Veröffentlichung dar, dass so 95% der Karzinome entdeckt und 20% der unnötigen Biopsien verhindert würden (Catalona et al., 1998). In einer Meta-Analyse von Roddam et al. von 66 Studien zum diagnostischen Wert des %fPSA wurde gezeigt, dass dieser höher sei als bei der alleinigen Nutzung des Gesamt-PSA. Dabei war er signifikant besser im Gesamt-PSA-Bereich 4-10 ng/ml als im Gesamt-PSA-Bereich von 2-4 ng/ml. Im Gesamt-PSA-Bereich von 4-10 ng/ml lag die Sensitivität bei 95% und die Spezifität bei 18% (Roddam et al., 2005).

Problematisch scheint die Unterscheidung von PCa- und BPH-Patienten mit einem Prostatavolumen  $>40 \text{ cm}^3$  mittels %fPSA zu sein. Im Gegensatz zu kleineren Prostatavolumina zeigte sich Stephan et al. hier kein Unterschied des %fPSA zwischen den beiden Gruppen (Stephan et al., 1997).

### 1.2.2.2 PSA-Anstieg (*PSA-Velocity*)

Carter et al. zeigten, dass der Anstieg des PSA-Werts über eine bestimmte Zeit signifikant höher ist bei PCa-Patienten im Vergleich zu BPH-Patienten. Sie schlugen einen Grenzwert von 0,75 ng/ml Anstieg pro Jahr vor (Carter et al., 1992). Der klinische Nutzen ist umstritten, was auch eine Meta-Analyse von 87 Veröffentlichungen zeigte, die nur einen geringen Wert für die Diagnostik des frühen PCa sah (Vickers et al., 2009). Eine wichtige Bedeutung hat der PSA-Anstieg jedoch nach definitiver lokaler Therapie für die Beurteilung und Detektion von Rezidiven (Anon, 2011).

### 1.2.2.3 *PSA-Density*

Die *PSA-Density* beschreibt das Verhältnis von Serum PSA-Werten zum Prostata-Volumen (Benson et al., 1992). Tosoian und Loeb zeigten, dass verschiedene Studien widersprüchliche Ergebnisse zum diagnostischen Wert der *PSA-Density* darlegten. Sie sahen auch Probleme hinsichtlich der klinische Durchführung mittels transrektalem

Ultraschall, die je nach Untersucher zu ungenauen Untersuchungsergebnisse führen können (Tosoian & Loeb, 2010).

Allerdings scheint besonders die *cPSA-Density* (Verhältnis von komplexiertem PSA zum Prostata-Volumen) das Potential zu haben, die Spezifität in der Früherkennung vom PCa verbessern zu können (Greene et al., 2013).

#### 1.2.2.4 ProPSA

Vorformen des PSA werden ProPSA genannt. Es wurden verschiedene Unterformen entdeckt, die ein unterschiedlich langes Propeptid besitzen und zu der Gruppe der fPSA gehören (Peter et al., 2001). In einer Multicenter-Studie zeigten Stephan et al. kürzlich, dass der Anteil von p2PSA am fPSA sowie der Prostate Health Index (Phi) signifikant höher waren bei PCa-Patienten im Vergleich zur einer Kontrollgruppe ohne PCa. Phi wird berechnet durch  $p2PSA/fPSA \times \sqrt{\text{Gesamt-PSA}}$ . Diese Studie zeigte außerdem das Potential von Phi zur Detektion von aggressiven Tumoren (Gleason-Score >7) (Stephan et al., 2013).

#### 1.2.3 Weitere Biomarker

Viele weitere Biomarker wurden entwickelt und teilweise bereits in Studien untersucht. Ihr Potential wird jedoch größtenteils noch in größeren Studien zu überprüfen sein (Artibani, 2012).

Untersuchungen auf Gen-Ebene haben beispielsweise die Identifikationen von 35 *Single Nukleotide Polymorphisms* (SNPs) (Aly et al., 2011) und der Fusionsgene TMPRSS2:ERG und TMPRSS2:ETV1 (Tomlins, 2005) im PCa ermöglicht. Auf diesem Gebiet wird viel Forschung betrieben, um die Heterogenität des PCa zu verstehen und um so einerseits neue Biomarker zu entwickeln, aber andererseits auch zu Weiterentwicklungen in der Therapie zu führen (Beltran & Rubin, 2013).

Ein Beispiel für die Entwicklung eines Biomarkers nach Untersuchung der mRNA- und Proteinexpression ist  $\alpha$ -Methylacyl Coenzyme A Racemase (AMACR). Xu et al. zeigten die Überexpression von AMACR in PCa-Gewebeproben auf mRNA- und Proteinebene (Xu et al., 2000). Die histologische Testung auf PCa in Gewebeproben mittels AMACR wurde in verschiedenen Studien untersucht. Jiang et al. zeigten beispielsweise mittels Immunhistochemie eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 88% (Jiang et al., 2001). Die Möglichkeit der Anwendung in der klinischen Diagnostik wurde von Rogers et al. untersucht. Sie testeten den Urin von 26 Patienten, bei denen eine Biopsie zur

Abklärung durchgeführt wurde, auf das AMACR-Protein. Diese Testung zeigte nach Erhalt der histologischen Ergebnisse eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 58% (Rogers et al., 2004). Jamaspishvili et al. prüften die Möglichkeit der Einbindung von AMACR in Multiplex-Urin-Untersuchungen. Sie sahen darin eine nützliche Ergänzung in der Beurteilung der Notwendigkeit von diagnostischen Schritten beim Verdacht auf ein PCa (Jamaspishvili et al., 2011).

### **1.3 Die in dieser Arbeit untersuchten Gene und Proteine**

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Dr. rer. nat. S. Balabanov (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden durch eine globale, vergleichende Proteomanalyse des PCa mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die eine unterschiedliche Expression zwischen PCa- und umliegendem, benignen Prostatagewebe zeigten (Ummanni et al., 2011b; Ummanni et al., 2011a).

In dieser Arbeit wurde daher die Genexpression von insgesamt zehn Genen mittels quantitativer *real-time* PCR (RT-qPCR) sowie die Proteinexpression von vier Proteinen mittels Western-Blot untersucht. Diese Gene beziehungsweise Proteine werden im Folgenden kurz vorgestellt.

#### **1.3.1 ARG2 (Arginase 2)**

Das Gen ARG2 kodiert für das Enzym Arginase 2, welches eine Isoform der Arginase ist. Arginase katalysiert den Umbau von Arginin zu Ornithin und Urea. Die Arginase 2-Isoform liegt im Mitochondrium von extrahepatischen Geweben vor und ist besonders hoch exprimiert im Gewebe der Prostata (Iyer et al., 1998; Vockley et al., 1996). Weder ihre physiologische Funktion noch ihre potentielle Rolle bei der Tumorentstehung sind bisher ausreichend verstanden (Iyer et al., 1998; Bronte et al., 2005; Rotondo et al., 2008).

#### **1.3.2 eIF4a3 (Eukaryotic translation initiation factor 4a3)**

Das Genprodukt des eIF4a3-Gens ist ein Mitglied der *Dead-Box-Protein*-Familie. Die Proteine dieser Familie sind Teil vieler zellulärer Prozesse wie Translations-Initiation und *Splicing* (Wassarman & Steitz, 1991; Schmid & Linder, 1992). Im *exon junction complex* kommt eIF4a3 eine besonders wichtige Funktion zu (Shibuya et al., 2004).

### **1.3.3 FKBP4 (FK506-binding protein 4)**

Das Genprodukt des FKBP4-Gens ist ein Mitglied der Familie der Peptidyl-prolyl-Isomerasen. Es hat unter anderem einen Effekt auf den Androgen-Rezeptor-Signalweg der Zelle durch Bindung an das *Heat-Shock-Protein* Hsp90 (Cheung-Flynn et al., 2005). Bis heute sind nicht alle Funktionen des Genprodukts des FKBP4-Gens vollständig verstanden und es werden noch viele weitere Effekte, wie beispielsweise auf die Regulierung der Dynamik der Mikrotubuli, vermutet (Cioffi et al., 2011).

### **1.3.4 GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)**

Das Produkt des Gens GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse. Es katalysiert Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat (Rassow et al., 2012).

### **1.3.5 Myc (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian))**

Myc ist ein protein-kodierendes Gen und gleichzeitig eines der bekanntesten Protoonkogene. Sein Genprodukt fungiert als Transkriptionsfaktor für Gene, die unter anderem einen Effekt auf den Zellzyklus und die Apoptose haben. Mutationen, Translokationen und Überexpressionen dieses Gen betreffend wurden in Leukämien, Lymphomen und soliden Karzinomen beobachtet (Hoffman & Liebermann, 1998; Boxer & Dang, 2001; Hoffman et al., 2002).

### **1.3.6 PAWR (PRKC apoptosis WT1 regulator)**

Sells et al. identifizierten PAWR in Prostatazellen, in denen die Apoptose ausgelöst wurde (Sells et al., 1994). Das Genprodukt von PAWR ist ein *Leucin-Zipper*, welcher mit dem Tumorsuppressor WT1 (Wilms tumor 1) interagiert und als Hemmer der Transkription wirkt (Johnstone et al., 1996; Sells et al., 1997).

### **1.3.7 PPA2 (Pyrophosphatase 2)**

Das Genprodukt von PPA2 ist ein Enzym, welches im Mitochondrium lokalisiert ist und den anorganischen Pyrophosphatasen ähnelt, welche die Umwandlung von Pyrophosphaten katalysieren (Lundin et al., 1991).

### **1.3.8 Die Peroxiredoxine PRDX3 (Peroxiredoxin 3) und PRDX4 (Peroxiredoxin 4)**

Peroxiredoxine haben eine antioxidierende Funktion, sind Teil verschiedener intrazellulärer Signalwege und haben eine Bedeutung bei der Regulation von Zellproliferation und Apoptose (Immenschuh & Baumgart-Vogt, 2005).

PRDX3 ist im Mitochondrium lokalisiert (Wood et al., 2003). Bei einem Funktionsverlust von PRDX3 kommt es zu einer Anreicherung von Wasserstoffperoxid, welches zur Apoptose der betroffenen Zellen führt (Chang et al., 2004).

PRDX4 liegt im Zytoplasma und den Golgi-Apparaten vor (Wood et al., 2003). Bereits 1997 wurde seine Rolle bei der Regulierung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B vermutet (Jin et al., 1997).

### **1.3.9 PSMA (Prostate-specific membran-antigen; auch bezeichnet als folate hydrolase FOLH1)**

PSMA ist eine Folat-Hydrolase der Prostata (Pinto et al., 1996). Seine Expression konnte sowohl in benignem als auch in malignem Prostatagewebe nachgewiesen werden (Silver et al., 1997). Für das PSMA wird heute ein großes Potential als diagnostischer und prognostischer Marker aber auch als mögliches Therapieziel angenommen (Wolf, 2011).

### **1.3.10 UCHL1 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1)**

Das Enzym UCHL1 hydrolysiert Amide und Ester am C-terminalen Ende von Ubiquitin (Hurst-Kennedy et al., 2012). Tokumaru et al. zeigten die Funktion von UCHL1 als Tumorsuppressor-Gen, das unter anderem durch Promoter-Methylierung inaktiviert werden kann und so eine Bedeutung bei der Entstehung von Karzinomen haben könnte (Tokumaru et al., 2008). Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass bei einem Großteil der PCa-Gewebe die Promoter-Region methyliert ist und damit der Nachweis der Hypermethylierung des Promoters ein möglicher molekularer Marker für das PCa sein könnte (Ummanni et al., 2011a).

## **1.4 Quantitative *real-time* PCR**

Die quantitative *real-time* PCR (RT-qPCR) basiert auf der Kombination einer reversen Transkription mit anschließender PCR, wobei jedoch nicht nur der Nachweis der Expression einer mRNA, wie bei der regulären RT-PCR, sondern auch ein quantitativer Nachweis in Echtzeit geschieht (Anon, 2006). Dieser quantitative Nachweis gelingt durch

die Detektion eines zugefügten Fluoreszenzfarbstoffs, der sich in doppelsträngige DNA einlagert, sodass die DNA-Menge während der PCR-Zyklen gemessen werden kann (Anon, 2006).

Während der Exponentialphase verdoppelt sich im optimalen Versuch die DNA-Menge mit jedem Zyklus, sodass sich auch die Fluoreszenz verdoppelt (Anon, 2006). Der sogenannte  $C_T$ -Wert (Schwellenwert) bezeichnet die Anzahl der Zyklen, nach der ein definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird (Pfaffl, 2004). Es werden weniger Zyklen benötigt, um diesen  $C_T$ -Wert zu erreichen, wenn zu Beginn viel DNA in der Probe vorhanden war und es werden dementsprechend mehr Zyklen benötigt, wenn zu Beginn wenig DNA vorhanden war (Anon, 2006). Als Ergebnis dieser RT-qPCR erhält man die  $C_T$ -Werte, Amplifikationskurven und die Schmelzkurve. Die Schmelzkurve dient der Detektion von eventuellen Nebenprodukten (Anon, 2006). Die Amplifikationskurve dient der Beurteilung der Produkte der PCR (Anon, 2006). Die  $C_T$ -Werte von einem Zielgen und einem *Housekeeping*-Gen werden bei der relativen Quantifizierung, die in dieser Arbeit angewendet wurde, aufeinander bezogen, was auch Normalisierung genannt wird (Pfaffl, 2004). Ein *Housekeeping*-Gen ist ein Gen, dessen Expression nicht reguliert ist (Pfaffl, 2004).

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Mittels einer vergleichenden Proteomanalyse durch 2-dimensionale Gelelektroporese wurden in unserer Arbeitsgruppe diverse Proteine identifiziert, die eine unterschiedliche Expression zwischen PCa- und umliegendem, histologisch benignen Prostatagewebe aufwiesen (Ummanni et al., 2011b; Ummanni et al., 2011a).

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression besonders interessanter Kandidaten aus dieser Vorarbeit in einem größeren Patientenkollektiv auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-qPCR sowie der Analyse von Western-Blots zu validieren. Diese Ergebnisse sollen dann Grundlagen für weitere funktionelle Untersuchungen sein. Auf diese Weise können neue Biomarker für das PCa identifiziert und ihr Nutzen für den klinischen Alltag geprüft werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Alle Materialien und Geräte, die im Folgenden nicht aufgelistet wurden, entsprechen einer Standard-Laboraausstattung.

#### 2.1.1 Patientenproben

##### Prostatagewebeproben

Die Prostatagewebeproben wurden bei radikalen Prostatektomien in der Martini-Klinik Hamburg, bei präoperativ histologisch-gesichertem PCa entnommen und für dieses Forschungsprojekt zur Verfügung gestellt. Das Projekt wurde im Rahmen der NFGNplus Initiative des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert (Förderkennzeichen: 01 GS 0892). Eine Einverständniserklärung der Patienten über die Nutzung der Proben und klinischen Informationen lag vor. Ein positives Votum der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zu den Versuchen lag ebenfalls vor.

Die Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und histologisch im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf untersucht. Sie wurden dann auf einem Tissue-Tek® eingebettet, bei -80°C eingefroren und an unsere Arbeitsgruppe übergeben.

Es waren jeweils Gewebe mit histologisch gesichertem PCa und benignes Gewebe desselben Patienten zu untersuchen. Hierfür standen Proben von zunächst 17 Patienten zur Verfügung. Von zwei Patienten lagen jeweils zwei unterschiedliche PCa-Gewebe vor, die jeweils mit einer Normalgewebe-Probe desselben Patienten verglichen wurden. Somit konnten in der intraindividuellen Genexpressions-Analyse 19 PCa-/Normalgewebe-Paare miteinander verglichen werden. Für die Validierung der Ergebnisse von sechs Genen standen später Gewebeproben von vier weiteren Patienten zur Verfügung, sodass hier 23 PCa-/Normalgewebe-Paare miteinander verglichen werden konnten. Für die intraindividuelle Proteinexpressions-Analyse standen 16 PCa-/Normalgewebe-Paare zur Verfügung. Die Serum-PSA-Werte in diesem Patientenkollektiv lagen zwischen 2,33 und 11 ng/ml. Der Gleason-Grade der PCa-Gewebe lag zwischen 3+3 und 4+3 (siehe Tabelle 3).

Die Prostatagewebe-Proben auf dem Tissue-Tek® wurden nach dem Abtauen zunächst durch vorsichtiges Spülen mit isotoner Kochsalzlösung gesäubert.

Zur Isolierung von RNA und Proteinlysate wurde das Gewebestück mit einem Skalpell in zwei etwa gleich große Stücke zerteilt, wobei eine Probe im weiteren Verlauf für die molekularbiologischen Versuche und die andere Probe für die proteinbiochemischen Versuche verwendet wurde.

**Tabelle 3: Klinische Informationen zu den Prostatagewebeproben der intraindividuellen Analyse.** Enthalten sind die Informationen bezüglich Tumorstadium und Gleason-Grade des PCa sowie der präoperative PSA-Wert (in ng/ml). Ist ein Wert nicht bekannt, ist dies durch n/a (*not available*, nicht vorhanden) gekennzeichnet.

Patient	Tumorstadium	Gleason-Grade	präOP PSA
6269/09	pT2c	3+4	5,47
6385/09	n/a	n/a	n/a
6386/09	pT2c	4+3	9,31
6676/09	pT2c	3+3	11
6681/09	pT3a	3+4	6,34
7866/09	pT2c	3+4	5,98
8056/09	pT2c	3+3	7,2
12661/09	pT2c	3+4	5,4
12663/09	pT2c	3+4	6,31
12785/09	pT2a	3+3	2,33
13124/09	pT2c	3+4	5,4
13125/09	pT2c	3+4	4,22
17085/09	pT2a	3+3	6,3
18296/09	pT2a	3+4	4,63
19011/09	pT3a	3+4	3,37
19013/09	pT2c	3+4	4,27
19014/09	pT2c	3+4	10,7
34756/09	n/a	n/a	n/a
38409/09	n/a	n/a	n/a
38413/09	n/a	n/a	n/a
39028/09	n/a	n/a	n/a

### **cDNA aus Prostatagewebe (in Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, DKFZ)**

Zur Validierung der Genexpressionsuntersuchungen der Prostatagewebeproben standen außerdem cDNA-Proben des Deutschen Krebsforschungszentrums zur Verfügung (Prof. Dr. rer. nat. H. Sültmann).

Diese cDNA stammt ebenfalls ursprünglich aus radikalen Prostatektomien der Martini-Klinik, Hamburg. Auch hier lag eine Einverständniserklärung der Patienten über die Nutzung der Proben und klinischen Informationen und ein positives Votum der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vor.

Die Isolierung der RNA und Herstellung der cDNA erfolgte dann durch die Kollegen des DKFZ in Heidelberg, die uns diese Proben dann wiederum für diese Arbeit zur Verfügung stellten. Es handelte sich hierbei um 48 cDNA-Proben aus gesundem Prostatagewebe von Patienten, die an einem PCa erkrankt waren, sowie 45 cDNA-Proben aus PCa-Gewebe. Die Gewebe stammten jeweils nicht von den gleichen Patienten.

Die Serum-PSA-Werte in diesem Patientenkollektiv lagen zwischen 0,1 und 100 ng/ml. Der Gleason-Grade der PCa-Gewebe lag zwischen 3+3 und 5+4 (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Klinische Informationen zu den cDNA-Proben der interindividuellen Analyse.** Enthalten sind die Informationen bezüglich Tumorstadium und Gleason-Grade des PCa sowie der präoperative PSA-Wert (in ng/ml). Ist ein Wert nicht bekannt, ist dies durch n/a (*not available*, nicht vorhanden) gekennzeichnet. Bei der histologischen Diagnose steht Tumor für PCa-Gewebe und Normal für umliegendes, benignes Gewebe bei PCa-Patienten.

<b>Proben-ID</b>	<b>Histologische Diagnose</b>	<b>Tumorstadium</b>	<b>Gleason-Grade</b>	<b>präOP PSA</b>
<b>IGP-16</b>	Normal	pT2a	3+3	4,2
<b>IGP-17</b>	Normal	pT2a	3+3	4,6
<b>IGP-18</b>	Normal	pT2a	3+3	11,4
<b>IGP-20</b>	Normal	pT2a	3+3	9,5
<b>IGP-21</b>	Tumor	pT3b	4+5	28
<b>IGP-23</b>	Tumor	pT2c	4+3	8
<b>IGP-25</b>	Tumor	pT3a	4+5	16,48
<b>IGP-26</b>	Tumor	pT4a	5+4	4
<b>IGP-28</b>	Tumor	pT2c	3+3	4,6
<b>IGP-29</b>	Tumor	pT3a	4+3	6
<b>IGP-30</b>	Tumor	pT2c	4+3	7,9
<b>IGP-32</b>	Tumor	pT3b	5+4	2,9

<b>IGP-33</b>	Tumor	pT3a	4+5	40
<b>IGP-36</b>	Tumor	pT2c	4+3	16,7
<b>IGP-37</b>	Tumor	pT2c	4+3	14
<b>IGP-38</b>	Tumor	pT3b	4+5	48,55
<b>IGP-39</b>	Tumor	pT2c	4+3	13,43
<b>IGP-40</b>	Tumor	pT3a	4+3	12,66
<b>IGP-41</b>	Tumor	pT3b	4+3	12
<b>IGP-42</b>	Tumor	pT4	4+5	100
<b>IGP-43</b>	Tumor	pT2c	3+4	7,5
<b>IGP-44</b>	Tumor	pT3a	4+3	13,4
<b>IGP-45</b>	Tumor	pT3a	4+3	15,5
<b>IGP-47</b>	Tumor	pT3a	3+4	7,84
<b>IGP-48</b>	Tumor	pT3a	3+4	6,27
<b>IGP-49</b>	Tumor	pT3b	4+3	1,9
<b>IGP-51</b>	Tumor	pT3b	4+3	47
<b>IGP-52</b>	Tumor	pT2c	4+3	4,1
<b>IGP-54</b>	Tumor	pT3a	4+3	13,6
<b>IGP-55</b>	Tumor	pT3b	4+3	30,5
<b>IGP-57</b>	Tumor	pT2c	4+3	8,13
<b>IGP-59</b>	Tumor	pT3a	3+4	10,5
<b>IGP-60</b>	Tumor	pT3b	3+4	11,74
<b>IGP-61</b>	Tumor	pT3b	3+4	19,93
<b>IGP-62</b>	Tumor	pT3b	4+3	29,64
<b>IGP-64</b>	Tumor	pT2c	3+4	5,4
<b>IGP-75</b>	Normal	pT2a	3+4	2,29
<b>IGP-76</b>	Normal	pT2c	3+3	8,53
<b>IGP-78</b>	Normal	pT2c	3+3	7,81
<b>IGP-79</b>	Normal	pT2c	3+4	5
<b>IGP-80</b>	Tumor	pT3a	3+4	7,01
<b>IGP-81</b>	Tumor	pT3a	4+3	23
<b>IGP-82</b>	Tumor	pT3a	4+5	17,54
<b>IGP-83</b>	Tumor	pT2c	4+3	4,23
<b>IGP-84</b>	Normal	pT2a	3+3	10

<b>IGP-85</b>	Normal	pT2c	4+3	8,6
<b>IGP-86</b>	Normal	pT2a	3+4	4,47
<b>IGP-87</b>	Normal	pT3a	3+4	8
<b>IGP-88</b>	Normal	pT2c	4+3	7,23
<b>IGP-89</b>	Normal	pT2c	3+3	5,7
<b>IGP-90</b>	Normal	pT2a	3+3	1,71
<b>IGP-91</b>	Normal	pT3a	3+4	8,3
<b>IGP-92</b>	Normal	pT2c	3+4	11,36
<b>IGP-102</b>	Normal	pT2c	3+3	5,2
<b>IGP-104</b>	Normal	pT2c	4+3	9,7
<b>IGP-105</b>	Tumor	pT2c	3+3	6,4
<b>IGP-110</b>	Tumor	pT2c	4+3	37,5
<b>IGP-111</b>	Tumor	pT2a	3+4	7,8
<b>IGP-113</b>	Tumor	pT3a	4+5	16,36
<b>IGP-115</b>	Tumor	pT2c	3+3	n/a
<b>IGP-116</b>	Tumor	pT3a	3+4	6,5
<b>IGP-117</b>	Tumor	pT2a	3+3	5,52
<b>IGP-118</b>	Tumor	pT3a	3+4	16,8
<b>IGP-119</b>	Normal	pT3a	3+4	1,59
<b>IGP-120</b>	Normal	pT2c	3+4	4,18
<b>IGP-122</b>	Normal	pT3a	3+4	14,2
<b>IGP-123</b>	Normal	pT3a	3+4	12,8
<b>IGP-124</b>	Normal	pT2c	3+3	6,7
<b>IGP-126</b>	Normal	pT2a	3+3	1,71
<b>IGP-127</b>	Normal	pT2c	3+4	13,85
<b>IGP-137</b>	Normal	pT2c	3+3	8,36
<b>IGP-138</b>	Normal	pT2c	3+4	n/a
<b>IGP-139</b>	Normal	pT3a	3+4	6,34
<b>IGP-141</b>	Normal	pT2a	3+3	3,75
<b>IGP-142</b>	Normal	pT2c	3+3	4,44
<b>IGP-143</b>	Normal	pT3a	3+4	9,06
<b>IGP-144</b>	Normal	pT2c	3+4	5,29
<b>IGP-145</b>	Normal	pT2c	3+3	8,51

<b>IGP-174</b>	Normal	pT2c	3+3	6,2
<b>IGP-175</b>	Normal	pT2c	3+4	6,57
<b>IGP-176</b>	Normal	pT2c	3+3	1,75
<b>IGP-177</b>	Normal	pT3a	3+4	0,1
<b>IGP-178</b>	Normal	pT2c	3+3	7,45
<b>IGP-179</b>	Normal	pT2a	4+5	3,37
<b>IGP-180</b>	Normal	pT2c	3+4	5,3
<b>IGP-181</b>	Normal	pT2c	3+3	0,85
<b>IGP-182</b>	Normal	pT2c	3+4	4,06
<b>IGP-183</b>	Normal	pT2a	3+3	4,3
<b>IGP-184</b>	Normal	pT3a	3+4	4,5
<b>IGP-185</b>	Normal	pT2c	3+3	5,6
<b>IGP-186</b>	Normal	pT2c	3+3	5,51
<b>IGP-188</b>	Normal	pT2c	3+4	6,5
<b>IGP-190</b>	Tumor	pT3b	3+4	7,32

### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Acrylamid 30%	Roth
Agarose, UltraPure	Invitrogen
APS	Merck
Albumin Fraktion V	Roth
Bradford-Reagenz Protein Assay	Bio-Rad
Bromphenolblau	Roth
Chaps	Roth
Chloroform	Sigma-Aldrich
DEPC- H <sub>2</sub> O	Invitrogen
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	Fermentas
DTT	Merck
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich

Glycin	Roth
Glycerol	Roth
Isopropanol	Roth
Isotone Kochsalzlösung	Baxter S.A.
Methanol	Merck
PBS (Instamed 9,55 g/l PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg <sup>2+</sup> )	Biochrom
Pierce ECL Western Blot Substrat	Thermo
Salzsäure (HCl), 37% rauchend	Roth
SDS	Roth
TEMED, PlusOne	Amersham
Thiourea	Sigma-Aldrich
Tissue-Tek®	Sakura
Trifast	Peqlab
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tween20	Sigma-Aldrich
Urea	Sigma-Aldrich
Wasser, nukleasefrei	Fermentas

### 2.1.3 Kits

Name	Komponenten	Hersteller
DNA-Verdau „DNase I“	DNase I 10x Reaktionspuffer Stop-Solution (EDTA)	Sigma-Aldrich
cDNA-Synthese “First Strand cDNA Synthesis Kit”	M-MuLV-Reverse Transcriptase RiboLock RNase Inhibitor 5x Reaction Buffer for M-MuLV RT dNTP-Mix Oligo(dT)-Primer Water, nuclease free	Fermentas
Realtime-qPCR “DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit F-415”	2x Master Mix	Finnzymes

**2.1.4 Puffer und Lösungen**

Name	Zusammensetzung	Lagerung
1x TE-Puffer	10 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) mit H <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen autoklavieren	RT
50x TAE-Puffer	242 g Tris-Base 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 57,1 ml Essigsäure mit H <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen	RT
SDS-Loading-Dye 4x	2 ml Glycerol 50 mg DTT (4°C) 2 ml 1 M Tris-HCl pH 6,7 100 µl 4% Bromphenolblau (-20°C) 400 mg SDS mit H <sub>2</sub> O auf 5 ml auffüllen, aliquotieren	-20°C
BSA (100 mg/ml)	100 mg Albumin Fraktion V gelöst in 1 ml 1x PBS-0,05%Tween20	-20°C
Semi-Dry-Transferpuffer	11,64 g Tris-Base 5,86 g Glycin 3,76 ml 20% SDS 400 ml Methanol mit H <sub>2</sub> O auf 2000 ml auffüllen	4°C
Laufpuffer 5x	360 g Glycin 75 g Tris-Base 25 g SDS mit H <sub>2</sub> O auf 5000 ml auffüllen	RT

Waschpuffer (1x PBS-0,05% Tween20)	1x PBS auf 1000 ml H <sub>2</sub> O 0,5 ml Tween20	RT
DIGE-Lysepuffer	3 ml 1 M Tris-HCl pH 7,6 15,22 g 2 M Thio-Harnstoff 42 g 7 M Harnstoff 4 g 4% CHAPS mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen, aliquotieren	-20°C
0,5 M TRIS/HCl pH 6,8	50 mM DTT 6 g Tris-Base 60 ml H <sub>2</sub> O auf pH 6,8 einstellen mit H <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen	RT
1,5 M TRIS/HCl pH 8,8	27,23 g Tris-Base 80 ml H <sub>2</sub> O auf pH 8,8 einstellen mit H <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen	RT
1 M TRIS/HCl pH 6,7	121,14 g Tris-Base 600 ml H <sub>2</sub> O auf pH 6,7 einstellen mit H <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen	RT
1 M TRIS/HCl pH 7,5	121,14 g Tris-Base 600 ml H <sub>2</sub> O auf pH 7,5 einstellen mit H <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen	RT
1M TRIS/HCl pH 7,6	121,14 g Tris-Base 600 ml H <sub>2</sub> O auf pH 7,6 einstellen mit H <sub>2</sub> O auf 1000 ml auffüllen	RT

### 2.1.5 Oligonukleotide

#### RT-PCR-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Hersteller
h-RPLP0-for	5' TTG TGT TCA CCA AGG AGG AC 3'	MWG
h-RPLP0-rev	5' GAC TCT TCC TTG GCT TCA AC 3'	MWG

#### RT-qPCR-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz	Hersteller
h-Myc-fw	5' TCA AGA GGC GAA CAC ACA AC 3'	MWG
h-Myc-rev	5' GGC CTT TTC ATT GTT TTC CA 3'	MWG
h-UCHL1-fw	5' GAG CGT GAG CAA GGA GAA GT 3'	MWG
h-UCHL1-rev	5' TTG AAG GGA AGA GGG GAA AT 3'	MWG
h-PSMA-fw	5' CAG CGT GGA AAT ATC CTA AAT CTG A 3'	MWG
h-PSMA-rev	5' TTG GAT GAA CAG GAA TAC TTG GAA 3'	MWG

Oligonukleotid	Kat.-No	Hersteller
h-PRDX3	Quantitect Primer Assay QT00092813	Qiagen
h-PRDX4	Quantitect Primer Assay QT00014637	Qiagen
h-PPA2	Quantitect Primer Assay QT00077987	Qiagen
h-FKBP4	Quantitect Primer Assay QT01681694	Qiagen
h-eIF4a3	Quantitect Primer Assay QT00058926	Qiagen
h-PAWR	Quantitect Primer Assay QT00051499	Qiagen
h-ARG2	Quantitect Primer Assay QT00084861	Qiagen
h-GAPDH	Quantitect Primer Assay QT01192646	Qiagen

### 2.1.6 Protein- und Nukleotid-Leitern

Leiter	Größenbereich	Hersteller
peqGOLD DNA-Leiter Mix Orange G	100-10000 bp	Peqlab
peqGOLD Protein-Marker IV	10-170 kDa	Peqlab

### 2.1.7 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Antikörper	Cat-No.	Produzent	Art	Verdünnung	Hersteller
Anti-ARG2	SC-20151	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Santa Cruz
Anti-PRDX3	LF-MA0045	Maus	monoklonal	1:1000	Abfrontier
Anti-PRDX4	LF-MA0014	Maus	monoklonal	1:1000	Abfrontier
Anti-eIF4a3	ab-32485	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Abcam
Anti-GAPDH	MAB374	Maus	monoklonal	1:5000	Chemicon

#### Sekundäre Antikörper

Antikörper	Cat-No.	Produzent	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus	NXA931	Schaf	HRP	1:10000	GE Healthcare
Anti-Kaninchen	7074S	Ziege	HRP	1:10000	Cell Signaling

### 2.1.8 Weitere Materialien

Material	Hersteller
Immobilion PVDF Transfer Membran 0,045 µm Pore	Millipore
Whatman-Papier Blotting-Papier (extra-dick)	Bio-Rad

### 2.1.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Amersham Hyperfilm™	GE Healthcare
Homogenisierer OMNI TIP Homogenizing Kit	Omni
Gel-Dokumentation, Cabinet Eagle Eye II	Stratagene
Mastercycler Gradient	Eppendorf
MX3000P qPCR-System	Stratagene
Nanodrop, ND 1000	Peqlab
Photometer, DU 530	Beckmann
Scanner, GS-800 Calibrated Densitometer	Bio-Rad
Thermocycler, iCycler	Bio-Rad

Thermomixer comfort	Eppendorf
Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Ultraschallprozessor UP50H	Hielscher
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

### 2.1.10 Software

Für die Auswertung der Genexpressionsdaten aus der RT-qPCR wurde die Software MX3000P der Firma Stratagene genutzt. Die Quantifizierung der Western-Blots für die Beurteilung der Proteinexpression wurde mit der Software Quantity One 4.5.2 der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Isolierung von RNA

Die Prostata-Gewebestücke wurden jeweils in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Trifast gegeben, mit dem *OMNI TIP Homogenizing Kit* homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Reaktionsgefäß für 15 s über Kopf geschwenkt. Es folgte eine Inkubation für 3 min bei RT. Um im Folgenden eine Phasentrennung zu erreichen, wurde die Lösung zentrifugiert (13 000 rpm, 15 min, 4°C). Die wässrige, farblose RNA-Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Es folgte die Zugabe von 500 µl Isopropanol, um die RNA zu präzipitieren. Nach einer Inkubation für 20 min bei RT und einer Zentrifugation (13 000 rpm, 15 min, 4°C) wurde der flüssige Anteil der Lösung verworfen und das am Boden des Reaktionsgefäßes befindliche RNA-Pellet zweimalig mit 75% Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Waschschrritten erfolgte bei 10 000 rpm, 10 min, 4°C. Im Anschluss an die Waschschrritte wurde das Pellet luftgetrocknet. Anschließend wurde es in 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 55°C für 10 min auf dem Heizblock gelöst. Daraufhin wurde das Reaktionsgefäß für 10 s auf Eis gestellt und der Inhalt in gleichen Teilen auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Eine Probe wurde zunächst bei -80°C gelagert. Mit der anderen Probe wurde weitergearbeitet und die DNA entfernt. Hierzu wurde zu den

20 µl gelöster RNA im Reaktionsgefäß 2,5 µl 10-fach-Reaktionspuffer und 2,5 µl DNase I gegeben. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei RT. Anschließend wurde 1 µl Stop-Solution (EDTA) zur Inaktivierung der DNase hinzugegeben und für 10 min bei 70°C auf dem Heizblock inkubiert.

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm mit dem Nanodrop.

### 2.2.1.2 cDNA-Synthese

Zunächst wurden 1 µg RNA, 1 µl Oligo(dT)-Primer (=0,5 µg/ µl) und 1 µl dNTP-Mix (=10 mM/Nukleotid) zusammen gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 14 µl gebracht. Das Reaktionsgefäß wurde auf einem Heizblock für 5 min bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt und 4 µl Reaktionspuffer (5x, DTT enthalten) sowie 1 µl RNase-Inhibitor hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 2 min bei 42°C auf den Heizblock inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase und vorsichtigem Mischen erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes für 60 min bei 42°C auf dem Heizblock. Die Enzymaktivität wurde anschließend durch Erhitzen auf 70°C für 15 min beendet. Der cDNA-Ansatz wurde dann 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Im Anschluss wurde die cDNA-Synthese durch eine PCR und elektrophoretische Auftrennung überprüft. Ein weiterer Ansatz wurde wie zuvor beschrieben angesetzt, allerdings ohne Zugabe von Reverser Transkriptase und als Negativ-Kontrolle genutzt.

### 2.2.1.3 PCR und Agarosegelelektrophorese zur Qualitätsüberprüfung der cDNA

Die Qualität der zuvor hergestellten cDNA wurde nun durch den Nachweis des *Housekeeping*-Gens RPLP0 (*ribosomal protein, large, P0*, NCBI Accession Nummer NM\_001002) in einer PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft.

Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	12,5 µl
cDNA (1:5 verdünnt)	2 µl
RPLP0-Primer-Mix f+r (10 pmol/µl je Primer)	2 µl
H <sub>2</sub> O	8,5 µl

Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	} 30
Annealing	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Hold	4°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden zur Analyse in einem elektrischen Feld der Größe nach in einem Agarosegel aufgetrennt. Hierfür wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel (1% Agaroseanteil in TAE-Puffer, 1 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen und bei 100 V getrennt. Durch den interkalierenden DNA-Farbstoff Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Hiermit wurde kontrolliert, ob in der zuvor hergestellten cDNA das *Housekeeping*-Gen RPLP0 synthetisiert wurde und somit eine erfolgreiche cDNA-Synthese stattgefunden hat.

#### 2.2.1.4 RT-qPCR

Mit Hilfe der RT-qPCR wurden die mRNA-Expressionen folgender Gene bestimmt:

Name	Genname	NCBI Accession
Arginase 2	ARG2	NM_001172
Eukaryotic translation initiation factor 4a3	eIF4a3	NM_014740
FK506-binding protein 4	FKBP4	NM_002014
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	NM_002046
v-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogen Homolog	MYC	NM_002467
PRKC apoptosis WT1 regulator	PAWR	NM_002583
Pyrophosphatase 2	PPA2	NM_001034191
Peroxiredoxin 3	PRDX3	NM_006793
Peroxiredoxin 4	PRDX4	NM_00640
Prostate-specific Membrane Antigen oder Folate hydrolase 1	PSMA oder FOLH1	NM_001193471
Ubiquitin Carboxyl-terminal Esterase L1	UCHL1	NM_004181

Bei der intraindividuellen Analyse wurde die Expression der Gene ARG2, eIF4a3, FKBP4, MYC, PAWR, PPA2, PRDX3, PRDX4, PSMA und UCHL1 auf GAPDH normalisiert und analysiert. Bei der interindividuellen Analyse wurde die Expression der Gene PPA2, PRDX3, PRDX4 und UCHL1 auf GAPDH normalisiert und analysiert.

Die RT-qPCR wurde wie folgt angesetzt:

2x SYBRGreen-Mastermix	10 µl
Quantitect Oligonukleotid-Mix	2 µl
cDNA (1:5 verdünnt)	2 µl
H <sub>2</sub> O	6 µl

Der Ansatz erfolgte zur Bestimmung der relativen Expression der mRNA eines Zielgens im Verhältnis zum *Housekeeping*-Gen GAPDH. Hierfür wurde der Ansatz sowohl für das Zielgen als auch für GAPDH in Triplikaten auf einer 96-Well-Platte aufgebracht. Um eine Kontamination auszuschließen, erfolgte der Ansatz einer Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O an Stelle von cDNA. Bevor das RT-qPCR-Programm gestartet wurde, erfolgte der luftdichte Verschluss und eine Zentrifugation der 96-Well-Platte bei 800 rpm für 1 min bei RT.

Die RT-qPCR wurde nach folgendem Programm mit dem MX3000P qPCR-System von Stratagene durchgeführt:

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	7 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	} 40
Annealing	62°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Schmelzkurve	50°C ... 95°C		

### 2.2.1.5 Auswertung der RT-qPCR mittels $\Delta C_T$ -Methode

Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der  $\Delta C_T$ -Methode mit einem Referenzgen (GAPDH) ausgewertet (Anon, 2006). Hierfür wurde der Mittelwert der  $C_T$ -Werte der Triplikate errechnet und für die Berechnung der Expression in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Relative Expression} = 2^{CT(\text{Housekeeping-Gen}) - CT(\text{Zielgen})}$$

Diese relativen Expressionen ließen sich nun zwischen den verschiedenen Proben vergleichen. Eine statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism und dem t-Test für abhängige Stichproben beziehungsweise dem einfachen t-Test.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Proteinextraktion**

Das Prostata-Gewebestück wurde in ein Reaktionsröhrchen mit 500 µl DIGE-Lyse Puffer gegeben. Der DIGE-Puffer wurde verwendet, da die Proben auch für andere Versuche genutzt worden sind. Die Probe wurde auf Eis stehend zerkleinert und dann mit einem Ultraschallstab jeweils drei Mal 20 s homogenisiert. Der gesamte Inhalt des Röhrchens wurde daraufhin in ein Reaktionsgefäß pipettiert und zentrifugiert (14 000 rpm, 10 min, RT). Dann wurden 35 µl zur Proteinbestimmung genutzt und weitere Proben bei -80°C gelagert.

### **2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford genutzt (Bradford, 1976). Sie erfolgte mit Hilfe einer BSA-Eichreihe bei der Stammlösungen mit folgenden Konzentrationen angesetzt wurden 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 bzw. 10 mg BSA in DIGE-Lysepuffer. Zu 30 µl dieser Stammlösungen, beziehungsweise der zu untersuchenden Probe, wurden 30 µl 0,1 M HCl-Lösung und 240 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Zu 25 µl dieser Lösung wurde 875 µl Bradford-Reagenz (1:5 verdünnte Lösung, filtriert) gegeben und gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm. Wenn  $r^2$  der Standardkurve annähernd bei 1 lag, wurde die Kurve verwendet und die Proben gemessen. Mit Hilfe der BSA-Eichgeraden wurden dann die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt.

### **2.2.2.3 Western-Blot**

#### **Vorbereitung der Proben**

Zunächst wurden 120 µg Protein und 60 µl Loading-Dye zusammengegeben und mit DIGE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 180 µl gebracht. Die Proben wurden dann bis zur Nutzung bei -80°C eingefroren.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Es wurden 12%ige Trenngele verwendet, die folgende Zusammensetzung aufwiesen:

3,35 ml	H <sub>2</sub> O
4 ml	30% Acrylamid
2,5 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
50 µl	20% SDS

Unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurden außerdem 50 µl 10%iges APS und 10 µl TEMED hinzugefügt. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig gemischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Oberkante des Gels wurde mit Isopropanol beschichtet. Das Isopropanol wurde abgegossen, als die Polymerisation abgeschlossen war (nach circa 30 min). Die Oberkante des Gels wurde daraufhin mit Wasser gespült. Anschließend wurde ein 4%iges Sammelgel hergestellt, das folgende Zusammensetzung aufwies:

3,05 ml	H <sub>2</sub> O
665 µl	30% Acrylamid
1,25 ml	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
25 µl	20% SDS

Unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurden außerdem 25 µl 10%iges APS und 5 µl TEMED hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen, wurden sie auf die Trenngele gegeben und ein Kamm eingesetzt, um die Taschen zu formen. Es folgte eine Polymerisation von circa 30 min. Nach dem Abschluss der Polymerisation wurden die Kämmen entfernt und die Taschen mit Laufpuffer gespült.

### **Gelelektrophorese**

Die Gele wurden in Laufkammern eingesetzt und diese mit 1xSDS-Puffer gefüllt. Es folgte das Beladen der Taschen, wobei in erster Position 10 µl Proteingrößenstandard und in die folgenden Taschen 30 µl der vorbereiteten Proteinlysate aufgetragen wurde. Anschließend wurde der Lauf bei einer Stromspannung von 120 V durchgeführt und beendet, wenn die Lauffront annähernd am Ende des Gels angelangt war. Das Gel wurde von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel vom Trenngel entfernt.

### **Semi-Dry-Blot**

Das Trenngel wurde zum Blotten verwendet und für einige Minuten in Transferpuffer gelegt. Eine Membran in der Größe des Trenngels wurde aktiviert, indem sie für 15 s in Methanol, für 2 min in H<sub>2</sub>O und für 5 min in Transferpuffer gelegt wurde.

Zwei Whatman-Papiere wurden vorbereitet und ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Nun wurde ein Whatman-Papier in die Semi-Dry-Transfer-Zelle gelegt. Dann wurden die aktivierte Membran, das Trenngel und das zweite Whatman-Papier aufgelegt. Luftblasen wurden herausgestrichen. Die Transfer-Zelle wurde geschlossen und die Proteine für 1 Stunde bei 1,2 mA/cm<sup>2</sup> auf die Membran übertragen. Im Anschluss wurde die Membran für einige Sekunden in Methanol gelegt und dann luftgetrocknet.

### **Inkubation mit Antikörpern und Detektion**

Die Inkubation mit der Primärantikörper-Lösung (1:1000 beziehungsweise 1:5000 verdünnt in Waschpuffer; siehe 2.1.7 Antikörper, Primäre Antikörper) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Antikörperlösung wurde dann entfernt und die Membran anschließend drei Mal mit Waschpuffer für 5 min gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Es wurden folgende Proteine untersucht:

Arginase 2 (ARG2)

Eukaryotic translation initiation factor 4A3 (eIF4a3)

Peroxiredoxin 3 (PRDX3)

Peroxiredoxin 4 (PRDX4)

Anschließend folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:10000 verdünnt in Waschpuffer; siehe 2.1.7 Antikörper, Sekundäre Antikörper) für 1 Stunde bei RT. Dann wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran erneut drei Mal mit Waschpuffer für 5 min gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit jeweils 0,5 ml der beiden Komponenten des Pierce ECL Western Blot Substrats bedeckt und für 1 min inkubiert. Die Membran wurde dann in eine Röntgenkassette gelegt und ein Röntgenfilm mit der Membran exponiert (Dauer variierte je nach Antikörper) und im Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> entwickelt. Die Röntgenfilme wurden daraufhin eingescannt und die Westernblots mit der Software Quantity One quantifiziert. Als Kontrolle zur relativen Quantifizierung wurde GAPDH verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism und dem t-Test für abhängige Stichproben.

## 3 Ergebnisse

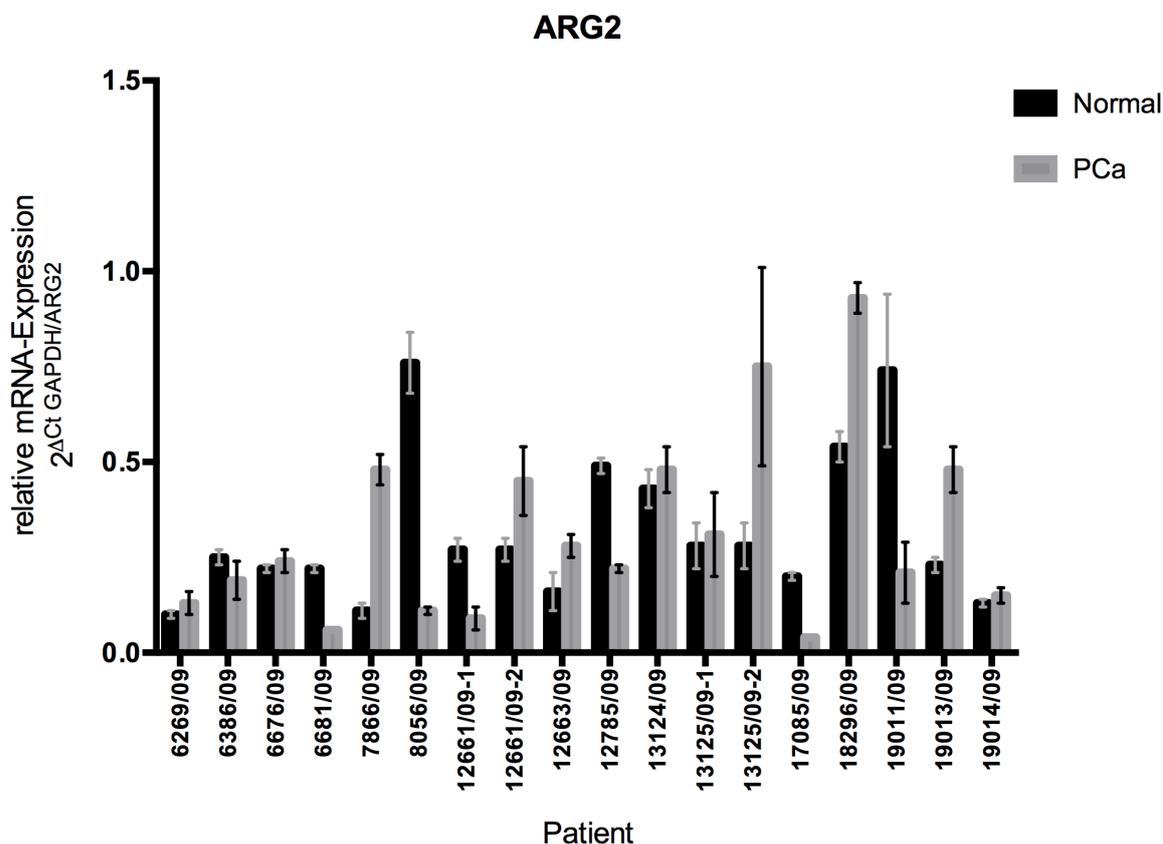
### 3.1 Genexpressionsanalyse

Für die Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene wurde die relative Expression von dem zu untersuchenden Zielgen bezogen auf GAPDH ( $2^{\Delta Ct_{GAPDH/Zielgen}}$ ) mittels RT-qPCR ermittelt. Es wurden Triplikate gemessen und der Mittelwert dieser gebildet. Zunächst werden die Ergebnisse vorgestellt, bei denen jeweils die PCa- und die Normal-Prostatagewebeprobe vom selben Patienten stammten (siehe 2.1.1 Patientenproben, Tabelle 3), im Folgenden als intraindividuelle Analyse bezeichnet.

Dann folgt die Vorstellung der Ergebnisse der cDNA-Proben aus der Kooperation mit dem DKFZ. Hier wurde eine größere Anzahl von Proben untersucht. Die Normal-cDNA aus benignem Prostatagewebe, von Patienten mit PCa, und PCa-cDNA-Proben waren von jeweils unterschiedlichen Patienten (siehe 2.1.1 Patientenproben, Tabelle 4). Dies wird im Folgenden als interindividuelle Analyse bezeichnet.

### 3.1.1 Intraindividuelle Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene von benignen Prostata- und PCa-Gewebeproben

**ARG2 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe nicht verstärkt exprimiert**



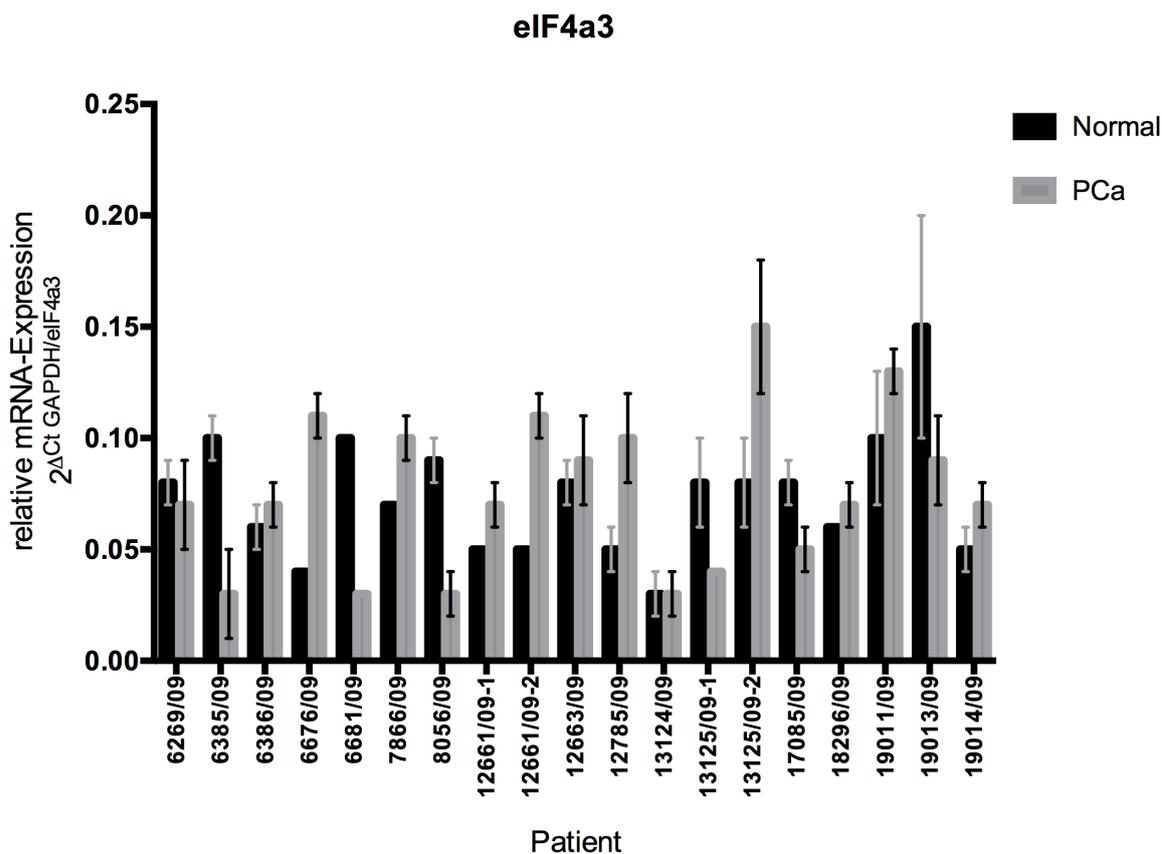
**Abbildung 3: Expression von ARG2 auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta C_t \text{ GAPDH/ARG2}}$  von ARG2 normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor (n=18). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,9499$  und somit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 3 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen ARG2 normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten (n=18). Die Normalgewebe- und PCa-cDNA von einem Patienten (6385/09) mussten für dieses Gen ausgeschlossen werden, da hier sehr hohe Ct-Werte gemessen worden sind, was zu ungenauen Werten für die relative Expression dieser Proben führte. Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für ARG2 lag bei elf Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei sieben Patienten lag der Mittelwert im Normalgewebe höher als

im PCa-Gewebe. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte sich, dass die relative Expression von ARG2 normalisiert auf GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeprobe derselben Patienten nicht signifikant erhöht war ( $p=0,9499$ ).

**eIF4a3 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe nicht verstärkt exprimiert**



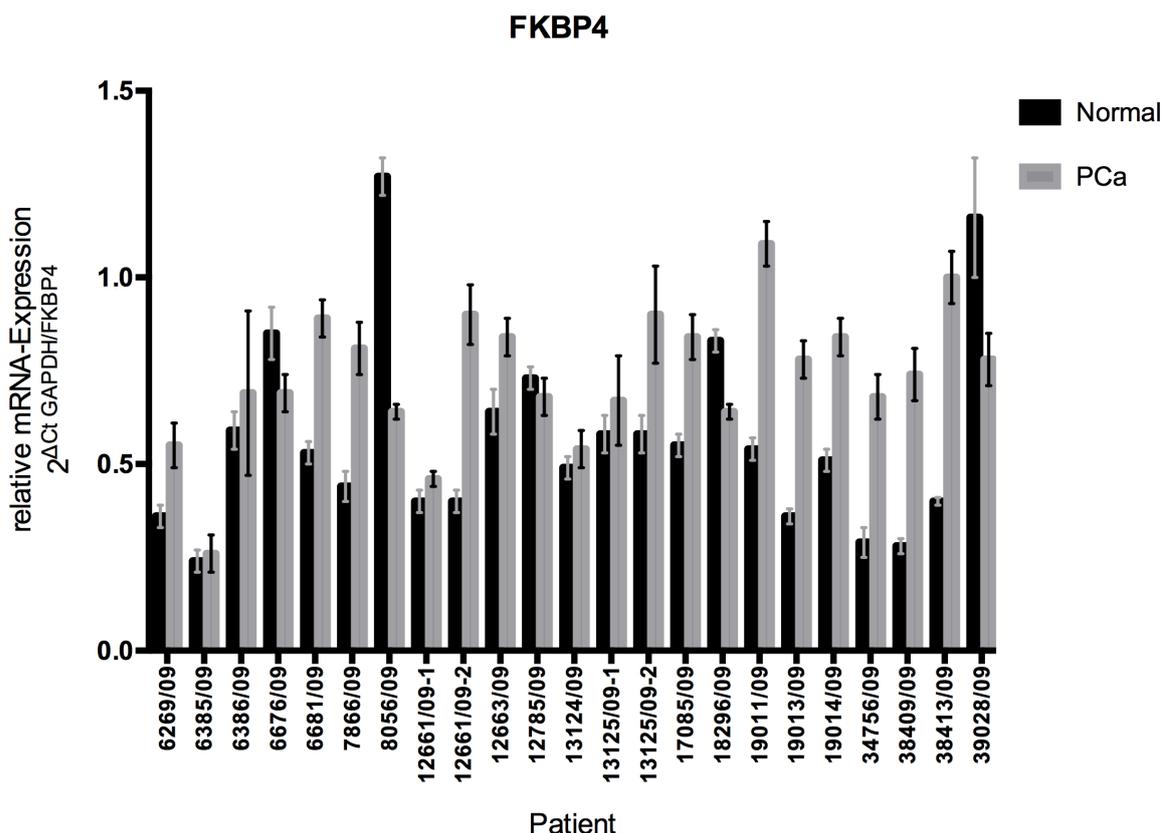
**Abbildung 4: Expression von eIF4a3 auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH}/eIF4a3}$  von eIF4a3 normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=19$ ). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,8446$  und somit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 4 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen eIF4a3 normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten ( $n=19$ ). Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für eIF4a3 war bei elf Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei sieben Patienten war der Mittelwert im Normalgewebe

höher als im PCa-Gewebe. Bei einem Patienten zeigte sich kein Unterschied. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte sich, dass die relative Expression von eIF4a3 normalisiert auf GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben derselben Patienten nicht signifikant erhöht war ( $p=0,8446$ ).

**FKBP4 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe signifikant stärker exprimiert**



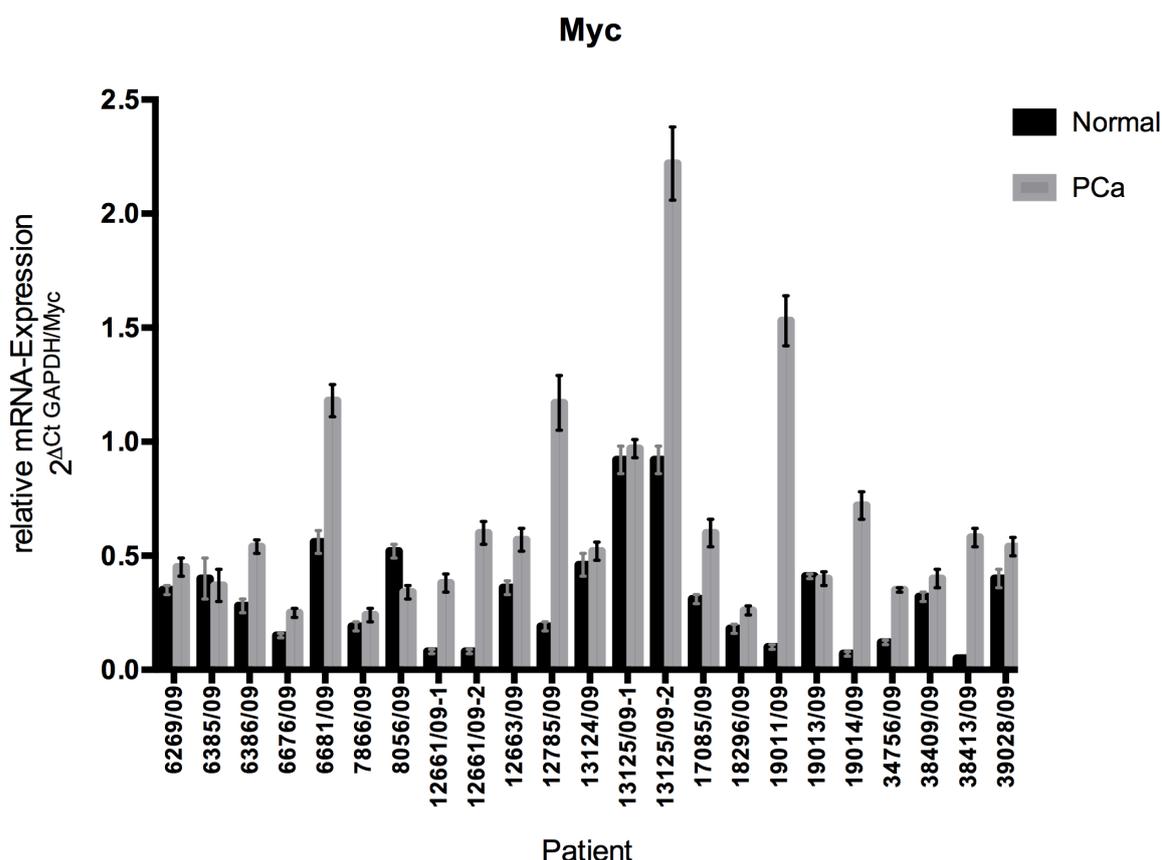
**Abbildung 5: Expression von FKBP4 auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta C_t \text{ GAPDH}/\text{FKBP4}}$  von FKBP4 normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=23$ ). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,0147$  und somit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 5 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen FKBP4 normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten ( $n=23$ ). Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für FKBP4 lag bei 18 Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei fünf Patienten lag der Mittelwert im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige

Stichproben zeigte sich, dass die relative Expression von FKBP4 normalisiert auf GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebepben derselben Patienten signifikant erhöht war ( $p=0,0147$ ).

### **Myc ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe signifikant stärker exprimiert**



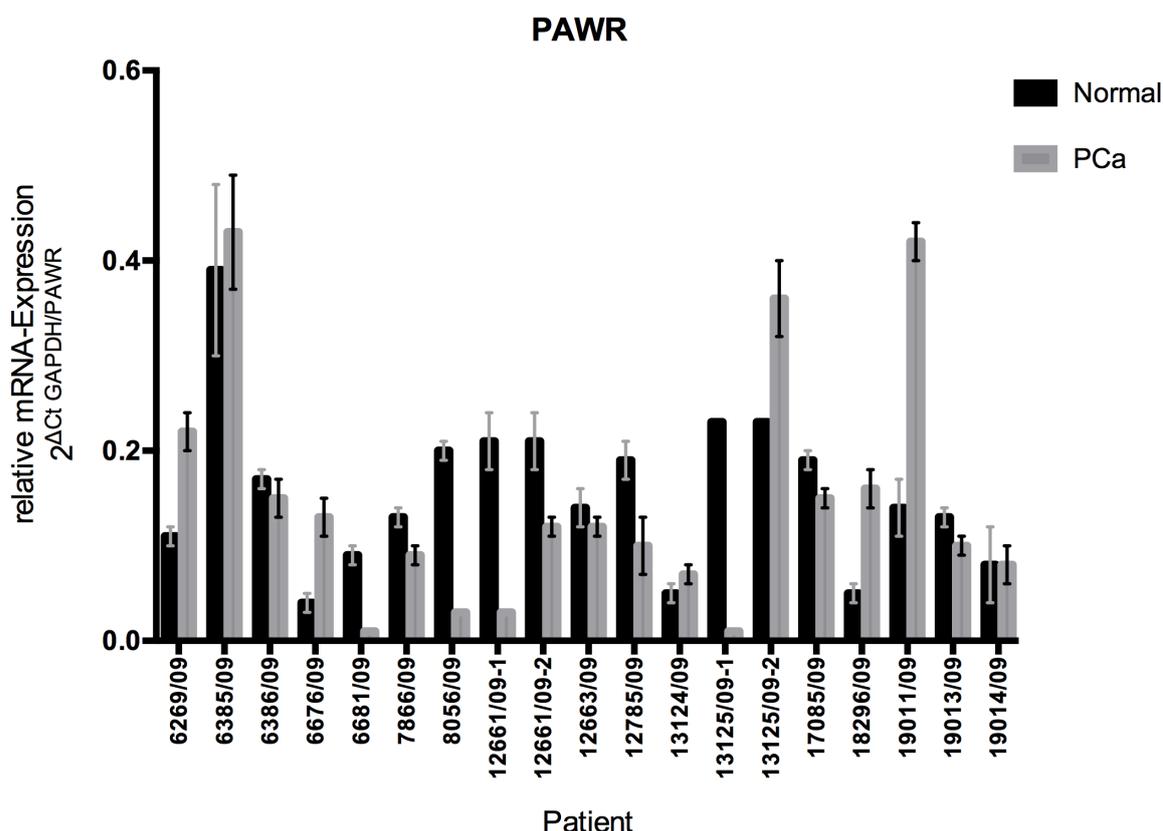
**Abbildung 6: Expression von Myc auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta Ct \text{ GAPDH/Myc}}$  von Myc normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=23$ ). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,0009$  und somit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 6 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen Myc normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten ( $n=23$ ). Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für Myc lag bei 20 Patienten im PCa-Gewebe über dem Mittelwert des Normalgewebes. Bei drei Patienten war der Mittelwert im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Die Anwendung des t-Tests für abhängige

Stichproben zeigte, dass die relative Expression von Myc normalisiert auf GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben derselben Patienten signifikant erhöht war ( $p=0,0009$ ).

**PAWR ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe nicht verändert exprimiert**



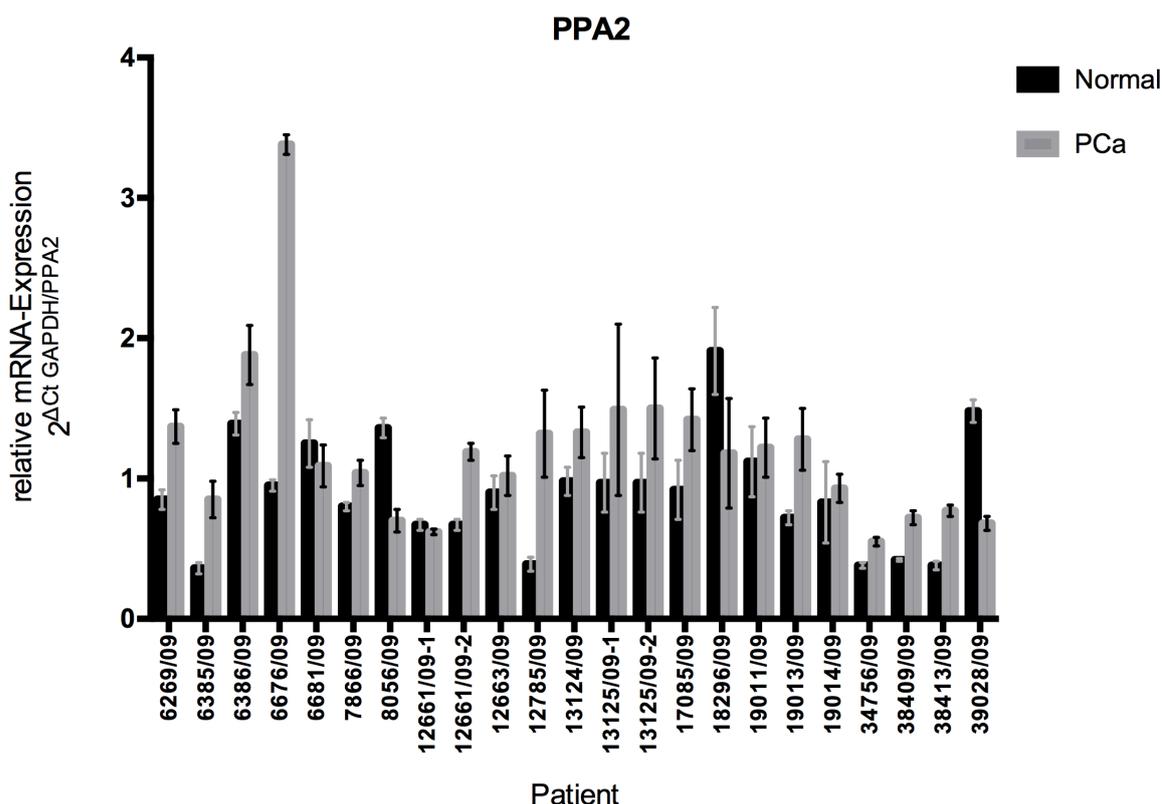
**Abbildung 7: Expression von PAWR auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta Ct \text{ GAPDH/PAWR}}$  von PAWR normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=19$ ). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,7096$  und somit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 7 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen PAWR normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten ( $n=19$ ). Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für PAWR war bei sieben Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei elf Patienten lag der Mittelwert im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Bei einem Patienten zeigte sich kein Unterschied. Die Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte, dass die

relative Expression von PAWR normalisiert auf GAPDH keinen signifikanten Unterschied zwischen den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben aufzeigte ( $p=0,7096$ ).

**PPA2 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe signifikant stärker exprimiert**



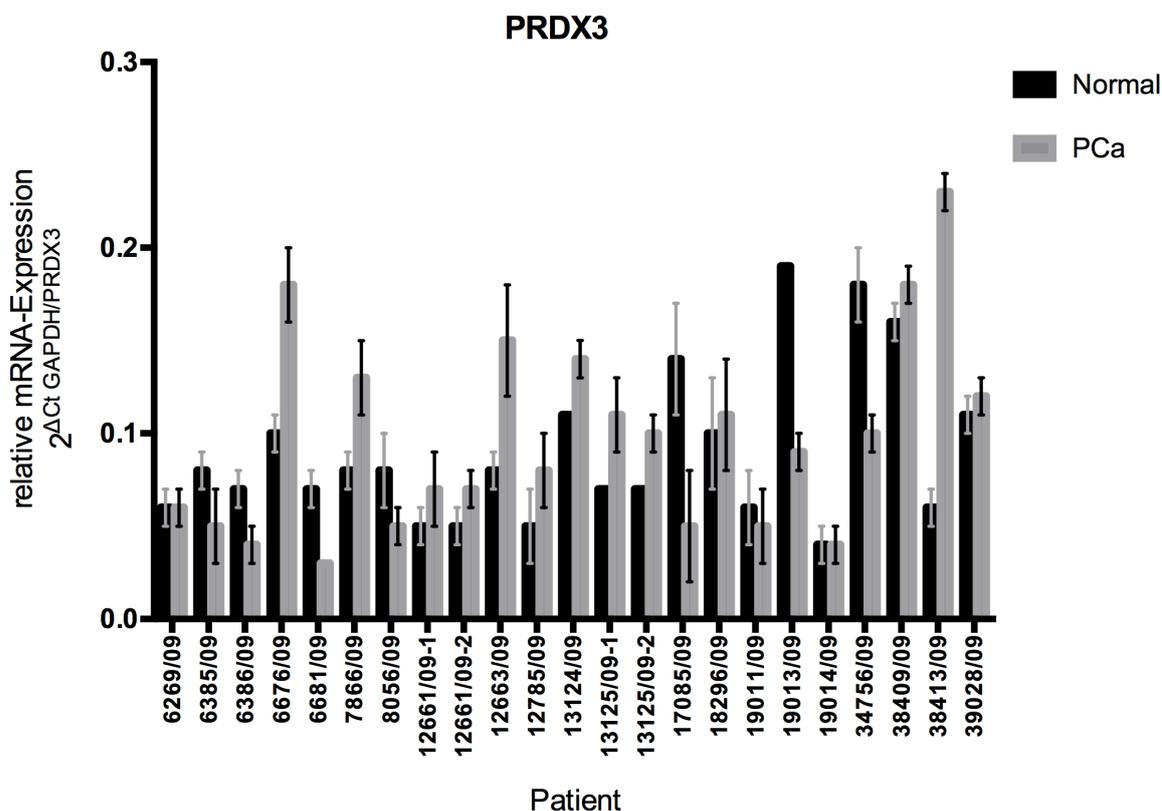
**Abbildung 8: Expression von PPA2 auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta C_t \text{ GAPDH/PPA2}}$  von PPA2 normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=23$ ). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,0356$  und somit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 8 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen PPA2 normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten ( $n=23$ ). Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für PPA2 lag bei 18 Patienten im PCa-Gewebe über dem Mittelwert des Normalgewebes. Bei fünf Patienten war der Mittelwert im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte sich, dass die relative Expression von PPA2 normalisiert auf GAPDH

in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben derselben Patienten signifikant erhöht war ( $p=0,0356$ ).

**PRDX3 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe nicht verstärkt exprimiert**



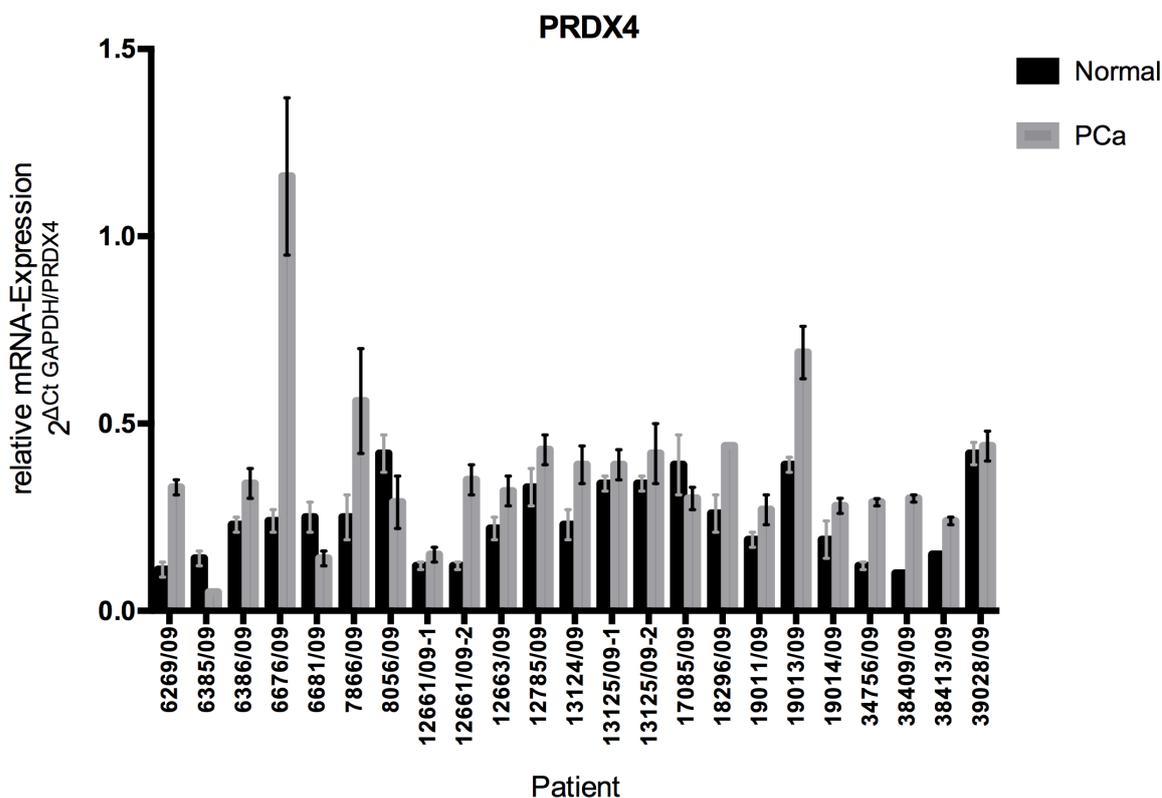
**Abbildung 9: Expression von PRDX3 auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta Ct_{GAPDH/PRDX3}}$  von PRDX3 normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=23$ ). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,5527$  und somit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 9 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen PRDX3 normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten ( $n=23$ ). Es ist ersichtlich, dass der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate bei 13 Patienten im PCa-Gewebe höher war als im Normalgewebe. Bei acht Patienten war er im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Bei zwei Patienten zeigte sich kein Unterschied. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte sich, dass die

relative Expression von PRDX3 normalisiert auf GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben derselben Patienten nicht signifikant erhöht war ( $p=0,5527$ ).

**PRDX4 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe signifikant stärker exprimiert**

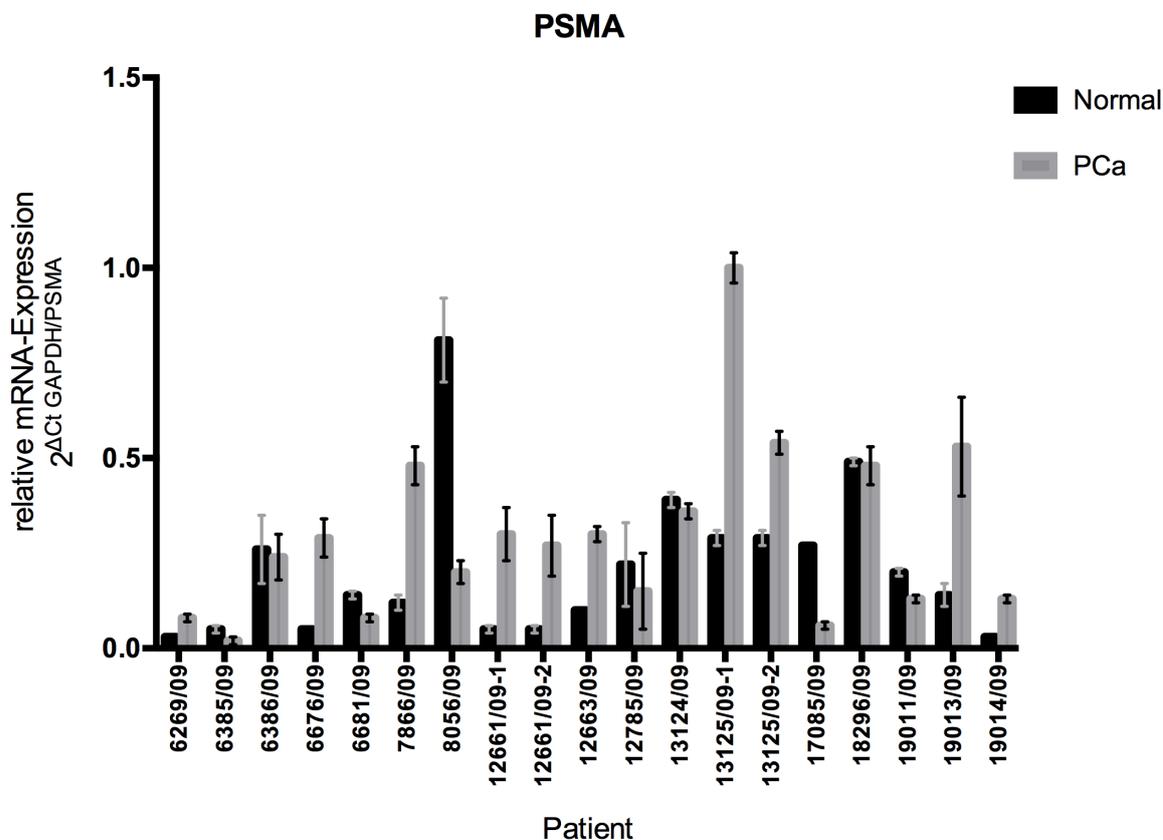


**Abbildung 10: Expression von PRDX4 auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta C_t \text{ GAPDH/PRDX4}}$  von PRDX4 normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=23$ ). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,0067$  und somit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 10 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen PRDX4 normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten ( $n=23$ ). Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für PRDX4 war bei 19 Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei vier Patienten war der Mittelwert im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte sich, dass die relative Expression von PRDX4 normalisiert auf GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben derselben Patienten signifikant erhöht war ( $p=0,0067$ ).

**PSMA ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe nicht verstärkt exprimiert**

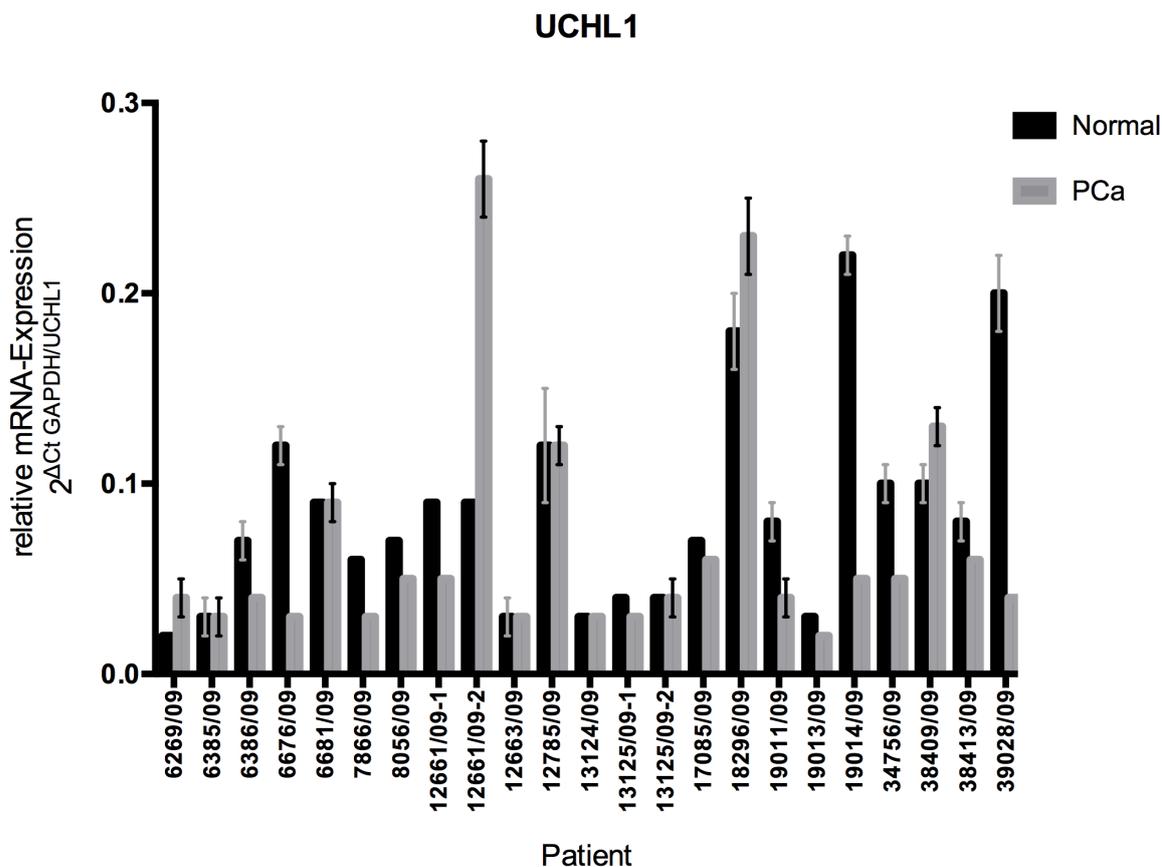


**Abbildung 11: Expression von PSMA auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta Ct \text{ GAPDH/PSMA}}$  von PSMA normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor (n=19). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,1823$  und somit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 11 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen PSMA normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten (n=19). Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für PSMA lag bei zehn Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei neun Patienten lag der Mittelwert im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte sich, dass die relative Expression von PSMA normalisiert auf GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben derselben Patienten nicht signifikant erhöht war ( $p=0,1823$ ).

## UCHL1 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe nicht vermindert exprimiert



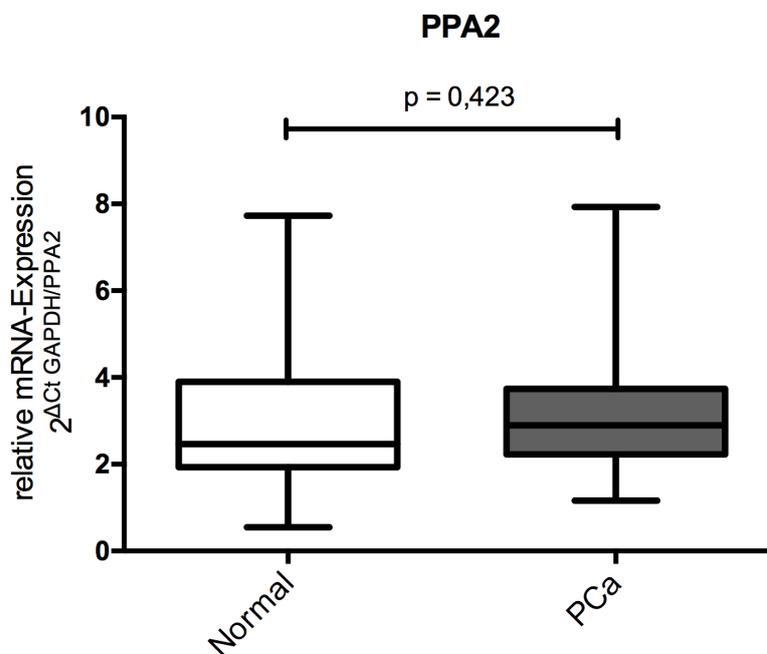
**Abbildung 12: Expression von UCHL1 auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{-\Delta C_t \text{ GAPDH/UCHL1}}$  von UCHL1 normalisiert auf GAPDH jeweils in einer Normal-Gewebeprobe und einer PCa-Gewebeprobe desselben Patienten, gemessen mittels RT-qPCR. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor (n=23). Die Standardabweichung der Triplikat-Bestimmungen ist durch die Fehlerbalken dargestellt. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,2104$  und somit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 12 zeigt den direkten Vergleich der relativen mRNA-Expression für das Zielgen UCHL1 normalisiert auf GAPDH durch die Darstellung dieser in der Normalgewebe-cDNA (schwarz) und der PCa-cDNA (grau) für den jeweiligen Patienten (n=23). Der Mittelwert der relativen Expression der Triplikate für UCHL1 lag bei vier Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei 13 Patienten lag der Mittelwert im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Bei sechs Patienten zeigte sich kein Unterschied. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte sich, dass die Herabregulation der relativen Expression von UCHL1 normalisiert auf GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeprobe derselben Patienten nicht signifikant war ( $p=0,2104$ ).

### 3.1.2 Interindividuelle Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene von cDNA aus benignen Prostata- und PCa-Gewebeproben

PPA2 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum benignen Gewebe in der interindividuellen Analyse nicht verstärkt exprimiert

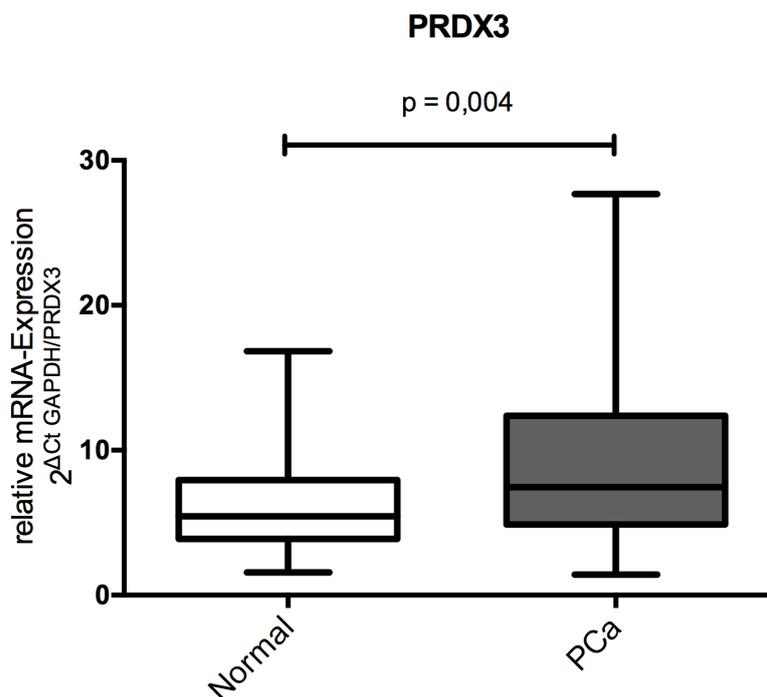


**Abbildung 13: Expression von PPA2 auf mRNA Ebene in der interindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PPA2}}$  von PPA2 normalisiert auf GAPDH in einer Gruppe von Normal-cDNA-Proben und einer Gruppe PCa-cDNA-Proben, gemessen mittels RT-qPCR. n=48 in Normal-Gruppe, n=45 in PCa-Gruppe. Der einfache t-Test ergab einen Wert von  $p=0,423$  und somit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

In Abbildung 13 ist die relative Expression auf mRNA-Ebene für PPA2 normalisiert auf GAPDH im Vergleich zwischen einer Gruppe von cDNA aus benignem Prostatagewebe von an PCa erkrankten Patienten und einer Gruppe von cDNA aus PCa-Gewebe dargestellt. In der Gruppe der Normal-cDNA-Proben wurden bei n=48 Proben Werte für  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PPA2}}$  von 0,55 bis 7,73 ermittelt. Der Mittelwert war in dieser Gruppe  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PPA2}} = 3,001$  bei einer Standardabweichung von  $\pm 0,2146$ . In der Gruppe der PCa-cDNA-Proben wurden bei n=45 Proben Werte für  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PPA2}}$  von 1,16 bis 7,93 ermittelt. Der Mittelwert in dieser Gruppe war  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PPA2}} = 3,250$  bei einer Standardabweichung  $\pm 0,2226$ . Der Mittelwert der relativen Genexpression von PPA2 normalisiert auf GAPDH in der PCa-Gruppe war damit um das 1,1-fache höher als in der Normal-Gruppe. Im einfachen t-Test zeigte sich, dass dieser Unterschied der relativen Expression zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant war ( $p=0,423$ ).

**PRDX3 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum benignen Gewebe in der interindividuellen Analyse signifikant stärker exprimiert**

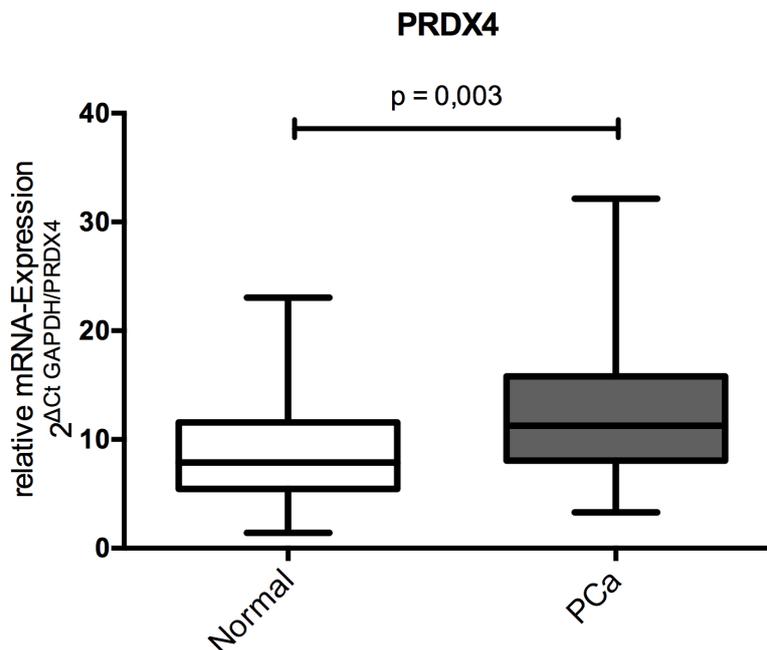


**Abbildung 14: Expression von PRDX3 auf mRNA Ebene in der interindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX3}}$  von PRDX3 normalisiert auf GAPDH in einer Gruppe von Normal-cDNA-Proben und einer Gruppe PCa-cDNA-Proben, gemessen mittels RT-qPCR. n=48 in Normal-Gruppe, n=45 in PCa-Gruppe. Der einfache t-Test ergab einen Wert von  $p=0,004$  und somit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

In Abbildung 14 ist die relative Expression auf mRNA-Ebene für PRDX3 normalisiert auf GAPDH im Vergleich zwischen einer Gruppe von cDNA aus benignem Prostatagewebe von an PCa erkrankten Patienten und einer Gruppe von cDNA aus PCa-Gewebe gezeigt. In der Gruppe der Normal-cDNA-Proben wurden bei n=48 Proben Werte für  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX3}}$  von 1,57 bis 16,83 ermittelt. Der Mittelwert lag in dieser Gruppe bei  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX3}} = 6,249$  bei einer Standardabweichung von  $\pm 0,4954$ . In der Gruppe der PCa-cDNA-Proben wurden bei n=45 Proben Werte für  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX3}}$  von 1,42 bis 27,67 ermittelt. Der Mittelwert in dieser Gruppe lag bei  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX3}} = 9,075$  bei einer Standardabweichung  $\pm 0,8439$ . Der Mittelwert der relativen Genexpression von PRDX3 normalisiert auf GAPDH lag somit in der PCa-Gruppe um das 1,5-fache höher als in der Normal-Gruppe. Der einfache t-Test zeigte, dass dieser Unterschied in der relativen Genexpression zwischen den beiden Gruppen signifikant war ( $p=0,004$ ).

**PRDX4 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum benignen Gewebe in der interindividuellen Analyse signifikant stärker exprimiert**

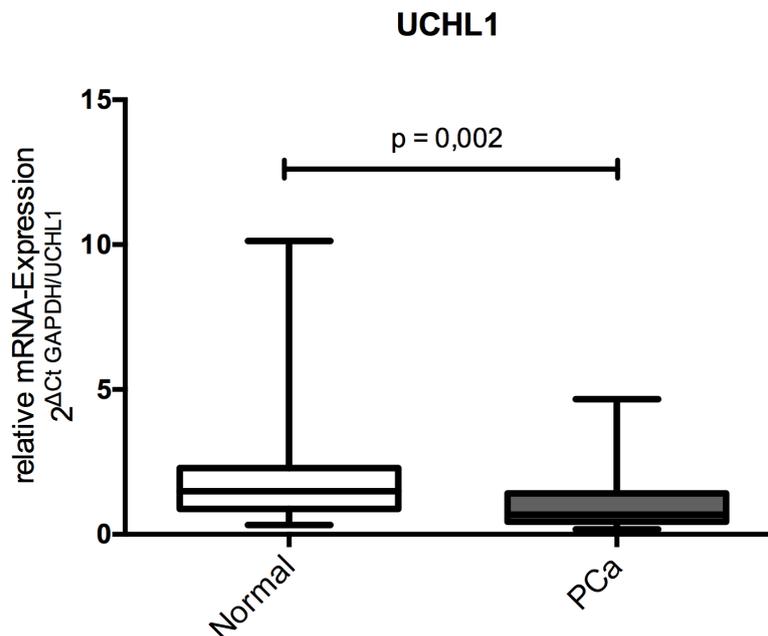


**Abbildung 15: Expression von PRDX4 auf mRNA Ebene in der interindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX4}}$  von PRDX4 normalisiert auf GAPDH in einer Gruppe von Normal-cDNA-Proben und einer Gruppe PCa-cDNA-Proben, gemessen mittels RT-qPCR. n=48 in Normal-Gruppe, n=45 in PCa-Gruppe. Der einfache t-Test ergab einen Wert von p=0,003 und somit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

Die Abbildung 15 zeigt den Vergleich der relativen Expression auf mRNA-Ebene für PRDX4 normalisiert auf GAPDH zwischen einer Gruppe von cDNA aus benignem Prostatagewebe von an PCa erkrankten Patienten und einer Gruppe von cDNA aus PCa-Gewebe. In der Gruppe der Normal-cDNA-Proben wurden bei n=48 Proben Werte für  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX4}}$  von 1,41 bis 23,05 ermittelt. Der Mittelwert lag in dieser Gruppe bei  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX4}} = 9,077$  und einer Standardabweichung von  $\pm 0,7258$ . In der Gruppe der PCa-cDNA-Proben wurden bei n=45 Proben Werte für  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX4}}$  von 3,29 bis 32,15 ermittelt. Der Mittelwert in dieser Gruppe lag bei  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/PRDX4}} = 12,91$  und einer Standardabweichung  $\pm 1,053$ . Somit war der Mittelwert der relativen Genexpression von PRDX4 normalisiert auf GAPDH in der PCa-Gruppe um das 1,4-fache erhöht gegenüber der Normal-Gruppe. Der einfache t-Test zeigte, dass dieser Unterschied in der relativen Expression zwischen den beiden Gruppen signifikant war (p=0,003).

**UCHL1 ist auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum benignen Gewebe in der interindividuellen Analyse signifikant vermindert exprimiert**



**Abbildung 16: Expression von UCHL1 auf mRNA Ebene in der interindividuellen Analyse.**

Dargestellt ist die relative Expression  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/UCHL1}}$  von UCHL1 normalisiert auf GAPDH in einer Gruppe von Normal-cDNA-Proben und einer Gruppe PCa-cDNA-Proben, gemessen mittels RT-qPCR. n=48 in Normal-Gruppe, n=45 in PCa-Gruppe. Der einfache t-Test ergab einen Wert von  $p=0,002$  und somit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

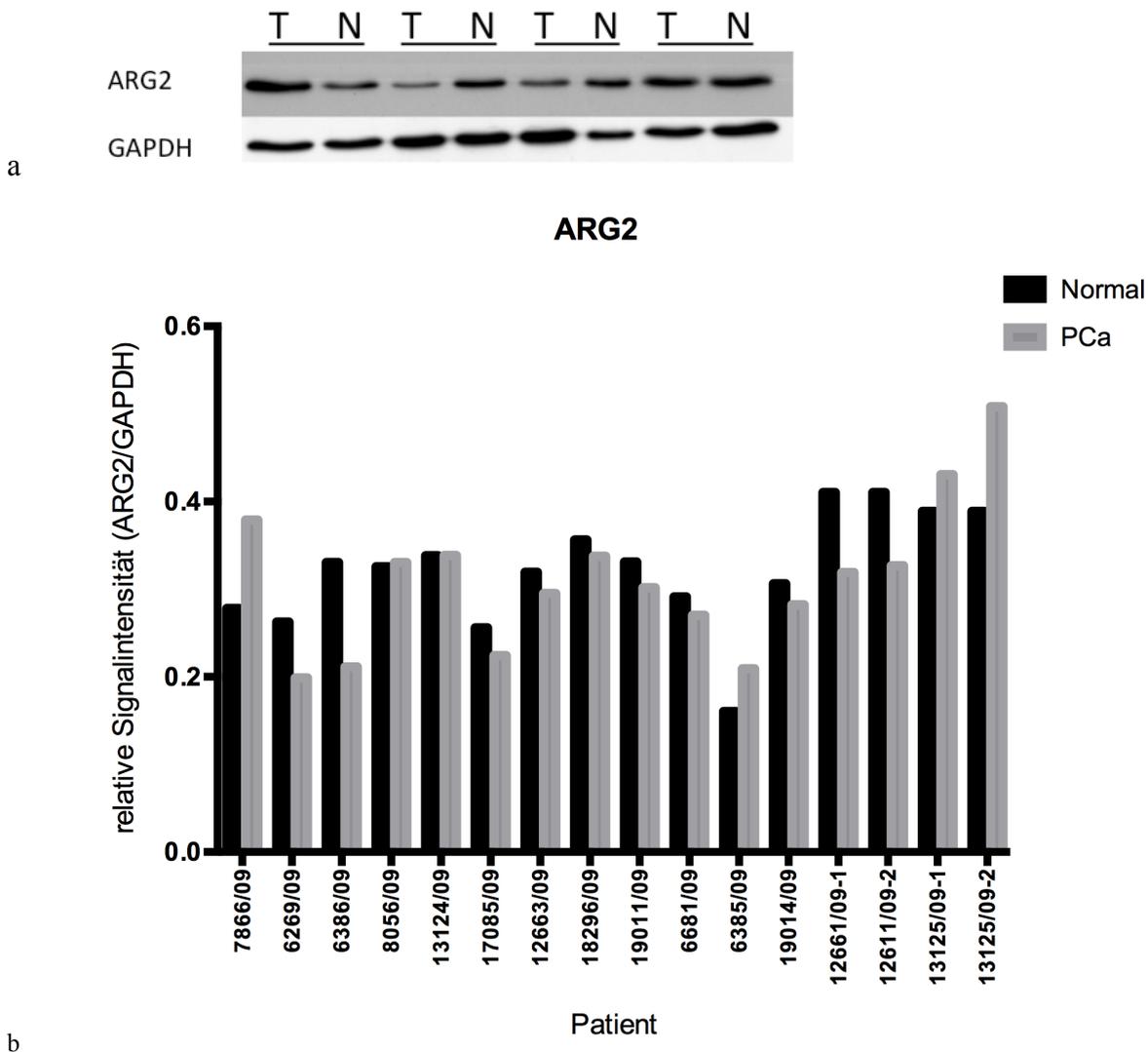
Die Abbildung 16 zeigt den Vergleich der relativen Expression auf mRNA-Ebene für UCHL1 normalisiert auf GAPDH zwischen einer Gruppe von cDNA aus benignem Prostatagewebe von an PCa erkrankten Patienten und einer Gruppe von cDNA aus PCa-Gewebe. In der Gruppe der Normal-cDNA-Proben wurden bei n=48 Proben Werte für  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/UCHL1}}$  von 0,32 bis 10,13 ermittelt. Der Mittelwert lag in dieser Gruppe bei  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/UCHL1}} = 1,788$  bei einer Standardabweichung von  $\pm 0,2272$ . In der Gruppe der PCa-cDNA-Proben wurden bei n=45 Proben Werte für  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/UCHL1}}$  von 0,17 bis 4,67 ermittelt. Der Mittelwert in dieser Gruppe lag bei  $2^{\Delta Ct \text{ GAPDH/UCHL1}} = 0,9589$  bei einer Standardabweichung  $\pm 0,1224$ . Damit lag der Mittelwert der relativen Genexpression von UCHL1 normalisiert auf GAPDH in der Normal-Gruppe im Vergleich zur PCa-Gruppe um das 1,9-fache höher. Im einfachen t-Test zeigte sich, dass der Unterschied der relativen Genexpression der beiden Gruppen signifikant war ( $p=0,002$ ). Dies spricht für eine Herabregulation des Gens im PCa-Gewebe.

### 3.2 Proteinexpressionsanalyse

Für die Untersuchung der Proteinexpression wurde eine intraindividuelle Analyse von Proteinlysaten aus PCa- und Normalgewebeproben durchgeführt.

Es wurde die Expression der Ziel-Proteine und GAPDH mittels Western-Blot dargestellt und mit Hilfe der Software Quantity One 4.5.2 der Firma Bio-Rad quantifiziert. Die Expression des jeweiligen Zielproteins wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert, indem der Quotient aus der Signalintensität des Zielproteins und GAPDH gebildet wurde. Dies wurde als *relative Signalintensität Zielprotein/GAPDH* bezeichnet.

### ARG2 ist auf Proteinebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe nicht verstärkt exprimiert



b

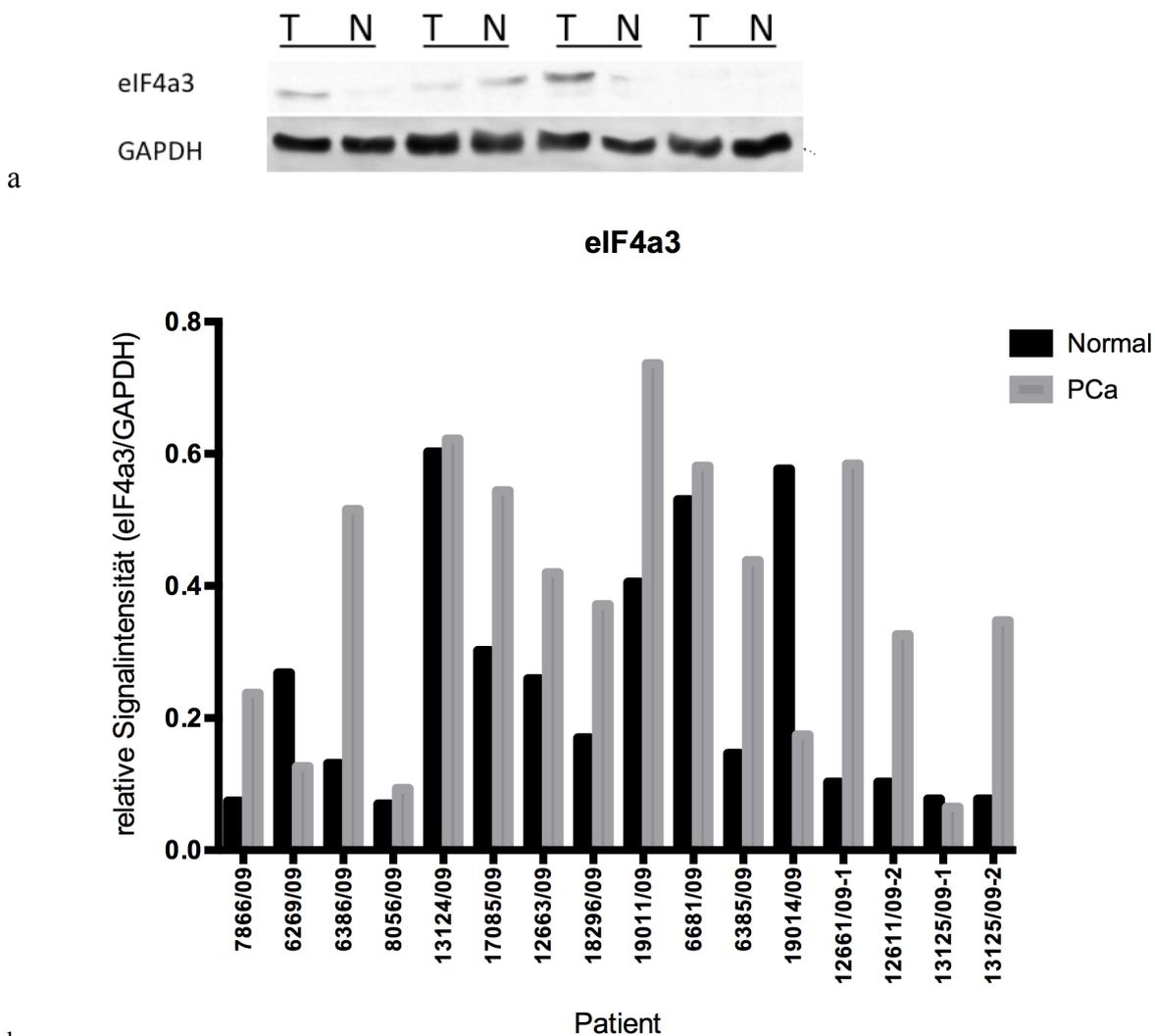
#### Abbildung 17: Expression von ARG2 auf Proteinebene in einer intraindividuellen Analyse.

a) Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot mit jeweils PCa- (hier T) und Normalgewebe-Probe (hier N) von vier Patienten. b) Dargestellt ist die relative Signalintensität im Western-Blot von ARG2. Es wurde eine intraindividuelle Analyse von PCa- und Normalgewebe-Proteinlysate durchgeführt. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor (n=16). Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,4766$  und damit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

In Abbildung 17 ist der direkte Vergleich der relativen Proteinexpression von ARG2/GAPDH dargestellt durch die Gegenüberstellung dieser im Normalgewebe-Proteinlysate (schwarz) und PCa-Proteinlysate (grau) für den jeweiligen Patienten (n=16). Sie war bei sechs Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe und bei zehn Patienten im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Der t-Tests für abhängige Stichproben zeigte, dass der Unterschied der relativen Expression von ARG2/GAPDH in

den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeprobe derselben Patienten nicht signifikant war ( $p=0,4766$ ).

**eIF4a3 ist auf Proteinebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe signifikant stärker exprimiert**



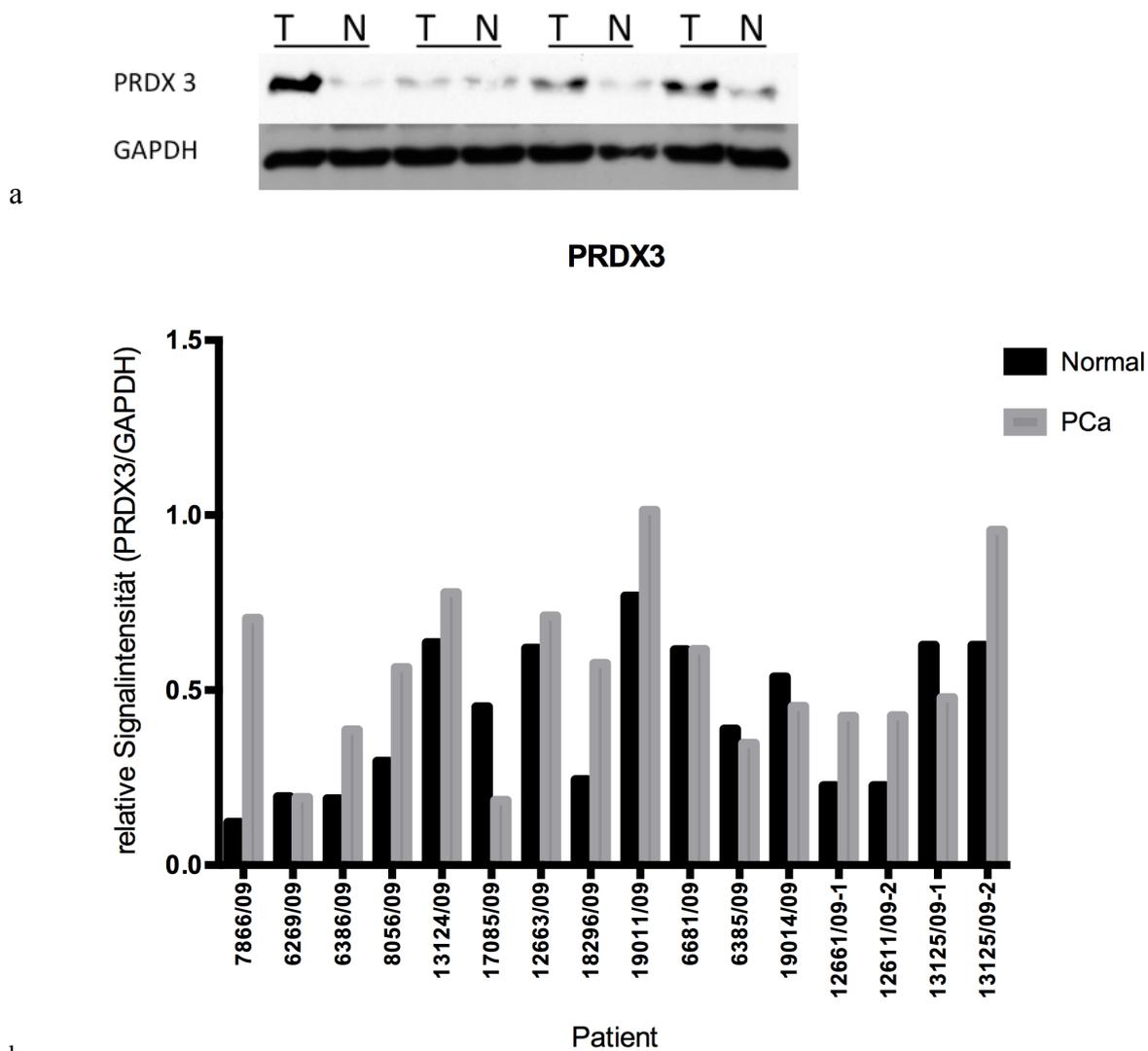
**Abbildung 18: Expression von eIF4a3 auf Proteinebene in einer intraindividuellen Analyse.**

a) Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot mit jeweils PCa- (hier T) und Normalgewebe-Probe (hier N) von vier Patienten. b) Dargestellt ist die relative Signalintensität im Western-Blot von eIF4a3. Es wurde eine intraindividuelle Analyse von PCa- und Normalgewebe-Proteinlysate durchgeführt. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=16$ ). Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,0189$  und damit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 18 zeigt den direkten Vergleich der relativen Proteinexpression von eIF4a3/GAPDH durch die Darstellung dieser im Normalgewebe-Proteinlysate (schwarz) und PCa-Proteinlysate (grau) für den jeweiligen Patienten ( $n=16$ ). Diese relative Expression war bei 13 Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei drei Patienten war

sie im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Die Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte, dass die relative Expression von eIF4a3/GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeprobe derselben Patienten signifikant erhöht war ( $p=0,0189$ ).

### PRDX3 ist auf Proteinebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe signifikant stärker exprimiert

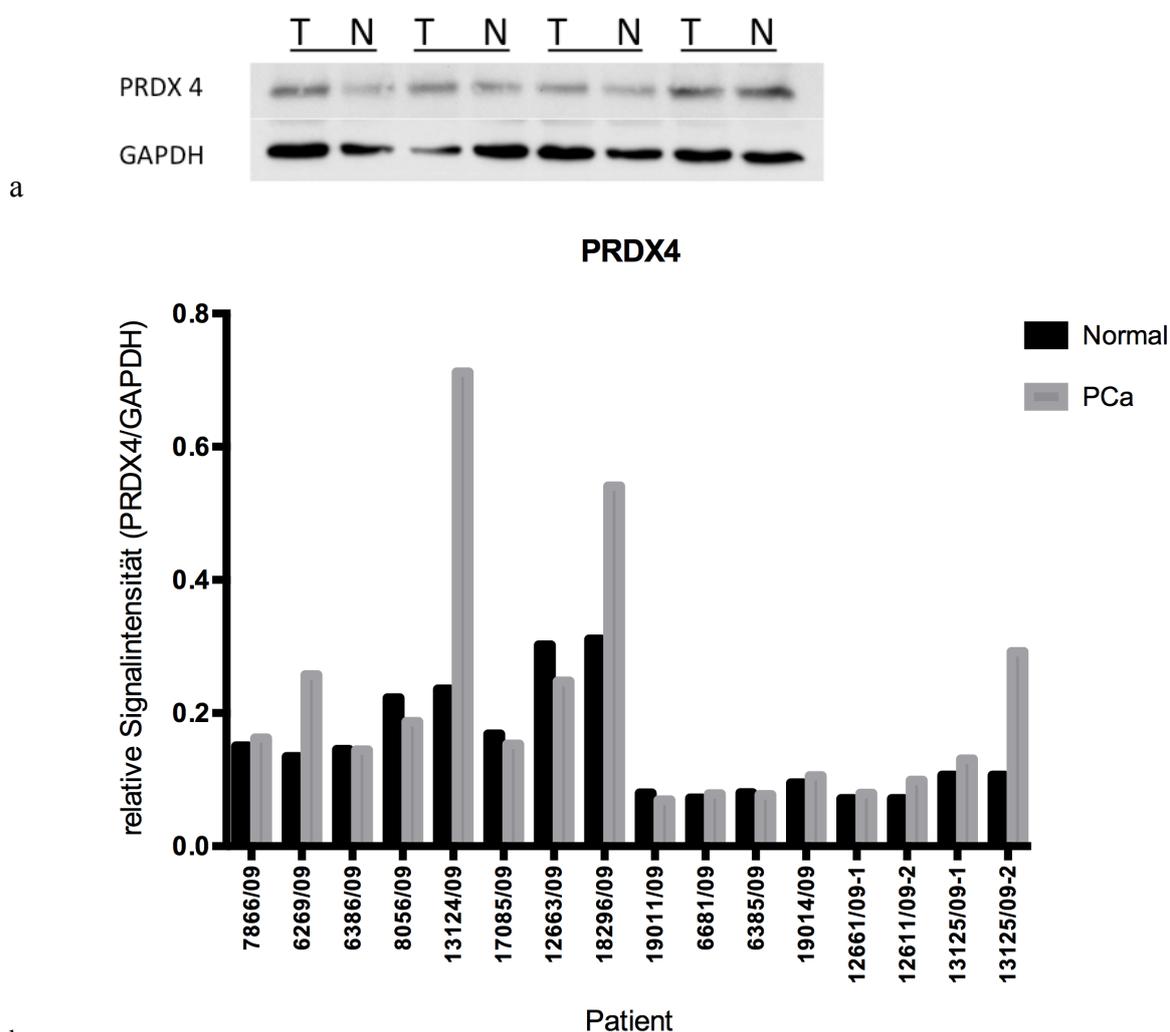


**Abbildung 19: Expression von PRDX3 auf Proteinebene in einer intraindividuellen Analyse.**

a) Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot mit jeweils PCa- (hier T) und Normalgewebe-Probe (hier N) von vier Patienten. b) Dargestellt ist die relative Signalintensität im Western-Blot von PRDX3. Es wurde eine intraindividuelle Analyse von PCa- und Normalgewebe-Proteinlysate durchgeführt. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor ( $n=16$ ). Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,0298$  und damit einen signifikanten Unterschied in der Expression.

In Abbildung 19 ist der direkte Vergleich der relativen Proteinexpression von PRDX3/GAPDH gezeigt durch die Gegenüberstellung dieser im Normalgewebe-Proteinlysate (schwarz) und PCa-Proteinlysate (grau) für den jeweiligen Patienten (n=16). Sie war bei elf Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe und bei fünf Patienten im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Der t-Test für abhängige Stichproben ergab, dass diese relative Expression in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben derselben Patienten signifikant erhöht war ( $p=0,0298$ ).

### PRDX4 ist auf Proteinebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe nicht verstärkt exprimiert



**Abbildung 20: Expression von PRDX4 auf Proteinebene in einer intraindividuellen Analyse.**

a) Gezeigt ist ein repräsentativer Western-Blot mit jeweils PCa- (hier T) und Normalgewebe-Probe (hier N) von vier Patienten. b) Dargestellt ist die relative Signalintensität im Western-Blot von PRDX4. Es wurde eine intraindividuelle Analyse von PCa- und Normalgewebe-Proteinlysate durchgeführt. Von zwei Patienten (12661/09 und 13125/09) lagen jeweils zwei PCa-Proben vor (n=16). Der t-Test für abhängige Stichproben ergab  $p=0,0891$  und damit keinen signifikanten Unterschied in der Expression.

Abbildung 20 zeigt den direkten Vergleich der relativen Proteinexpression von PRDX4/GAPDH durch die Darstellung dieser im Normalgewebe-Proteinlysate (schwarz) und PCa-Proteinlysate (grau) für den jeweiligen Patienten (n=16). Diese relative Expression war bei zehn Patienten im PCa-Gewebe höher als im Normalgewebe. Bei sechs Patienten war sie im Normalgewebe höher als im PCa-Gewebe. Durch Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben zeigte sich, dass die relative Expression von PRDX4/GAPDH in den PCa-Proben im Vergleich zu den Normalgewebeproben derselben Patienten nicht signifikant erhöht war ( $p=0,0891$ ).

## 4 Diskussion

Das PCa ist das häufigste Karzinom und die dritthäufigste Krebstodesursache des Mannes in Deutschland. Mehr als 12.000 Todesfälle wurden hier alleine im Jahr 2008 dem PCa zugeordnet (Anon, 2012). Ein wichtiger Bestandteil der PCa-Früherkennungsuntersuchung ist die Bestimmung des PSA-Werts im Serum. Nichtsdestotrotz gerät der PSA-Wert immer wieder in die Kritik: Zwar wurde in einer aktuellen Studie eine signifikante Reduktion der Mortalität beschrieben (Schröder et al., 2012), aber einerseits erfolgt durch das PSA-Screening eine Überdiagnose und Übertherapie von klinisch nicht-relevanten Karzinomen und andererseits werden noch immer klinisch relevante und aggressive Karzinome übersehen. Es wurden daher in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Biomarker entwickelt (Artibani, 2012). Bislang hat allerdings kaum einer dieser potentiellen Marker Einzug in die klinische Praxis gefunden. Der Bedarf an neuen und effizienteren Biomarkern ist noch immer vorhanden. In der Erforschung des PCa wird ein großes Potential darin gesehen, dessen Heterogenität und Komplexität zu verstehen und so neue Biomarker für die Früherkennung zu entwickeln und die Therapien zu optimieren (Beltran & Rubin, 2013). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dr. S. Balabanov (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden durch eine globale, vergleichende Proteomanalyse eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die eine unterschiedliche Expression zwischen PCa- und umliegendem benignen Prostatagewebe zeigten. Die hier durchgeführte gezielte Analyse der Genexpression von zehn Genen (ARG2, eIF4a3, FKBP4, Myc, PAWR, PPA2, PRDX3, PRDX4, PSMA und UCHL1) und Proteinexpression von vier Proteinen (ARG2, eIF4a3, PRDX3 und PRDX4) leistet somit einen wichtigen Beitrag zur Erforschung des PCa und zur Identifikation geeigneter Biomarker.

Hervorzuheben ist, dass in dieser Arbeit intraindividuelle Analysen der Gen- und Proteinexpression anhand von Gewebeproben von histologisch gesichertem PCa- und benignem Prostatagewebe des gleichen Patienten durchgeführt wurden, was einen entscheidenden Vorteil gegenüber früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen darstellt. Es wurde darin eine Möglichkeit gesehen, karzinom-assoziierte Gene und Proteine direkt zu identifizieren. Außerdem wurde anschließend zur Validierung der Ergebnisse eine interindividuelle Analyse für vier Gene mit einem größeren Pool von cDNA-Proben des DKFZ durchgeführt.

### **Peroxiredoxine PRDX3 und PRDX4**

Die Gen- und Proteinexpressionsanalysen der Peroxiredoxine PRDX3 und PRDX4 waren besonders vielversprechend. Sie scheinen hoffnungsvolle potentielle Biomarker für das PCa zu sein.

Es zeigte sich zwar, dass **PRDX3** auf mRNA-Ebene in der intraindividuellen Analyse nicht verstärkt im PCa-Gewebe exprimiert war, in der interindividuellen Analyse wurde jedoch eine signifikant gesteigerte Expression im PCa-Gewebe deutlich. Die Expression von PRDX3 in der PCa-Gewebe-Gruppe lag hier um das 1,5-fache höher als in der Normalgewebe-Gruppe. Auch in der intraindividuellen Proteinexpressionsanalyse war PRDX3 im PCa-Gewebe signifikant höher exprimiert. **PRDX4** ist auf mRNA-Ebene im Vergleich zum umliegenden benignen Gewebe signifikant stärker exprimiert. Auch in der interindividuellen Analyse auf mRNA-Ebene zeigte sich, dass PRDX4 in der PCa-Gruppe im Vergleich zur Normal-Gruppe um das 1,4-fache höher exprimiert war, was einen signifikanten Unterschied darstellt. In der intraindividuellen Proteinexpressionsanalyse war PRDX4, vermutlich aufgrund des kleinen Probenpools, knapp nicht signifikant verändert exprimiert. Auch Basu et al. zeigten gesteigerte Expressionen von PRDX3 und PRDX4 im PCa sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene, wobei sie einen Zusammenhang zu klinischen Eigenschaften der Tumore wie Tumorstadium, Gleason-Grading und Serum-PSA-Wert sahen (Basu et al., 2010). Auch Lin et al. sahen aufgrund ihrer vergleichenden Proteomanalyse von Prostatabiopsien in PRDX3 und PRDX4 mögliche Biomarker für das PCa (Lin et al., 2007). Bei Untersuchungen auf mRNA-Ebene zeigten Cha et al. neben dem PCa ebenfalls erhöhte Peroxiredoxin-Expressionen bei sieben weiteren malignen Tumorentitäten. Sie sahen auch die Möglichkeit durch die posttranslationale Modifikation die Unterschiede zwischen Expressionen auf mRNA- und Proteinebene der Peroxiredoxine zu erklären (Cha et al., 2009). Weitere Publikationen berichteten von Expressionsunterschieden beispielsweise im Bronchialkarzinom (Park et al., 2006; Lehtonen et al., 2004), im Osteosarkom (Liu et al., 2009) und im Zervixkarzinom (Kim et al., 2009). Den Peroxiredoxinen PRDX3 und PRDX4 könnte eine wichtige Bedeutung als Biomarker für das PCa zukommen.

### **UCHL1**

Auch **UCHL1** zeigte in dieser Analyse ein mögliches Potential als Biomarker für das PCa: In der interindividuellen Genexpressionsanalyse war UCHL1 im Normalgewebe 1,9-fach höher exprimiert als im PCa-Gewebe, was einen signifikanten Unterschied darstellte. Auch

wenn sich in der intraindividuellen Genexpressionsanalyse kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen PCa-Gewebe und umliegendem benignen Gewebe zeigte, scheint die Genexpression von UCHL1 im PCa herabreguliert zu sein. Die Deregulierung der UCHL1-Expression wurde bereits in mehreren Karzinomen nachgewiesen, wobei sie in einigen Tumorarten erhöht und in anderen erniedrigt zu sein scheint (Hurst-Kennedy et al., 2012). Eine erhöhte Expression im Tumorgewebe zeigte sich zum Beispiel im Plattenepithelkarzinom der Haut (Mastoraki et al., 2009), im Adenokarzinom der Lunge (Chen et al., 2002) und im Osteosarkom (Liu et al., 2009). Eine niedrigere Expression im Tumorgewebe, wie sie sich in dieser Untersuchung für das PCa darstellte, zeigte sich im Kolonkarzinom (Fukutomi et al., 2007), im malignen Melanom (Bonazzi et al., 2011) und im Magenkarzinom vom diffusen Typ (Yamashita et al., 2006) durch Methylierung. Tokumaru et al. zeigten die Funktion von UCHL1 als Tumorsuppressor-Gen, das unter anderem durch Promoter-Methylierung inaktiviert werden kann und so eine Bedeutung für die Entstehung von Karzinomen beim Menschen haben könnte (Tokumaru et al., 2008). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits publizieren, dass UCHL1 im PCa durch Promotor-Hypermethylierung herabreguliert ist und der Nachweis dieser Hypermethylierung als potentieller molekularer Marker beim PCa dienen könnte (Ummanni et al., 2011a). Die genaue Funktion von UCHL1 in der Tumorentstehung konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Hurst-Kennedy et al. beschrieben in ihrem Review allerdings eine potentielle Rolle bei der Regulation von Zellzyklus, Zelltod und Metastasierung (Hurst-Kennedy et al., 2012).

### **Weitere differentiell regulierte Gene**

Auch Myc, FKBP4 und PPA2, deren Expressionen ausschließlich auf Genebene untersucht wurden, zeigten in dieser Untersuchung eine potentielle Bedeutung als neue Biomarker im PCa.

Da **Myc** als Transkriptionsfaktor für Gene fungiert, die unter anderem einen Effekt auf den Zellzyklus und die Apoptose haben, konnten Mutationen, Translokationen und Überexpressionen in zahlreichen Leukämien, Lymphomen und soliden Karzinomen gezeigt werden (Hoffman et al., 2002; Boxer & Dang, 2001; Hoffman & Liebermann, 1998). Es wurde bereits eine erhöhte Expression von Myc auf mRNA-Ebene im PCa beobachtet (Koh et al., 2010). In der hier vorliegenden Arbeit diente es daher einerseits zur Kontrolle der Ergebnisse und andererseits zur Einschätzung von Effekten auf andere Gene im Rahmen von Netzwerken im PCa. Unsere Arbeitsgruppe konnte die Ergebnisse der

Gruppe Koh et al. reproduzieren und charakterisierte Myc darüber hinaus als eines der Schlüsselproteine im Proteinnetzwerk des PCa (Ummanni et al., 2011b). Myc war in der vorliegenden Untersuchung im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden benignen Gewebe signifikant stärker exprimiert.

Die Genexpression von **FKBP4** war im PCa-Gewebe signifikant höher als im umliegenden benignen Gewebe. Lin et al. berichteten bereits von einer gesteigerten Proteinexpression von FKBP4 im PCa (Lin et al., 2007). Cheung-Flynn et al. zeigten, dass FKBP4 eine wichtige Funktion im Androgen-Rezeptor-Signalweg hat und schlugen vor, den Effekt von FKBP4 auf Struktur- und Funktionsänderungen des Androgen-Rezeptors auch im Hinblick auf das PCa zu untersuchen (Cheung-Flynn et al., 2005). 2011 konnten De Leon et al. die Entwicklung eines FKBP4-spezifischen Inhibitors mit einem Einfluss auf die Androgen-Rezeptor-abhängige Genexpression im hormonabhängigen PCa publizieren (De Leon et al., 2011). Zusammenfassend scheint FKBP4 also eine Rolle im Zusammenhang mit dem PCa zuzukommen und diese vorliegende Analyse hat gezeigt, dass die Genexpression von FKBP4 auf mRNA-Ebene im PCa gesteigert ist.

Die Genexpression von **PPA2** zeigte in der intraindividuellen Analyse eine signifikant verstärkte Expression im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden benignen Gewebe. Gleichzeitig war die Genexpression von PPA2 im PCa-Gewebe in der interindividuellen Analyse nur um das 1,1-fache gegenüber dem Normalgewebe, und damit nicht signifikant, erhöht. Bei einer Genexpressionsuntersuchung beobachteten Pang et al. eine ansteigende PPA2-Expression vom BPH-Gewebe über das lokalisierte PCa hin zum lymphknotenmetastasierten PCa. Sie zeigten außerdem in einer Proteomuntersuchung eine deutlich höhere Proteinexpression von PPA2 im lymphknotenmetastasierten PCa im Vergleich zum lokalisierten PCa (Pang et al., 2010). Eine erhöhte Expression der anorganischen Pyrophosphatasen auf Proteinebene konnte außerdem bereits im Adenokarzinom der Lunge und im kolorektalen Karzinom gezeigt werden (Chen et al., 2002; Tomonaga, 2004).

**eIF4a3**, über dessen mögliche Bedeutung im PCa vor dieser Analyse noch keine Daten vorlagen, scheint zumindest auf Proteinebene ein potentieller Biomarker für das PCa zu sein. Auf mRNA-Ebene zeigte sich in der intraindividuellen Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen der eIF4a3-Expression im PCa-Gewebe und dem umliegenden benignen Gewebe. In der intraindividuellen Proteinexpressionsanalyse zeigte sich jedoch, dass eIF4a3 signifikant stärker im PCa-Gewebe exprimiert wird. Hellmann et al. zeigten bereits in ihrer Proteinanalyse von Karzinomgewebe der Vagina eine Hochregulation von

eIF4a3 im Tumorgewebe verglichen mit gesundem Vaginalgewebe (Hellman et al., 2009). Im Magenkarzinom vom intestinalen Typ wurde durch eine cDNA-Microarray-Untersuchung eine erhöhte Expression von eIF4a3 im Vergleich zum diffusen Typ ermittelt (Lee et al., 2002). Im Pankreaskarzinom wurde keine erhöhte Expression von eIF4a3 auf mRNA-Ebene beobachtet, jedoch im Antikörpernachweis eine mögliche Funktion als Serummarker vermutet (Xia et al., 2005). Eine Ausweitung der Expressionsuntersuchung auf Proteinebene mittels eines größeren Probenpools wäre für eIF4a3 sicherlich sinnvoll und vielversprechend.

Das mögliche Potential von **PAWR** als Biomarker für das PCa sollte ebenfalls weiter untersucht werden. Bei der intraindividuellen Genexpressionsanalyse von PAWR war zwar kein signifikanter Unterschied zwischen PCa-Gewebe und umliegenden benignen Gewebe zu erkennen, jedoch war eine Herabregulierung im PCa-Gewebe zu vermuten. Eine verminderte Expression von PAWR im Tumorgewebe wurde bereits für das Nierenzellkarzinom (Cook et al., 1999) und für das Endometriumkarzinom (Moreno-Bueno et al., 2007) publiziert. Im PCa wurde eine erhöhte Expression in Zellen beobachtet, bei denen die Apoptose induziert wurde (Sells et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass PAWR die Apoptose in einigen PCa-Zelllinien einleiten und so einen Einfluss auf die Tumorregression haben kann (Chakraborty et al., 2001). PAWR kann durch eine Interaktion mit Akt1 (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) sein Potential für die Induktion der Apoptose verlieren (Goswami et al., 2005). Daten zur Expression von PAWR in PCa-Gewebeproben wurden bislang noch nicht publiziert, daher stellen die hier erhobenen Ergebnisse einer im Trend unterschiedlichen Expression zwischen Normal- und PCa-Gewebe möglicherweise eine interessante Grundlage für weiterführende Analysen dar.

Die Bedeutung der Expression von **ARG2** für das PCa ist bislang nicht ausreichend untersucht und geklärt. Die mRNA-Expression von ARG2 ist auch in der gesunden Prostata vergleichsweise hoch (Vockley et al., 1996). Mummenthaler et al. untersuchten die Expression von ARG2 im PCa auf Gen- und Proteinebene in verschiedenen PCa-Zelllinien im Hinblick auf klinische Charakteristika. Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene zeigten sich hohe ARG2-Expressionen in den besser-differenzierten, androgen-abhängigen Zelllinien und niedrige in den weniger-differenzierten, androgen-unabhängigen Zelllinien. Bei der zusätzlichen Analyse der Expression von ARG2 in PCa- und Normalgewebe mittels Gewebe-Microarray-Untersuchung zeigten sich höhere Expressionen im benignen Prostatagewebe verglichen mit dem PCa-Gewebe. Innerhalb der

PCa-Gewebeproben wurde außerdem eine inverse Korrelation zwischen ARG2-Expression und Gleason-*Grading* beobachtet (Mumenthaler et al., 2008). Gannon et al. zeigten ebenfalls, dass die Proteinexpression von ARG2 im PCa-Gewebe niedriger ausfällt als im Normalgewebe (Gannon et al., 2010). Bronte et al. ermittelten hingegen in einer kleineren Stichprobe eine höhere ARG2-Proteinexpression im PCa-Gewebe (n=4) verglichen mit dem Normalgewebe (n=2). Sie sahen außerdem einen Einfluss der Co-Expression von ARG2 und NOS2 (*Nitric Oxide Synthase 2*) auf die lokale Immunsuppression beim PCa (Bronte et al., 2005). In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich, dass ARG2 weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden, benignen Gewebe signifikant verändert exprimiert wird. Es lässt sich aber vermuten, dass ARG2 kein geeigneter Biomarker für das PCa ist. Im Bronchialkarzinom wurde eine Proteinexpression von ARG2 in 82,5% der Bronchialkarzinom-Proben nachgewiesen, allerdings wurde keine Korrelation mit Tumoreigenschaften gefunden (Rotondo et al., 2008). Im duktalem Pankreaskarzinom fand sich eine Proteinexpression von ARG2 selten in den Karzinomzellen selbst und stattdessen häufiger in „karziom-assoziierten Fibroblasten“ in der nekrotischen Umgebung (Ino et al., 2013).

**PSMA** ist ein hoffnungsvolles Therapieziel in der aktuellen Forschung und außerdem wird ein großes Potential als diagnostischer und prognostischer Biomarker angenommen (Wolf, 2011). Die Funktion von PSMA für die Prognoseeinschätzung scheint besonders interessant zu sein, da es eine Korrelation zwischen der Überexpression und Eigenschaften wie beispielsweise dem *Grading*, Tumorstadium und der biochemischen Rezidive zu geben scheint (Ross et al., 2003). Es konnte sowohl in benignem, als auch in malignem Prostatagewebe eine hohe Expression von PSMA mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden (Silver et al., 1997). Auch Kinoshita et al. bestätigten dies. Sie wiesen jedoch auch PSMA-Expressionen in diversen anderen benignen und malignen Geweben nach (Kinoshita et al., 2006). Bostwick et al. publizierten eine gesteigerte Expression im malignen, im Vergleich zum benignen Prostatagewebe (Bostwick et al., 1998) – im Gegensatz zu der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung stammten die benignen Gewebe hier jedoch von Patienten ohne PCa. Wright et al. zeigten, dass sich sogar das PSMA-Expressionsmuster von benignen Tumoren der Prostata und gesundem Prostatagewebe unterscheidet (Wright et al., 1995). In dieser vorliegenden Analyse war PSMA auf mRNA-Ebene im PCa-Gewebe im Vergleich zum umliegenden benignen Gewebe nicht verstärkt exprimiert. Antunes et al. führten ebenfalls eine quantitative PSMA-Genexpressionsuntersuchung von PCa-Gewebeproben durch. In ihrer

Untersuchung war im PCa-Gewebe die Expression im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Patienten mit BPH in allen 33 Fällen erhöht. Im benignen Geweben der PCa-Patienten zeigte sich immer noch bei 15 von 17 Patienten eine erhöhte PSMA-Genexpression im Vergleich zu den BPH-Geweben der Kontrollgruppe (Antunes et al., 2009). Auch diese Untersuchung lässt also eine hohe Genexpression von PSMA im umliegenden Normalgewebe von PCa-Patienten vermuten und stützt damit die Ergebnisse dieser Arbeit, auch wenn Antunes et al. keinen direkten intraindividuellen Vergleich von PCa-Patienten publizierten.

Der für die vorliegende Untersuchung gewählte Vergleich der Expressionen von PCa- und umliegendem Normalgewebe von Patienten mit PCa ist noch weitaus weniger untersucht als der Vergleich der Gewebe von PCa-Patienten und Nicht-PCa-Patienten. Da nicht von allen Patienten genug Probenmaterial für eine Herstellung von Proteinlysaten zur Verfügung stand, haben sich unterschiedlich große Pools für die intraindividuelle Gen- und Proteinexpressionsanalyse entwickelt. Die Ergebnisse wären eventuell mit den exakt gleichen Probenpools klarer. Der Versuchsaufbau wäre also neben einer größeren Anzahl von Patienten durch größere Gewebequantitäten optimierbar. So könnte aus jeder Probe sowohl die RNA isoliert, als auch ein Proteinlysate erstellt werden.

Generell eignen sich Biomarker, die an Gewebeprobe validiert wurden, weniger gut für eine klinische Nutzung, da beispielsweise Blut und Urin einfacher und weniger- bis nicht-invasiv getestet werden können. Allerdings kann man durch die Analyse von Gewebeprobe potentielle Biomarker identifizieren und diese gegebenenfalls auch im Blut oder Urin bestimmen. Bereits in der Einleitung dieser Arbeit wurde diese Entwicklung am Beispiel von AMACR veranschaulicht: Nachdem der Nachweis von erhöhten mRNA- und Proteinexpressionen im PCa-Gewebe mehrfach publiziert wurde, wurden Testungen auf das AMACR-Protein im Urin entwickelt (siehe 1.2.3 Weitere Biomarker). Ein Beispiel dafür, dass ein erhöhter Nachweis im Blut nicht zwingend mit einer erhöhten Expression in der Zelle einhergeht, ist das PSA. Es wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression von PSA im PCa-Gewebe signifikant niedriger ist als im benignen Gewebe (Qiu et al., 1990). Dieser Fakt macht deutlich, dass nicht ausschließlich die Expressionen von Genen und Proteinen bei der Erforschung neuer Biomarker berücksichtigt werden dürfen.

Die vorliegende Untersuchung identifizierte einige Gene und Proteine, deren Expression sich zwischen PCa-Gewebe und dem umliegenden benignen Gewebe unterscheidet und die damit potentielle Biomarker für das PCa darstellen. Es sollten weitere Validierungen mit

größeren Patientenpools erfolgen und gegebenenfalls klinische Eigenschaften in die Analysen miteinbezogen werden. Auch eine Ausweitung der Proteinexpressionsuntersuchungen könnte die bestehenden Ergebnisse weiter ergänzen. Hierfür würden sich insbesondere sogenannte *tissue microarrays* (TMA) eignen. Interessant wäre zudem eine Bestimmung der hier untersuchten Gene und Proteine im Serum beziehungsweise Urin durchzuführen, um so das Potential dieser Biomarker für die klinische Praxis zu überprüfen. Mittlerweile wurden außerdem sensitivere Methoden der Proteomanalyse im Vergleich zu der von uns verwendeten 2-dimensionalen Gelelektrophorese entwickelt. Diese bieten die Möglichkeit, auch differentiell vorhandene Proteinen mit einer geringen Expression nachzuweisen. Ein Beispiel hierfür sind die häufig schwach exprimierten Transkriptionsfaktoren. Zudem wäre es in Zukunft denkbar, eine Proteomanalyse von unterschiedlichen Arealen eines PCa durchzuführen, um so die Heterogenität genauer zu analysieren.

Die weitere Untersuchung der hier dargestellten Gene und Proteine, sowie der anderen identifizierten Gene und Proteine unserer Arbeitsgruppe, könnte dazu beitragen, das PCa besser zu charakterisieren und zu verstehen.

## 5. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist in Deutschland das häufigste Karzinom des Mannes und die dritthäufigste Krebstodesursache des Mannes. Neben der körperlichen Untersuchung ist die Bestimmung des PSA im Blut ein wichtiger Bestandteil der Früherkennungsuntersuchung. Der PSA-Wert gerät jedoch immer wieder in die Kritik und es wurden daher Varianten des PSA-Werts und auch neue Biomarker entwickelt. Kaum einer dieser potentiellen Marker hat bisher Einzug in die klinische Praxis gefunden und es besteht weiterhin ein Bedarf an neuen, effizienten Biomarkern.

In dieser Arbeit wurde daher die Expression von zehn Genen und vier Proteinen untersucht, die in einer vergleichenden Proteomuntersuchung mittels 2-dimensionaler Gelelektroporese in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dr. S. Balabanov identifiziert worden sind. Für die Genexpressionsuntersuchung wurde die quantitative *real-time* PCR und für die Proteinexpressionsuntersuchung eine Analyse von Western-Blots durchgeführt. Es wurde eine intraindividuelle Analyse in Prostatakarzinomgeweben und umliegenden benignen Geweben auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt und durch eine interindividuelle Analyse auf mRNA-Ebene mit einem größeren Patientenpool ergänzt. In der intraindividuellen Analyse, die bisher weit weniger untersucht ist als der interindividuelle Vergleich, wurde die Möglichkeit gesehen, karzinom-assoziierte Gene und Proteine direkt zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für einige der untersuchten Gene und Proteine signifikante Expressionsunterschiede zwischen Prostatakarzinomgewebe und benachbartem benignen Prostatagewebe bestehen. Eine Bedeutung als potentielle neue Biomarker könnte in Zukunft den Peroxiredoxinen PRDX3 und PRDX4 zukommen. PRDX4 war auf mRNA-Ebene signifikant höher exprimiert, PRDX3 zeigte hingegen eine signifikant erhöhte Expression auf Proteinebene. Außerdem zeigten auf mRNA-Ebene UCHL1, Myc, FKBP4 und PPA2 sowie auf Proteinebene eIF4a3 signifikante Unterschiede in den Expressionsuntersuchungen.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass einige dieser untersuchten Gene und Proteine potentielle neue Biomarker für das PCa sein könnten.

Die vorliegenden Ergebnisse bieten außerdem die Grundlage für weitere funktionelle Untersuchungen des Prostatakarzinoms und auch das klinische Potential dieser Biomarker kann in Zukunft geprüft werden.

Die vorliegende Untersuchung leistet damit einen wichtigen Beitrag zur Erforschung des Prostatakarzinoms und ermöglicht somit auch neue diagnostische und therapeutische Fortschritte.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aly, M., Wiklund, F. & Grönberg, H. (2011) Early detection of prostate cancer with emphasis on genetic markers. *Acta oncologica* (Stockholm, Sweden), 50 Suppl 1, pp.18–23.
- Andriole, G.L., Crawford, E.D., Grubb, R.L., Buys, S.S., Chia, D., Church, T.R., Fouad, M.N., Isaacs, C., Kvale, P.A., Reding, D.J., Weissfeld, J.L., Yokochi, L.A., O'Brien, B., Ragard, L.R., Clapp, J.D., Rathmell, J.M., Riley, T.L., Hsing, A.W., Izmirlan, G., Pinsky, P.F., Kramer, B.S., Miller, A.B., Gohagan, J.K., Prorok, P.C. for the PLCO Project Team (2012) Prostate Cancer Screening in the Randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: Mortality Results after 13 Years of Follow-up. *Journal of the National Cancer Institute*, 104 (2), pp.125–132.
- Anon (2006) Real-Time PCR Applications Guide. pp.1–105. [Online im Internet.] URL: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf> [Stand: 15.9.2013, 12:15 Uhr].
- Anon (2011) Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. AWMF-Register-Nummer 043-022OL, Version 2.0 – 1. Aktualisierung 2011. pp.1–341. [Online im Internet.] URL: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043-022OL\\_S3\\_Prostatakarzinom\\_2011.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-022OL_S3_Prostatakarzinom_2011.pdf) [Stand: 10.9.2013, 18:15 Uhr].
- Anon (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012. pp.1–136. [Online im Internet.] URL: [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2012/krebs\\_in\\_deutschland\\_2012.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/krebs_in_deutschland_2012.pdf?__blob=publicationFile) [Stand: 12.9.2013, 19:30 Uhr].
- Antunes, A.A., Leite, K.R., Sousa-Canavez, J.M., Camara-Lopes, L.H. & Srougi, M. (2009) The Role of Prostate Specific Membrane Antigen and Pepsinogen C Tissue Expression as an Adjunctive Method to Prostate Cancer Diagnosis. *JURO*, 181 (2), pp.594–600.
- Artibani, W. (2012) Landmarks in prostate cancer diagnosis: the biomarkers. *BJU international*, 110 Suppl 1, pp.8–13.
- Basu, A., Banerjee, H., Rojas, H., Martinez, S.R., Roy, S., Jia, Z., Lilly, M.B., De León, M. & Casiano, C.A. (2010) Differential expression of peroxiredoxins in prostate cancer: Consistent upregulation of PRDX3 and PRDX4. *The Prostate*, 71 (7), pp.755–765.
- Beltran, H. & Rubin, M.A. (2013) New strategies in prostate cancer: translating genomics into the clinic. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19 (3), pp.517–523.
- Benson, M.C., Whang, I.S., Pantuck, A., Ring, K., Kaplan, S.A., Olsson, C.A. & Cooner, W.H. (1992) Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *The Journal of Urology*, 147 (3 Pt 2), pp.815–816.

- Bokhorst, L.P., Zhu, X., Bul, M., Bangma, C.H., Schröder, F.H. & Roobol, M.J. (2012) Positive predictive value of prostate biopsy indicated by prostate-specific-antigen-based prostate cancer screening: trends over time in a European randomized trial\*. *BJU international*, 110 (11), pp.1654–1660.
- Bonazzi, V.F., Nancarrow, D.J., Stark, M.S., Moser, R.J., Boyle, G.M., Aoude, L.G., Schmidt, C. & Hayward, N.K. (2011) Cross-platform array screening identifies COL1A2, THBS1, TNFRSF10D and UCHL1 as genes frequently silenced by methylation in melanoma. *PloS one*, 6 (10), p.e26121.
- Bostwick, D.G., Pacelli, A., Blute, M., Roche, P. & Murphy, G.P. (1998) Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer*, 82 (11), pp.2256–2261.
- Boxer, L.M. & Dang, C.V. (2001) Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene*, 20 (40), pp.5595–5610.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F. & Viola, A. (2005) Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *The Journal of experimental medicine*, 201 (8), pp.1257–1268.
- Carter, H.B., Pearson, J.D., Metter, E.J., Brant, L.J., Chan, D.W., Andres, R., Fozard, J.L. & Walsh, P.C. (1992) Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 267 (16), pp.2215–2220.
- Catalona, W.J., Richie, J.P., Ahmann, F.R., Hudson, M.A., Scardino, P.T., Flanigan, R.C., deKernion, J.B., Ratliff, T.L., Kavoussi, L.R. & Dalkin, B.L. (1994) Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The Journal of Urology*, 151 (5), pp.1283–1290.
- Catalona, W.J., Partin, A.W., Slawin, K.M., Brawer, M.K., Flanigan, R.C., Patel, A., Richie, J.P., deKernion, J.B., Walsh, P.C., Scardino, P.T., Lange, P.H., Subong, E.N., Parson, R.E., Gasior, G.H., Loveland, K.G. & Southwick, P.C. (1998) Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 279 (19), pp.1542–1547.
- Cha, M.-K., Suh, K.-H. & Kim, I.-H. (2009) Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 28, p.93.
- Chakraborty, M., Qiu, S.G., Vasudevan, K.M. & Rangnekar, V.M. (2001) Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Research*, 61 (19), pp.7255–7263.

- Chang, T.-S., Cho, C.-S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W. & Rhee, S.G. (2004) Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 279 (40), pp.41975–41984.
- Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.-C., Thomas, D.G., Shedden, K.A., Taylor, J.M.G., Kardia, S.L.R., Misek, D.E., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., Hanash, S.M. & Beer, D.G. (2002) Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8 (7), pp.2298–2305.
- Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Cox, M.B., Riggs, D.L., Suarez-Quian, C. & Smith, D.F. (2005) Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19 (6), pp.1654–1666.
- Cioffi, D.L., Hubler, T.R. & Scammell, J.G. (2011) Organization and function of the FKBP52 and FKBP51 genes. *Current Opinion in Pharmacology*, 11 (4), pp.308–313.
- Cook, J., Krishnan, S., Ananth, S., Sells, S.F., Shi, Y., Walther, M.M., Linehan, W.M., Sukhatme, V.P., Weinstein, M.H. & Rangnekar, V.M. (1999) Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 18 (5), pp.1205–1208.
- De Leon, J.T., Iwai, A., Feau, C., Garcia, Y., Balsiger, H.A., Storer, C.L., Suro, R.M., Garza, K.M., Lee, S., Kim, Y.S., Chen, Y., Ning, Y.-M., Riggs, D.L., Fletterick, R.J., Guy, R.K., Trepel, J.B., Neckers, L.M. & Cox, M.B. (2011) Targeting the regulation of androgen receptor signaling by the heat shock protein 90 cochaperone FKBP52 in prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (29), pp.11878–11883.
- Dennis, L.K. & Dawson, D.V. (2002) Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 13 (1), pp.72–79.
- Dennis, L.K., Lynch, C.F. & Torner, J.C. (2002) Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology*, 60 (1), pp.78–83.
- Draisma, G., Boer, R., Otto, S.J., van der Crujisen, I.W., Damhuis, R.A.M., Schröder, F.H. & de Koning, H.J. (2003) Lead times and overdetection due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95 (12), pp.868–878.
- Fukutomi, S., Seki, N., Koda, K. & Miyazaki, M. (2007) Identification of methylation-silenced genes in colorectal cancer cell lines: genomic screening using oligonucleotide arrays. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 42 (12), pp.1486–1494.
- Gannon, P.O., Godin-Ethier, J., Hassler, M., Delvoeye, N., Aversa, M., Poisson, A.O., Péant, B., Alam Fahmy, M., Saad, F., Lapointe, R. & Mes-Masson, A.-M. (2010) Androgen-regulated expression of arginase 1, arginase 2 and interleukin-8 in human prostate cancer. *PLoS one*, 5 (8), p.e12107.
- Gleason, D.F. (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer chemotherapy reports. Part 1*, 50 (3), pp.125–128.

- Goswami, A., Burikhanov, R., de Thonel, A., Fujita, N., Goswami, M., Zhao, Y., Eriksson, J.E., Tsuruo, T. & Rangnekar, V.M. (2005) Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival. *Molecular cell*, 20 (1), pp.33–44.
- Greene, K.L., Albertsen, P.C., Babaian, R.J., Carter, H.B., Gann, P.H., HAN, M., Kuban, D.A., Sartor, A.O., Stanford, J.L., Zietman, A. & Carroll, P. (2013) Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *The Journal of Urology*, 189 (1 Suppl), pp.S2–S11.
- Hellman, K., Alaiya, A.A., Becker, S., Lomnytska, M., Schedvins, K., Steinberg, W., Hellström, A.-C., Andersson, S., Hellman, U. & Auer, G. (2009) Differential tissue-specific protein markers of vaginal carcinoma. *British Journal of Cancer*, 100 (8), pp.1303–1314.
- Hoffman, B. & Liebermann, D.A. (1998) The proto-oncogene c-myc and apoptosis. *Oncogene*, 17 (25), pp.3351–3357.
- Hoffman, B., Amanullah, A., Shafarenko, M. & Liebermann, D.A. (2002) The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene*, 21 (21), pp.3414–3421.
- Humphrey, P.A. (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology*, 17 (3), pp.292–306.
- Huncharek, M., Haddock, K.S., Reid, R. & Kupelnick, B. (2010) Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American journal of public health*, 100 (4), pp.693–701.
- Hurst-Kennedy, J., Chin, L.-S. & Li, L. (2012) Ubiquitin C-terminal hydrolase 11 in tumorigenesis. *Biochemistry research international*, 2012, p.123706.
- Immenschuh, S. & Baumgart-Vogt, E. (2005) Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxidants & redox signaling*, 7 (5-6), pp.768–777.
- Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Oguro, S., Shimada, K., Kosuge, T., Zavada, J., Kanai, Y. & Hiraoka, N. (2013) Arginase II Expressed in Cancer-Associated Fibroblasts Indicates Tissue Hypoxia and Predicts Poor Outcome in Patients with Pancreatic Cancer H. Algül ed. *PloS one*, 8 (2), p.e55146.
- Iyer, R., Jenkinson, C.P., Vockley, J.G., Kern, R.M., Grody, W.W. & Cederbaum, S. (1998) The human arginases and arginase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, 21 Suppl 1, pp.86–100.
- Jamaspishvili, T., Kral, M., Khomeriki, I., Vyhnankova, V., Mgebrishvili, G., Student, V., Kolar, Z. & Bouchal, J. (2011) Quadriplex model enhances urine-based detection of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 14 (4), pp.354–360.
- Jiang, Z., Woda, B.A., Rock, K.L., Xu, Y., Savas, L., Khan, A., Pihan, G., Cai, F., Babcook, J.S., Rathanaswami, P., Reed, S.G., Xu, J. & Fanger, G.R. (2001) P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 25 (11), pp.1397–1404.

- Jin, D.Y., Chae, H.Z., Rhee, S.G. & Jeang, K.T. (1997) Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry*, 272 (49), pp.30952–30961.
- Johns, L.E. & Houlston, R.S. (2003) A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU international*, 91 (9), pp.789–794.
- Johnstone, R.W., See, R.H., Sells, S.F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D.A., Licht, J.D., Sugrue, S.P., Roberts, T., Rangnekar, V.M. & Shi, Y. (1996) A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Molecular and cellular biology*, 16 (12), pp.6945–6956.
- Kim, K., Yu, M., Han, S., Oh, I., Choi, Y.-J., Kim, S., Yoon, K., Jung, M. & Choe, W. (2009) Expression of human peroxiredoxin isoforms in response to cervical carcinogenesis. *Oncology reports*, 21 (6), pp.1391–1396.
- Kinoshita, Y., Kuratsukuri, K., Landas, S., Imaida, K., Rovito, P.M., Jr., Wang, C.Y. & Haas, G.P. (2006) Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen in Normal and Malignant Human Tissues. *World Journal of Surgery*, 30 (4), pp.628–636.
- Koh, C.M., Bieberich, C.J., Dang, C.V., Nelson, W.G., Yegnasubramanian, S. & De Marzo, A.M. (2010) MYC and Prostate Cancer. *Genes & Cancer*, 1 (6), pp.617–628.
- Lee, S., Baek, M., Yang, H., Bang, Y.-J., Kim, W.H., Ha, J.-H., Kim, D.-K. & Jeoung, D.-I. (2002) Identification of genes differentially expressed between gastric cancers and normal gastric mucosa with cDNA microarrays. *Cancer letters*, 184 (2), pp.197–206.
- Lehtonen, S.T., Svensk, A.-M., Soini, Y., Pääkkö, P., Hirvikoski, P., Kang, S.W., Säily, M. & Kinnula, V.L. (2004) Peroxiredoxins, a novel protein family in lung cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 111 (4), pp.514–521.
- Lilja, H. (1985) A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *The Journal of clinical investigation*, 76 (5), pp.1899–1903.
- Lilja, H., Christensson, A., Dahlén, U., Matikainen, M.T., Nilsson, O., Pettersson, K. & Lövgren, T. (1991) Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clinical chemistry*, 37 (9), pp.1618–1625.
- Lilja, H., Ulmert, D. & Vickers, A.J. (2008) Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nature Reviews Cancer*, 8 (4), pp.268–278.
- Lin, J.-F., Xu, J., Tian, H.-Y., Gao, X., Chen, Q.-X., Gu, Q., Xu, G.-J., Song, J.-D. & Zhao, F.-K. (2007) Identification of candidate prostate cancer biomarkers in prostate needle biopsy specimens using proteomic analysis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121 (12), pp.2596–2605.
- Liu, X., Zeng, B., Ma, J. & Wan, C. (2009) Comparative proteomic analysis of osteosarcoma cell and human primary cultured osteoblastic cell. *Cancer investigation*, 27 (3), pp.345–352.

- Loeb, S., van den Heuvel, S., Zhu, X., Bangma, C.H., Schröder, F.H. & Roobol, M.J. (2012) Infectious complications and hospital admissions after prostate biopsy in a European randomized trial. *European urology*, 61 (6), pp.1110–1114.
- Lund Nilsson, T.I., Johnsen, R. & Vatten, L.J. (2000) Socio-economic and lifestyle factors associated with the risk of prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 82 (7), pp.1358–1363.
- Lundin, M., Baltscheffsky, H. & Ronne, H. (1991) Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *The Journal of biological chemistry*, 266 (19), pp.12168–12172.
- Mastoraki, A., Ioannidis, E., Apostolaki, A., Patsouris, E. & Aroni, K. (2009) PGP 9.5 and cyclin D1 coexpression in cutaneous squamous cell carcinomas. *International journal of surgical pathology*, 17 (6), pp.413–420.
- McGregor, S.E., Courneya, K.S., Kopciuk, K.A., Tosevski, C. & Friedenreich, C.M. (2013) Case-control study of lifetime alcohol intake and prostate cancer risk. *Cancer causes & control : CCC*, 24 (3), pp.451–461.
- Meijer, M., Bloomfield, K. & Engholm, G. (2013) Neighbourhoods matter too: the association between neighbourhood socioeconomic position, population density and breast, prostate and lung cancer incidence in Denmark between 2004 and 2008. *Journal of epidemiology and community health*, 67 (1), pp.6–13.
- Moreno-Bueno, G., Fernandez-Marcos, P.J., Collado, M., Tendero, M.J., Rodriguez-Pinilla, S.M., Garcia-Cao, I., Hardisson, D., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Serrano, M. & Palacios, J. (2007) Inactivation of the candidate tumor suppressor par-4 in endometrial cancer. *Cancer Research*, 67 (5), pp.1927–1934.
- Mumenthaler, S.M., Yu, H., Tze, S., Cederbaum, S.D., Pegg, A.E., Seligson, D.B. & Grody, W.W. (2008) Expression of arginase II in prostate cancer. *International journal of oncology*, 32 (2), pp.357–365.
- Pang, J., Liu, W.-P., Liu, X.-P., Li, L.-Y., Fang, Y.-Q., Sun, Q.-P., Liu, S.-J., Li, M.-T., Su, Z.-L. & Gao, X. (2010) Profiling Protein Markers Associated with Lymph Node Metastasis in Prostate Cancer by DIGE-based Proteomics Analysis. *Journal of Proteome Research*, 9 (1), pp.216–226.
- Park, J.H., Kim, Y.S., Lee, H.L., Shim, J.Y., Lee, K.S., Oh, Y.J., Shin, S.S., Choi, Y.H., Park, K.J., Park, R.W. & Hwang, S.C. (2006) Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 11 (3), pp.269–275.
- Parker, C. (2004) Active surveillance: towards a new paradigm in the management of early prostate cancer. *The lancet oncology*, 5 (2), pp.101–106.
- Penson, D.F., McLerran, D., Feng, Z., Li, L., Albertsen, P.C., Gilliland, F.D., Hamilton, A., Hoffman, R.M., Stephenson, R.A., Potosky, A.L. & Stanford, J.L. (2008) 5-year urinary and sexual outcomes after radical prostatectomy: results from the Prostate Cancer Outcomes Study. *The Journal of Urology*, 179 (5 Suppl), pp.S40–4.

- Peter, J., Unverzagt, C., Krogh, T.N., Vorm, O. & Hoesel, W. (2001) Identification of precursor forms of free prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. *Cancer Research*, 61 (3), pp.957–962.
- Pfaffl, M.W. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1 (04), pp.92–95.
- Pinto, J.T., Suffoletto, B.P., Berzin, T.M., Qiao, C.H., Lin, S., Tong, W.P., May, F., Mukherjee, B. & Heston, W.D. (1996) Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2 (9), pp.1445–1451.
- Powell, I.J., Bock, C.H., Ruterbusch, J.J. & Sakr, W. (2010) Evidence Supports a Faster Growth Rate and/or Earlier Transformation to Clinically Significant Prostate Cancer in Black Than in White American Men, and Influences Racial Progression and Mortality Disparity. *The Journal of Urology*, 183 (5), pp.1792–1797.
- Qiu, S.D., Young, C.Y., Bilhartz, D.L., Prescott, J.L., Farrow, G.M., He, W.W. & Tindall, D.J. (1990) In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *The Journal of Urology*, 144 (6), pp.1550–1556.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2012) Die Glykolyse. In: *Duale Reihe Biochemie*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p.73.
- Roddam, A.W., Duffy, M.J., Hamdy, F.C., Ward, A.M., Patnick, J., Price, C.P., Rimmer, J., Sturgeon, C., White, P., Allen, N.E. NHS Prostate Cancer Risk Management Programme (2005) Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: systematic review and meta-analysis. *European urology*, 48 (3), pp.386–399.
- Rogers, C., YAN, G., ZHA, S., GONZALGO, M., Isaacs, W., LUO, J., DEMARZO, A., NELSON, W. & PAVLOVICH, C. (2004) Prostate cancer detection on urinalysis for  $\alpha$  methylacyl coenzyme a racemase protein. *The Journal of Urology*, 172 (4), pp.1501–1503.
- Rohrmann, S., Linseisen, J., Allen, N., Bueno-de-Mesquita, H.B., Johnsen, N.F., Tjønneland, A., Overvad, K., Kaaks, R., Teucher, B., Boeing, H., Pischon, T., Lagiou, P., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Ricceri, F., Argüelles Suárez, M.V., Agudo, A., Sánchez, M.-J., Chirlaque, M.-D., Barricarte, A., Larrañaga, N., Boshuizen, H., van Kranen, H.J., Stattin, P., Johansson, M., Bjartell, A., Ulmert, D., Khaw, K.-T., Wareham, N.J., Ferrari, P., Romieu, I., Gunter, M.J.R., Riboli, E. & Key, T.J. (2012) Smoking and the risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *British Journal of Cancer*.
- Ross, J.S., Sheehan, C.E., Fisher, H.A.G., Kaufman, R.P., Kaur, P., Gray, K., Webb, I., Gray, G.S., Mosher, R. & Kallakury, B.V.S. (2003) Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9 (17), pp.6357–6362.

- Rotondo, R., Mastracci, L., Piazza, T., Barisone, G., Fabbi, M., Cassanello, M., Costa, R., Morandi, B., Astigiano, S., Cesario, A., Sormani, M.P., Ferlazzo, G., Grossi, F., Ratto, G.B., Ferrini, S. & Frumento, G. (2008) Arginase 2 is expressed by human lung cancer, but it neither induces immune suppression, nor affects disease progression. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 123 (5), pp.1108–1116.
- Sävblom, C., Malm, J., Giwercman, A., Nilsson, J.-A., Berglund, G. & Lilja, H. (2005) Blood levels of free-PSA but not complex-PSA significantly correlates to prostate release of PSA in semen in young men, while blood levels of complex-PSA, but not free-PSA increase with age. *The Prostate*, 65 (1), pp.66–72.
- Schmid, S.R. & Linder, P. (1992) D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Molecular Microbiology*, 6 (3), pp.283–292.
- Schröder, F.H. (2012) Landmarks in prostate cancer screening. *BJU international*, 110 Suppl 1, pp.3–7.
- Schröder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L.J., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Lilja, H., Zappa, M., Denis, L.J., Recker, F., Páez, A., Määtänen, L., Bangma, C.H., Aus, G., Carlsson, S., Villers, A., Rebillard, X., van der Kwast, T., Kujala, P.M., Blijenberg, B.G., Stenman, U.-H., Huber, A., Taari, K., Hakama, M., Moss, S.M., de Koning, H.J. & Auvinen, A. (2012) Prostate-Cancer Mortality at 11 Years of Follow-up. *New England Journal of Medicine*, 366 (11), pp.981–990.
- Sells, S.F., Wood, D.P., Joshi-Barve, S.S., Muthukumar, S., Jacob, R.J., Crist, S.A., Humphreys, S. & Rangnekar, V.M. (1994) Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 5 (4), pp.457–466.
- Sells, S.F., Han, S.S., Muthukkumar, S., Maddiwar, N., Johnstone, R., Boghaert, E., Gillis, D., Liu, G., Nair, P., Monnig, S., Collini, P., Mattson, M.P., Sukhatme, V.P., Zimmer, S.G., Wood, D.P., McRoberts, J.W., Shi, Y. & Rangnekar, V.M. (1997) Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 17 (7), pp.3823–3832.
- Shibuya, T., Tange, T.Ø., Sonenberg, N. & Moore, M.J. (2004) eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11 (4), pp.346–351.
- Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. (2013) Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63 (1), pp.11–30.
- Silver, D.A., Pellicer, I., Fair, W.R., Heston, W.D. & Cordon-Cardo, C. (1997) Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3 (1), pp.81–85.
- Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S. & Redwine, E. (1987) Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New England Journal of Medicine*, 317 (15), pp.909–916.

- Stephan, C., Lein, M., Jung, K., Schnorr, D. & Loening, S.A. (1997) The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. *Cancer*, 79 (1), pp.104–109.
- Stephan, C., Vincendeau, S., Houlgatte, A., Cammann, H., Jung, K. & Semjonow, A. (2013) Multicenter evaluation of [-2]proprostate-specific antigen and the prostate health index for detecting prostate cancer. *Clinical chemistry*, 59 (1), pp.306–314.
- Stratton, J. & Godwin, M. (2011) The effect of supplemental vitamins and minerals on the development of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Family Practice*, 28 (3), pp.243–252.
- Thompson, I.M., Pauler, D.K., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Lucia, M.S., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Ford, L.G., Lippman, S.M., Crawford, E.D., Crowley, J.J. & Coltman, C.A. (2004) Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level. *New England Journal of Medicine*, 350 (22), pp.2239–2246.
- Tokumaru, Y., Yamashita, K., Kim, M.S., Park, H.L., Osada, M., Mori, M. & Sidransky, D. (2008) The role of PGP9.5 as a tumor suppressor gene in human cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 123 (4), pp.753–759.
- Tomlins, S.A. (2005) Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science*, 310 (5748), pp.644–648.
- Tomonaga, T. (2004) Identification of Altered Protein Expression and Post-Translational Modifications in Primary Colorectal Cancer by Using Agarose Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Clinical Cancer Research*, 10 (6), pp.2007–2014.
- Tosoian, J. & Loeb, S. (2010) PSA and Beyond: The Past, Present, and Future of Investigative Biomarkers for Prostate Cancer. *The Scientific World JOURNAL*, 10, pp.1919–1931.
- Ummanni, R., Jost, E., Braig, M., Lohmann, F., Mundt, F., Baret, C., Schlomm, T., Sauter, G., Senff, T., Bokemeyer, C., Sültmann, H., Meyer-Schwesinger, C., Brümmendorf, T.H. & Balabanov, S. (2011a) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation. *Molecular cancer*, 10 (1), p.129.
- Ummanni, R., Mundt, F., Pospisil, H., Venz, S., Scharf, C., Baret, C., Fälth, M., Köllermann, J., Walther, R., Schlomm, T., Sauter, G., Bokemeyer, C., Sültmann, H., Schuppert, A., Brümmendorf, T.H. & Balabanov, S. (2011b) Identification of clinically relevant protein targets in prostate cancer with 2D-DIGE coupled mass spectrometry and systems biology network platform. *M. T. Ling ed. PloS one*, 6 (2), p.e16833.
- Ung, J.O., Richie, J.P., Chen, M.-H., Renshaw, A.A. & D'Amico, A.V. (2002) Evolution of the presentation and pathologic and biochemical outcomes after radical prostatectomy for patients with clinically localized prostate cancer diagnosed during the PSA era. *Urology*, 60 (3), pp.458–463.

- Vickers, A.J., Savage, C., O'Brien, M.F. & Lilja, H. (2009) Systematic review of pretreatment prostate-specific antigen velocity and doubling time as predictors for prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27 (3), pp.398–403.
- Vockley, J.G., Jenkinson, C.P., Shukla, H., Kern, R.M., Grody, W.W. & Cederbaum, S.D. (1996) Cloning and characterization of the human type II arginase gene. *Genomics*, 38 (2), pp.118–123.
- Wassarman, D.A. & Steitz, J.A. (1991) RNA splicing. Alive with DEAD proteins. *Nature*, 349 (6309), pp.463–464.
- Wittekind, C., Meyer, H.J. (2010) TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage, Wiley-Blackwell, Weinheim, pp.229-233.
- Wolf, P. (2011) Prostate Specific Membrane Antigen as Biomarker and Therapeutic Target for Prostate Cancer. In: *Prostate Cancer – Diagnostic and Therapeutic Advances*. Spiess PE (Hrg.), 1. Auflage, InTech, Rijeka, Croatia, pp. 81-91. [Online im Internet.] URL: <http://www.intechopen.com/books/prostate-cancer-diagnostic-and-therapeutic-advances> [Stand: 15.9.2013, 11:45 Uhr].
- Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J. & Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28 (1), pp.32–40.
- Wright, G.L., Haley, C., Beckett, M.L. & Schellhammer, P.F. (1995) Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urologic oncology*, 1 (1), pp.18–28.
- Xia, Q., Kong, X.-T., Zhang, G.-A., Hou, X.-J., Qiang, H. & Zhong, R.-Q. (2005) Proteomics-based identification of DEAD-box protein 48 as a novel autoantigen, a prospective serum marker for pancreatic cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 330 (2), pp.526–532.
- Xu, J., Stolk, J.A., Zhang, X., Silva, S.J., Houghton, R.L., Matsumura, M., Vedvick, T.S., Leslie, K.B., Badaro, R. & Reed, S.G. (2000) Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Research*, 60 (6), pp.1677–1682.
- Yamashita, K., Park, H.L., Kim, M.S., Osada, M., Tokumaru, Y., Inoue, H., Mori, M. & Sidransky, D. (2006) PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Research*, 66 (7), pp.3921–3927.
- Zeegers, M.P.A., Jellema, A. & Ostrer, H. (2003) Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer*, 97 (8), pp.1894–1903.

## 7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. med. Dr. rer. nat. Stefan Balabanov für die Bereitstellung dieses überaus interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die sehr engagierte und strukturierte Betreuung bedanken. Diese Arbeit konnte nur dank seiner Hilfsbereitschaft und konstruktiven Kritik entstehen.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Dr. rer. nat. Friedemann Honecker bedanken für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der Funktion als Doktorvater und Erstgutachter sowie für die äußerst freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer, Direktor der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, danke ich vielmals für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen.

Dr. rer. nat. Melanie Balabanov möchte ich ebenfalls besonders danken, für all die unzähligen Anregungen, Korrekturen, wunderbaren Gespräche und alles andere. Hervorzuheben sind hier auch ihre unermüdlichen Hilfen und Ratschläge beim Prozess der Fertigstellung dieser Arbeit – Danke!

Besonderer Dank gebührt außerdem Christine Baretz für die hervorragende Einarbeitung, die umfangreiche Unterstützung im Laboralltag und die unzähligen Hilfestellungen, Tipps und den Beistand.

Ein großer Dank gilt außerdem Dr. Ramesh Ummanni für die Einarbeitung in die Thematik des Prostatakarzinoms und der Biomarker sowie für die Anregungen und Hilfen.

Außerdem danke ich allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von PD Dr. med. Dr. rer. nat. Stefan Balabanov und Dr. rer. nat. Melanie Balabanov für die freundliche Atmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft. Erwähnt seien hier Yves Menkhaus, Nora Pällmann, Michael Preukschas, Imke Rohe und Henning Sievert.

Außerdem danke ich meiner Familie sowie meinen Freunden für die emotionale, motivierende Unterstützung und Ermutigung.

Abschließend gilt mein Dank den freiwilligen Spendern der untersuchten Gewebe der radikalen Prostatektomien der Martini-Klinik Hamburg sowie dem Deutschen Krebsforschungszentrum und Prof. Dr. rer. nat. Holger Sültmann für die Bereitstellung weiteren Probenmaterials. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## **8. Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....