

Identifikation und Charakterisierung neuer frühdiagnostischer Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des
akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
M. Sc. Cordelia Geisler
aus Wesel

Berichter:
Universitätsprofessorin Dr. med. Knüchel-Clarke
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Björn Usadel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek
online verfügbar.

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor bei Männern in Deutschland. Jedes Jahr erkranken alleine in Deutschland über 60.000 Männer, über 12.000 Patienten versterben an ihrem Karzinom. Eine der wichtigsten Fragen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lautet, ob ein Patient an einem aggressiven Karzinom erkrankt ist und im Laufe der Zeit ein Rezidiv entwickeln wird oder ob es sich um ein klinisch indolentes Karzinom handelt. Bis heute ist eine Unterscheidung der aggressiven von den indolenten Prostatakarzinomen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht möglich, da entsprechend geeignete Biomarker noch nicht für die Routinediagnostik zur Verfügung stehen. Folglich sind dringend neue Biomarker zur Stratifizierung des Rezidivrisikos von Prostatakarzinompatienten nötig. Weiterhin werden Biomarker zur nicht-invasiven Diagnose des Prostatakarzinoms benötigt, da der zurzeit zum Screening eingesetzte Biomarker PSA ausgesprochen umstritten ist. Ziel dieser Studie war es daher, neue Biomarker zur Diagnose und Prognose des humanen Prostatakarzinoms zu identifizieren.

Mittels zwei-dimensionaler *Difference in Gel Electrophoresis* (2D-DIGE) wurden 27 tumorfreie Gewebeprobe, 12 Prostatektomieproben von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv und 11 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv analysiert. Zwischen den Patientengruppen deregulierte Proteinspots wurden mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Hierbei konnten 3 Proteine als heraufreguliert und 11 Proteine als herabreguliert in Prostatakarzinomen im Vergleich zum tumorfreien Gewebe identifiziert werden. Zu den als dereguliert identifizierten Proteinen gehörten unter anderem TCP1alpha, Annexin A5 und Alpha-1B-Glycoprotein. Zusätzlich konnten 15 in Prostatakarzinomen mit Rezidiv herauf- und 16 herabregulierte Proteine im Vergleich zu Karzinomen ohne Rezidiv identifiziert werden. Unter anderem gehörten Secernin-1, Vinculin, Tetratricopeptidrepeat Protein 38 (TTC38) sowie Prostataspezifische saure Phosphatase (PAP) und Galactin-3 zu diesen differentiell regulierten Proteinen. *Principal Component* Analysen ließen eine Trennung von Tumoren mit Rezidiv von jenen ohne Rezidiv zu, was die Qualität der Studie genauso unterstreicht, wie die Identifikation von PAP und Galectin-3, die bereits als Prognosemarker für das Prostatakarzinom in der Literatur diskutiert werden. *Ingenuity Pathway* Analysen (IPA) zeigten, dass zwischen Tumoren und tumorfreien Geweben deregulierte Proteine vor allem mit zellulärer Assemblierung und zellulärem *compromise* assoziiert sind. Im Gegensatz dazu sind im rezidivierenden Prostatakarzinom deregulierte Proteine vor allem mit zellulärer Bewegung (Invasion und Migration), zellulärem Wachstum und Proliferation assoziiert. Beide Gruppen deregulierter Proteine sind außerdem mit zellulärer Entwicklung, zellulärer Morphologie und dem Kohlenhydratmetabolismus assoziiert. Folglich scheinen Proteine, die in Proliferation und zellulärer Bewegung involviert sind, besonders geeignete Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom zu sein.

Ausgewählte Proteine wurden nachfolgend validiert. Hierbei konnte für Annexin A5 sowohl im Western Blot ($p=0,041$) als auch im Urin mittels Flüssigchromatographie (*liquid chromatography*)-Multiple

Reaction Monitoring-MS (LC-MRM-MS) eine Heraufregulation in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreien Geweben gezeigt werden. Secernin-1 konnte mittels Western Blot ($p=0,001$), Immunhistochemie ($p<0,001$) und *Tissue Microarray* (TMA) Analysen ($p<0,001$) als herabreguliert in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe validiert werden. TMA Analysen von Vinculin hingegen zeigten, dass Vinculin in Prostatakarzinomen heraufreguliert ist im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe ($p<0,001$). Mehr noch konnte im Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv mittels Western Blot ($p=0,0229$) und LC-MRM-MS ($p>0,05$) eine Heraufregulation von Vinculin nachgewiesen werden. Damit sind Secernin-1 und Vinculin potentielle neue Biomarker für die Diagnose bzw. Prognose des humanen Prostatakarzinoms. Als interessanter prognostischer Biomarker kann auch TTC38 gehandelt werden, konnte doch die Heraufregulation von TTC38 in Tumoren im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe mittels Western Blot ($p=0,021$), Real-time PCR, Immunhistochemie ($p=0,009$) und TMA Analysen ($p<0,001$) bestätigt werden. Mehr noch war TTC38 in sämtlichen Analysen mit Ausnahme der TMA Analysen in Karzinomen ohne Rezidiv erhöht im Vergleich zu Karzinomen mit Rezidiv (Western Blot $p=0,029$, Real-time PCR $p=0,030$, Immunhistochemie $p=0,910$). Diese Ergebnisse waren auch im Urin der Prostatakarzinompatienten mittels LC-MRM-MS nachweisbar ($p=0,034$). Da es sich bei TTC38 um einen vielversprechenden Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom handelt, wurden funktionelle *in vitro* Analysen durchgeführt. In Kolonienbildungsassays zeigten Klone mit einer hohen TTC38 Expression dabei eine Tendenz zum schnelleren Wachstum und einer höheren Kolonienbildungsfähigkeit. In Migrations- und Invasionsassays zeigten PC-3 TTC38 knockdown Klone eine höhere Migrations- und Invasionsfähigkeit als die zugehörigen Kontrollklone. Allerdings zeigten auch PC3 TTC38 Überexpressionsklone eine höhere Migrationsfähigkeit als die jeweiligen zugehörigen Kontrollklone. Damit scheint eine Deregulation von TTC38 einen Einfluss auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie PC3 zu haben. Dieser Einfluss erfolgt möglicherweise über den Einfluss von TTC38 auf die Genexpressionen, zählten Proteine mit diesen Funktionen doch zu den mit TTC38 koregulierten Proteinen, wie LC-MS Analysen der PC-3 TTC38 knockdown und Überexpressionsklone zeigten.

In einem letzten Schritt konnte mittels LC-MRM-MS nachgewiesen werden, dass PAP im Urin von Prostatakarzinompatienten signifikant heraufreguliert ist im Vergleich zum Urin von Kontrollpatienten. Zusätzlich war Galectin-3 im Urin von Prostatakarzinompatienten herabreguliert im Vergleich zum Urin von Patienten ohne Rezidiv. Damit konnten unter anderem Vinculin, Galectin-3 und PAP Abundanzen im Urin erfolgreich mittels LC-MRM-MS nachgewiesen werden, was diese Proteine zu vielversprechenden nicht-invasiven Biomarkern für das (rezidivierende) Prostatakarzinom macht.

Summary

Prostate cancer is the most frequent cancer in men in Germany. More than 60.000 men are diagnosed with this disease every year, more than 12.000 men die due to this carcinoma. At the time of diagnosis, one of the most important questions is whether patients have an aggressive or a clinical indolent carcinoma. Until today, discriminating prostate cancer patients with aggressive cancer from those with indolent cancer is not possible because appropriate biomarkers are not available. Therefore, new biomarkers for stratifications of prostate cancer patients risk at the time of diagnosis are urgently needed. Moreover, biomarkers for non-invasive prostate cancer diagnosis are needed, since the widely used biomarker PSA is discussed controversial. Goal of this study was to identify new biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis.

Using two-dimensional Difference in Gel Electrophoresis (2D-DIGE), 27 tumor free tissue samples, 12 prostatectomy samples from prostate cancer patients without relapse and 11 prostatectomy samples from patients with relapse were analysed. Deregulated proteins were identified using mass spectrometry. Three proteins were up regulated and 11 proteins were down regulated in tumor samples compared to tumor free tissue samples. Among others, the identified proteins included TCP1alpha, annexin A5, and alpha-1B-glycoprotein. Additionally, 15 proteins were up regulated and 16 proteins were down regulated in prostate cancer with relapse compared to prostate cancer samples from patients without relapse. The identified proteins included secernin-1, vinculin, tetratricopeptid repeat domain protein 38 (TTC38), prostatic acid phosphatase (PAP) and galectin-3. Discrimination of samples from prostate cancer patients with and without relapse was possible by using principal component analysis. Moreover, the identification of PAP and galectin-3, both biomarkers that have already been discussed in literature as prognostic markers for prostate cancer, highlights the quality of the study. Ingenuity pathway analysis (IPA) showed that proteins deregulated between tumor and tumor free tissue samples are associated with cellular assembling and cellular compromise, while proteins deregulated between prostate cancer samples with and without relapse are mostly associated with movement (invasion and migration), cellular growth and proliferation. Both groups of deregulated proteins are associated with cellular development, cellular morphology and carbohydrate metabolism. Thus, proteins involved in cellular movement and proliferation might be the most promising biomarkers for prostate cancer prognosis.

In further analyses, selected proteins were validated. Up regulation of annexin A5 was shown in tissue samples of prostate cancer patients compared to tumor free samples using western blots ($p=0,041$) and in urine of prostate cancer patients compared to control patients by using liquid chromatography-multiple reaction monitoring-MS (LC-MRM-MS) ($p<0,05$). Secernin-1 was validated as down regulated in tumor free tissue samples compared to tumor tissue by using Western blots ($p=0,001$), immunohistochemistry ($p<0,001$) and independent tissue microarrays (TMA) ($p<0,001$). TMA analysis of

vinculin revealed vinculin as up regulated in prostate cancer compared to tumor free tissue samples ($p < 0,001$). Moreover, this up regulation was shown in urine of prostate cancer patients with relapse compared to those of patients without relapse by using Western blot ($p = 0,229$) and LC-MRM-MS ($p > 0,05$). Thus, secernin-1 and vinculin are promising new biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis, respectively. TTC38 is also an interesting prognostic biomarker, as its up regulation in prostate cancer tissue compared to tumor free tissue was validated by using Western blots ($p = 0,021$), real-time PCR, immunohistochemistry ($p = 0,009$) and an independent TMA ($p < 0,001$). Moreover, all of these analyses (except TMA analysis) showed a down regulation of TTC38 in recurrent prostate cancer patients tissue compared to prostate cancer tissue of patients without recurrence (western blots $p = 0,029$, real-time PCR $p = 0,030$, immunohistochemistry $p = 0,910$). These results were also validated in urine of prostate cancer patients by using LC-MRM-MS ($p = 0,034$). As TTC38 turned out to be a promising and interesting biomarker for prostate cancer prognosis, functional *in vitro* analyses were done. In colony formation assays, PC-3 clones with higher TTC38 expressions showed a tendency for faster growing and higher colony formation. Migration and invasion assays showed that PC-3 TTC38 knockdown clones showed higher migration and invasion capacity than the control clones. However, even PC-3 TTC38 over expressing clones showed higher migration and invasion capacity than the control clones. Thus, deregulation of TTC38 might influence the migration and invasion capacity of PC-3 cells. This influence might be impacted by the influence of TTC38 on proteins of gene expression regulation, as proteins with these functions were co-regulated with TTC38, as Liquid-chromatography mass spectrometry (LC-MS) analyses of PC-3 TTC38 knockdown and over expressing clones showed. Finally, PAP was validated as a potential non-invasive biomarker for prostate cancer as LC-MRM-MS analyses revealed PAP as up regulated in urine of prostate cancer patients compared to control urine. Additionally, galectin-3 was down regulated in urine of prostate cancer patients with relapse compared to urine of patients without relapse. Thus, abundances of vinculin, galectin-3 and PAP were successfully determined in urine by using LC-MRM-MS, which turns these proteins into promising biomarkers for (recurrent) prostate cancer.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Krebs – Definition und Inzidenz.....	1
1.2 Molekularbiologische Grundlagen der Karzinogenese / Tumorgenese	2
1.3 Anatomie und Funktion der Prostata.....	5
1.4 Das humane Prostatakarzinom	6
1.4.1 Epidemiologie des humanen Prostatakarzinoms.....	9
1.4.2 Risikofaktoren für das humane Prostatakarzinom.....	9
1.4.3 Diagnose des humanen Prostatakarzinoms	10
1.4.4 Histologie und Stadieneinteilung des humanen Prostatakarzinoms	11
1.4.5 Prognose und Prädiktion des humanen Prostatakarzinoms	13
1.4.6 PSA-Rezidiv-, Rezidiv- und Metastasenentwicklung beim humanen Prostatakarzinom	14
1.5 Potentielle Biomarker für das humane Prostatakarzinom.....	16
1.5.1 Potentielle Biomarker für die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms	16
1.5.1.1 Prostataspezifisches Antigen (PSA)	16
1.5.1.2 Weitere potentielle Biomarker für die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms	18
1.5.2 Prognostische Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom.....	20
1.6 Zelllinien als <i>in vitro</i> Modelle des humanen Prostatakarzinoms.....	22
1.6.1 Die Prostatakarzinomzelllinie Du145	23
1.6.2 Die Prostatakarzinomzelllinie PC3.....	23
1.6.3 Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP.....	24
1.7 Grundlagen der Proteomik.....	25
1.7.1 Methoden der Proteomik.....	26
1.7.1.1 Zwei-dimensionale <i>Difference in Gel electrophoresis</i> (2D-DIGE)	26
1.7.1.2 Massenspektrometrie (MS).....	28
1.7.1.3 Matrix assisted laser Desorption/Ionisation–time of flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF).....	29
1.7.1.4 Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)	30
1.7.1.5 Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>) Massenspektrometrie (LC-MS)	32
1.7.1.6 Flüssigchromatographie- <i>Multiple Reaction Monitoring</i> -MS (LC-MRM-MS)	33
2 Zielsetzung der Arbeit	35
3 Material und Methoden	37

3.1	Geräte, Software, Chemikalien und Lösungsmittel	37
3.1.1	Geräte	37
3.1.2	Chromatographiesäulen	39
3.1.3	Software	39
3.1.4	Datenbanken	40
3.1.5	Chemikalien und Lösungsmittel	40
3.1.6	Kits	43
3.1.7	weitere Reagenzien	43
3.1.8	Puffer und Lösungen.....	44
3.1.9	Medien und Zusätze für die Zellkultur	47
3.1.10	Medien zur Anzucht und Kultivierung von E.coli.....	47
3.2	Klinisches Patientenmaterial	47
3.2.1	Kryokonserviertes Gewebe für die 2D-DIGE und nachfolgende Western Blot Analysen.....	47
3.2.2	Formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe (FFPE)	48
3.2.3	Tissue Micro Arrays (TMA) für Immunhistochemische Analysen.....	48
3.2.4	Serumproben des Universitätsklinikums Bonn zur Verwendung in LC-MRM-MS-Analysen.....	49
3.3	Manuelle Mikrodisektion und Probenvorbereitung für die zwei-dimensionale <i>Differences in Gel Electrophoresis</i> (2D-DIGE) sowie für Western Blot Analysen	49
3.4	Proteombasierte Methoden	50
3.4.1	Herstellung von 2D-SDS-Polyacrylamidgelen	50
3.4.2	Sättigungsmarkierung von Proteinen und 2-dimensionale <i>Difference in Gel Electrophoresis</i> (2D-DIGE).....	50
3.4.3	Gelauswertung und statistischen Analysen der 2-dimensionale <i>Difference in Gel Electrophoresis</i> (2D-DIGE)	51
3.4.4	Herstellung präparativer 2D-Gele	52
3.4.5	Silberfärbung präparativer 2D-Gele	52
3.4.6	Tryptischer Verdau der zu identifizierenden Gelspots.....	52
3.4.7	Proteinidentifikation mittels <i>Matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i> (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (MS) und MS/MS.....	53
3.4.8	Proteinbestimmungen mittels Aminosäurenanalyse (ASA)	54
3.4.9	Proteinidentifikation mittels <i>Liquid-chromatographie</i> Massenspektrometrie (LC-MS).....	54
3.4.10	Identifikation differentiell regulierter Proteine mittels LC-MS und „Progenesis“	56
3.4.11	Quantifizierung ausgewählter Proteine mittels Flüssigchromatographie- <i>Multiple Reaction Monitoring</i> -MS (LC-MRM-MS)	57
3.4.11.1	Etablierung eines Protokolls zum tryptischen Verdau von Proteinen aus Urin und Serum.....	58

3.4.11.2	Auswahl der zu validierenden Proteine basierend auf den Vorergebnissen und Literaturrecherche	60
3.4.11.3	Auswahl der Markerpeptide für sämtliche ausgewählte Proteine	61
3.4.11.4	Synthese der stabil isopen-gelabelten Standard (SIS) Peptide	62
3.4.11.5	Optimierung der SIS-Peptide.....	63
3.4.11.6	Bestimmung der Retentionszeiten der Peptide (Peptide Scheduling).....	63
3.4.11.7	Interferenzscreening der SIS-Peptide in Serum und Urin	64
3.4.11.8	Balancing der SIS-Peptide.....	67
3.4.11.9	Probenmessung mittels LC-MRM-MS	69
3.4.11.10	Auswertung der Messerergebnisse und Bestimmung der „Response Ratio“ (RR)	69
3.4.11.11	Statistische Auswertung der Ergebnisse	70
3.5	Proteinchemische und immunhistochemische Methoden	70
3.5.1	Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay	70
3.5.2	Western Blot Analysen	70
3.6	Molekularbiologische Methoden	72
3.6.1	RNA Isolation aus Zelllinien und Frischgewebe.....	72
3.6.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (RNA und DNA)	73
3.6.3	Reverse Transkription von RNA.....	73
3.6.4	Semiquantitative Real-time PCR	74
3.6.5	DNA Isolation aus Zelllinien.....	76
3.6.6	Cycle-PCR von Plasmiden	76
3.6.7	Transformation von E. coli	77
3.6.8	Flüssig über Nacht Kultur der transformierten E.coli.....	77
3.6.9	Plasmidisolation	77
3.6.10	PCR zur Testung humaner Zelllinien auf Mykoplasmen.....	78
3.6.11	Agarosegelelektrophorese	78
3.7	Zellbiologische Methoden	79
3.7.1	Verwendete humane Zelllinien	79
3.7.2	Auftau humaner Zelllinien.....	79
3.7.3	Kultivierung humaner Zelllinien	79
3.7.4	Kryokonservierung humaner Zelllinien	80
3.7.5	Zellzahlbestimmung mittels Casy	81
3.7.6	Stabile Transfektion der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3	81
3.7.7	Funktionelle <i>in vitro</i> Experimente	84
3.7.7.1	XTT-Assay.....	84

3.7.7.2	Kolonienbildungstest (<i>Colony Formation Assay</i>).....	85
3.7.7.3	Wundheilungsassay (<i>Scratch Assay</i>).....	85
3.7.7.4	<i>Boyden Chamber</i> Invasionsassay.....	86
3.8	Statistische und bioinformatische Methoden.....	86
3.8.1	Statistische Analysen mit SPSS.....	86
3.8.2	Ingenuity Pathway Analysen (IPA).....	87
4	Ergebnisse.....	89
4.1	Identifikation potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom.....	89
4.1.1	Vorversuche an Prostatektomieproben von sechs Prostatakarzinompatienten zur Etablierung der 2D-DIGE.....	89
4.1.2	Analyse von Prostatakarzinomproben mittels 2-dimensionaler Differences in Gel Electrophoresis (2D-DIGE).....	91
4.1.3	Identifikation differentiell exprimierter Proteine mittels Massenspektrometrie (MS).....	94
4.2	“Ingenuity Pathway Analysen” (IPA) der identifizierten Proteine.....	95
4.3	Validierung der mittels 2D-DIGE und MS identifizierten potentiellen Biomarker für die Diagnose des Prostatakarzinoms.....	101
4.4	Validierung der mittels 2D-DIGE und MS identifizierten potentiellen Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom.....	103
4.4.1	Western Blot Validierung von Gelsolin und Calponin-1.....	103
4.4.2	Immunhistochemische Validierung von KCTD12.....	104
4.4.3	Validierung von Secernin-1 als potentieller Biomarker für das (rezidivierende) Prostatakarzinom.....	105
4.4.3.1	Western Blot Validierung von Secernin-1 an Tumorgewebe von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv.....	105
4.4.3.2	Immunhistochemische Validierung der Secernin-1 Expression in Prostatakarzinomgewebe.....	106
4.4.3.3	Analyse der Secernin-1 Expression im Entzündungsgeschehen.....	108
4.4.3.4	Validierung der differentiellen Secernin-1 Expression zwischen Tumoren und tumorfremem Gewebe an einem unabhängigem Patientenkollektiv mittels TMA.....	109
4.4.3.5	Der Einfluss der SCRN1-Expression im Prostatakarzinomgewebe auf das Überleben von Prostatakarzinompatienten.....	111
4.4.3.6	Der Nachweis von Secernin-1 im Serum von Prostatakarzinompatienten.....	111
4.4.4	Validierung von Vinculin als potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom.....	112
4.4.4.1	Immunhistochemische Validierung der differentiellen Vinculinexpression in rezidivierenden und nicht-rezidivierenden Prostatakarzinomen.....	112

4.4.4.2	Analyse der Vinculinexpression im Urin von Prostatakarzinompatienten.....	115
4.4.5	Validierung der differentiellen TTC38 Expression in Prostatakarzinomgeweben.....	116
4.4.5.1	Western Blot Validierung von TTC38 als potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom.....	116
4.4.5.2	Validierung der differentiellen TTC38 Expression mittels Real-time PCR.....	117
4.4.5.3	Immunhistochemische Validierung von TTC38.....	118
4.4.5.4	Validierung der differentiellen TTC38 Expression an einem unabhängigen Patientenkollektiv mittels TMA	120
4.5	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> als Hochdurchsatz Methode für die Validierung potentieller neuer Biomarker für das (rezidivierende) Prostatakarzinom	122
4.6	Funktionelle Charakterisierung von TTC38 als potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom.....	130
4.6.1	Expressionsanalysen von TTC38 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145.....	131
4.6.2	Herstellung und Charakterisierung stabiler TTC38 knockdown Transfektanden der Prostatakarzinomzelllinie PC-3	131
4.6.3	Herstellung und Charakterisierung stabiler TTC38 Überexpressionstransfektanden der Prostatakarzinomzelllinie PC-3	133
4.6.3.1	Funktionelle <i>in vitro</i> Charakterisierung der TTC38 Transfektanden	134
4.6.3.2	Der Einfluss von TTC38 auf die Proliferationsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3....	135
4.6.3.3	Der Einfluss von TTC38 auf das Kolonienbildungsvermögen der Prostatakarzinomzelllinie PC-3	136
4.6.3.4	Der Einfluss von TTC38 auf die Migrationsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3	138
4.6.3.5	Der Einfluss von TTC38 auf die Invasionsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3.....	141
4.6.4	TTC38 als Protein-Protein Interaktionspartner	142
4.6.4.1	TTC38 als Protein-Protein Interaktionspartner – Ingenuity Pathway Analysen und die experimentelle Bestätigung der theoretisch berechneten Interaktionspartner	142
4.6.4.2	TTC38 als Protein-Protein Interaktionspartner – Identifikation neuer potentieller Zielproteine von TTC38	144
5	Diskussion.....	149
5.1	Vorstudien an Prostatektomieproben von sechs Prostatakarzinompatienten validieren die Proteomik als gute Möglichkeit der Biomarkeridentifikation	149
5.2	Identifikation potentieller neuer Biomarker für das humane Prostatakarzinom mittels 2-dimensionaler Difference in Gel Electrophoresis (2D-DIGE) und Massenspektrometrie (MS).....	150
5.3	„Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der identifizierten potentiellen neuen Biomarker	151

5.4	Validierung potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom	152
5.4.1	Ist LC-MRM-MS für die Urin- und Serumvalidierung potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom geeignet? Beispielhafte Analyse von PAP und Galectin-3, zwei bekannten potentiellen Biomarkern für das Prostatakarzinom	152
5.4.2	Weitere Validierung potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom im Serum und Urin von Patienten mittels LC-MRM-MS – A1BG, GRP78	155
5.4.3	Annexin A5 und Gelsolin als potentieller neuer diagnostischer Biomarker für das humane Prostatakarzinom	156
5.4.4	T-Komplex Protein 1 subunit alpha (TCP1alpha) und Calponin-1 sind weder als diagnostische noch als prognostische potentielle neue Biomarker für das humane Prostatakarzinom geeignet	158
5.4.5	KCTD12, Secernin-1, Vinculin und TTC38 als potentielle neue Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom	159
5.4.5.1	KCTD12	159
5.4.5.2	Secernin-1 als neuer Basalzellmarker	160
5.4.5.3	Vinculin als potentieller neuer Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom	161
5.4.5.4	TTC38 als potentieller neuer Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom	163
5.5	Funktionelle Charakterisierung von TTC38, einem potentiellen neuen Biomarker für das (rezidivierende) Prostatakarzinom	164
5.6	Schlussfolgerungen	168
5.7	Ausblick	169
6	Literaturverzeichnis	171
7	Anhang	187
7.1	Anhang zum Material und Methoden Teil	187
7.1.1	Klinikopathologische Charkateristika der verwendeten Patientenkollektive	187
7.1.2	Multiple Reaction Monitoring	199
7.2	Anhang zum Ergebnisteil	200
7.2.1	2D-DIGE und MS Analysen	200
7.2.2	IPA Analysen	204
7.2.3	Multiple Reaction Monitoring	210
7.2.4	funktionelle Analysen	212
	Abkürzungsverzeichnis	223
	Tabellenverzeichnis	231
	Abbildungsverzeichnis	235
	Danksagung	239

Eidesstattliche Erklärung.....	241
Lebenslauf	242
Publikationsliste	244

1 Einleitung

1.1 Krebs – Definition und Inzidenz

Der umgangssprachliche Begriff „Krebs“ bezeichnet im medizinischen Sinne maligne Neoplasien, bösartige Neubildungen von Körpergewebe. Damit ist das Wachstum maligner Tumore gemeint. Maligne Tumore entstehen durch abnormes, ungehemmtes Wachstum körpereigenen Gewebes (Schäffler A, 1999). Das Zellwachstum ist dabei autonom, progressiv, exzessiv und unkontrolliert (Büttner und Thomas, 2003). Gleichzeitig ist der programmierte Zelltod (Apoptose) körpereigener Zellen vermindert (Wagener und Müller, 2010). Das Gleichgewicht zwischen Zellteilung, Differenzierung und Apoptose ist im neoplastischen Gewebe daher nicht mehr gegeben (Wagener und Müller, 2010). Das Wachstum maligner Tumore ist im Vergleich zu benignen (gutartigen) Tumoren infiltrierend, invasiv und destruierend (Alberts und Jaenicke, 2004). Es geht mit dem Verlust der Zell- und Gewebefunktion einher (Bast et al., 2000; Pschyrembel, 2002). Letztlich können sich einzelne Zellen des malignen Tumors lösen und sich über Blut- und Lymphgefäße in andere Gewebe absetzen (Coman, 1953; Kellner, 1971). Dort kommt es dann zur Bildung sog. Metastasen, Absiedelungen maligner Tumore in einem bisher gesunden Gewebe (Kellner, 1971). Auch in diesem Gewebe kommt es zum fortschreitenden Verlust der Zell- und Gewebefunktion. Damit führen maligne, metastasierende Tumore unbehandelt fast immer zum Tod des Patienten (Büttner und Thomas, 2003), wobei 90% der Patienten an den Folgen der Metastasierung versterben (Wagener und Müller, 2010); (Sporn, 1996).

Maligne Neoplasien können unterteilt werden in solide und nicht-solide Neoplasien. Nicht-solide Neoplasien betreffen das hämatopoetische System und werden auch als Leukämien bezeichnet. Maligne Tumore eines Zellverbandes bezeichnet man als solide Neoplasien (Gorstein und Anderson, 1991). Diese wiederum können nach ihrem Ursprungsgewebe unterteilt werden. Von mesenchymalem Gewebe ausgehende maligne Tumore bezeichnet man als Sarkome, von epitheliale Gewebe ausgehende Tumore werden als Karzinome bezeichnet (Pschyrembel, 2002).

In Deutschland wurden 469.800 neue Krebserkrankungen im Jahr 2010 diagnostiziert, wobei das Robert Koch-Institut die Inzidenz als steigend angibt (RKI, 2012). In 221.591 Fällen verstarben die Patienten 2011 an ihrer Krebserkrankung (Statistisches-Bundesamt, 2011). Damit ist Krebs mit 40,2 % aller Todesfälle in Deutschland (Statistisches-Bundesamt, 2011) die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauferkrankungen. Den größten Anteil der neu diagnostizierten Tumore bei Frauen macht das Mammakarzinom aus. Bei Männern ist das Prostatakarzinom mit 25,7 % (63.400 Fälle) aller Krebsneuerkrankungen der am häufigsten diagnostizierte maligne Tumor (Abbildung 1.1). Jedes Jahr versterben 12.000 Patienten an ihrem Prostatakarzinom. Damit ist das Prostatakarzinom die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern (RKI, 2012).

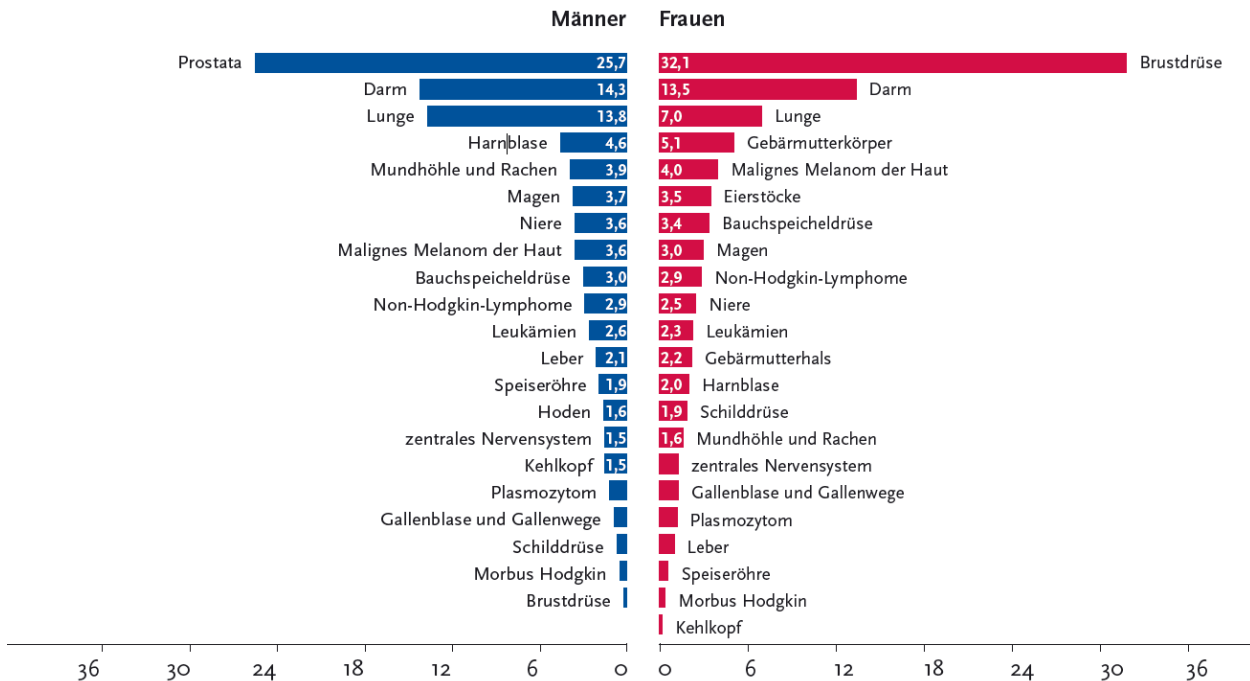


Abbildung 1.1: Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen. Abbildung übernommen vom Robert-Koch-Institut (RKI, 2012).

1.2 Molekularbiologische Grundlagen der Karzinogenese / Tumorgenese

Karzinome sind histologisch gekennzeichnet durch eine reversible Gewebeumbildung (Hyperplasie), die im weiteren Verlauf zunächst zu *in situ* Karzinomen, dann zu invasiven Karzinomen und letztlich zu Metastasen führt (Wagener und Müller, 2010; Fearon und Vogelstein, 1990). Die Grundlagen für solche histologischen Umwandlungen des Gewebes finden sich auf der molekularbiologischen Ebene der Zellen. Hierbei ist die Entstehung von Karzinomen (Karzinogenese) ein sehr komplexer Vorgang, der bei manchen Tumoren Jahrzehnte in Anspruch nehmen kann (Foulds, 1954; Wagener und Müller, 2010; Loeb et al., 2003). Kennzeichnend ist ein Ungleichgewicht zwischen Zellteilung, Apoptose und Differenzierung (Wagener und Müller, 2010). Hinzu kommen weitere Eigenschaften, die Hanahan und Weinberg 2006 als die sechs „*Hallmarks of Cancer*“ bezeichnet und 2011 auf 10 Eigenschaften erweitert haben (Hanahan und Weinberg, 2000; Hanahan und Weinberg, 2011):

1. Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren, wodurch eine unabhängige Zellproliferation möglich ist (Slamon et al., 1987; Yarden und Ullrich, 1988; Di Fiore et al., 1987)
2. Insensitivität der Zellen gegen Anti-Wachstumssignale, z.B. durch Mutationen in Genen der Zellzykluskontrolle (Weinberg, 1995; Fynan und Reiss, 1993)
3. Umgehung der Apoptose durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie z.B. p53 (Symonds et al., 1994)

4. Unbegrenztes Replikationspotential (Immortalisierung) durch Erhaltung der Telomere (Shay und Bacchetti, 1997) z.B. durch Unterbindung des altersbedingten Abbaus der Telomere durch erhöhte Telomeraseaktivität (Bryan und Cech, 1999)
5. Induktion der Angiogenese, um die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sicher zu stellen (Hanahan und Folkman, 1996; Bouck et al., 1996)
6. Gewebeinvasion und Metastasierung durch Expression von gewebeabbauenden Proteasen wie z.B. Matrix-Metallo-Proteinasen (Coussens und Werb, 1996; Chambers und Matrisian, 1997) oder z.B. der Herabregulation von E-Cadherin als Suppressor für Invasion und Metastasierung (Christofori und Semb, 1999)
7. Erhöhung der Mutationsrate durch Genominstabilität und Mutationen (Negrini et al., 2010; Kinzler und Vogelstein, 1997; Salk et al., 2010)
8. Tumor-Promotion durch Entzündungsreaktionen, bei denen bioaktive Moleküle wie z.B. Wachstumsfaktoren, Überlebensfaktoren und proangiogenetische Faktoren sekretiert werden (Karnoub und Weinberg, 2006; DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Qian und Pollard, 2010)
9. Reprogrammierung und Modifikation des zellulären energetischen Metabolismus zur ausreichenden Energiegewinnung für die weitere Proliferation (Warburg, 1956; Warburg, 1956; Warburg, 1930)
10. Umgehung des Immunsystems zur Vermeidung der Zerstörung durch B- und T-Lymphozyten (u.a. (Teng et al., 2008; Kim et al., 2007; Yang et al., 2010; Shields et al., 2010; Mougiakakos et al., 2010; Ostrand-Rosenberg und Sinha, 2009))

Diese Eigenschaften entwickelt ein Tumor im Laufe seiner Entstehung bzw. sind für die Entstehung eines Tumors nötig (Abbildung 1.2).

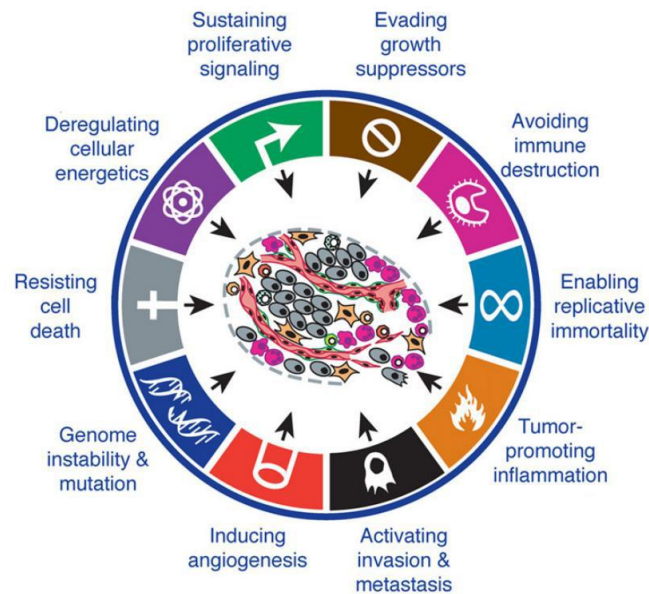


Abbildung 1.2: Die *Hallmarks of Cancer* nach Hanahan und Weinberg (Hanahan und Weinberg, 2011). Im Jahr 2000 wurden die sechs Schlüsseleigenschaften „Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren“, „Insensitivität der Zellen gegen Anti-Wachstumssignale“, „Umgehung der Apoptose“, „Induktion der Angiogenese“, „Unbegrenzt Replikationspotential“ und „Gewebeinvasion und Metastasierung“ zusammengefasst. Diese wurden 2011 erweitert durch die Eigenschaften „Umgehung des Immunsystems“, „Promotion durch Entzündung“, „Genominstabilität und Mutation“ und „Umprogrammierung des Metabolismus“, die zur Entstehung eines Tumors nötig sind. Abbildung übernommen von Hanahan und Weinberg (Hanahan und Weinberg, 2011).

Bei der Tumorentwicklung werden nach Weinberg drei Stufen unterschieden (Weinberg, 1989). Zunächst kommt es zur Tumorinitiation. Hierbei wird eine Körperzelle z.B. durch eine Mutation transformiert (Wagner und Müller, 2010). In der zweiten Phase, der Promotionsphase, wird das Tumorstadium durch Promotoren beschleunigt. Die Promotion ist reversibel und ein Tumor entsteht nur bei dauerhaftem Promotor-Stimulus (Foulds, 1954). Promotoren können mitogen wirksame Substanzen sein wie z.B. Chemikalien wie TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat E), Viren wie HBV oder HCV, Hormone aber auch Entzündungen und Entzündungsfaktoren wie z.B. der Tumornekrosefaktor (TNF) (u.a. (Weinberg, 2013). Nach Hanahan und Weinberg können Entzündungen auch vom Tumor selber ausgelöst werden und so zum weiteren Wachstum des Tumors beitragen (Hanahan und Weinberg, 2011). Dies mündet letztlich in der Tumorsektion mit weiter erhöhter Wachstumsgeschwindigkeit und Invasivität des Tumors (Weinberg, 1989).

Der Prozess der Tumorentstehung lässt sich nach dem Konzept der klonalen Expansion (Nowell, 1976; Wagner und Müller, 2010) auf eine einzige Zelle zurückführen. Hierbei verleiht ein initiales Ereignis wie z.B. eine zufällige Mutation einer Zelle einen Wachstumsvorteil. Dies ist der Ausgangspunkt für die Tumorentstehung. Sofern die Kontrollmechanismen des Wirtes es zulassen expandiert die Zelle zu einem Klon identischer Zellen. Diese Klone können durch weitere Ereignisse getroffen werden (Wagner und Müller, 2010). Dies führt wiederum zu einem Wachstumsvorteil und unter limitierenden Bedingungen zur Selektion der Zelle (Merlo et al., 2006; Wagner und Müller, 2010). Insbesondere

Selektionen auf Mutationen in Proto-Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Mutatorgenen (Merlo et al., 2006; Wagener und Müller, 2010) die wiederum zur veränderten Proteinexpression in der Zelle führen (Kondo, 2008) spielen bei der Entstehung von Krebs eine Rolle (Wagener und Müller, 2010).

Onkogene entstehen durch die Transformation von Proto-Onkogenen (Stehelin et al., 1976). Zu ihnen gehören u.a. Gene die für Tyrosinkinasen, FTP-Bindeprotein, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren kodieren (Brodeur, 1987) und viele Gene der Zellzykluskontrolle (Weinberg, 1994). Sie können u.a durch Mutationen, Duplikationen oder Amplifikationen aktiviert werden was zur Expression eines Proteins mit erhöhtem onkogenen Potential führt (Brodeur, 1987). Tumorsuppressorgene sind meist Gene der Zellzyklus-, Proliferations- und der Expressionskontrolle (Weinberg, 1991). Ihre Mutation und der daraus folgende Verlust des Proteins führt zu einer Fehlregulation der Apoptose und damit zur Proliferation der Zelle (Weinberg, 1991). Während eine Mutation in einem Proto-Onkogen dominant ist, ist die Mutation in Tumorsuppressorgenen rezessiv (Weinberg, 1994). Nach der 1971 von Knudson bewiesenen „*Two Hit Hypothese*“ (Nordling, 1953; Knudson, 1971), müssen Mutationen in Tumorsuppressorgenen beide Allele betreffen, wobei dies zeitversetzt geschehen kann. Auch müssen nicht beide Allele durch eine Mutation ausgeschaltet werden. Andere Faktoren wie die Methylierung von Tumorsuppressorgenen können ebenfalls zum Funktionsverlust der Gene führen (Herman und Baylin, 2003). Ein typisches Tumorsuppressorgene ist das Zellzyklussuppressorgen Retinoblastom. An diesem Beispiel konnten auch weitere Möglichkeiten des Ausschaltens von Tumorsuppressorgenen gezeigt werden: So können Gene, die für Retinoblastom-Protein (pRB) inhibierende Proteine wie z.B. CDK4/Cyclin D und CDK2/Cyclin E kodieren z.B. aufgrund von Mutationen im Promotorbereich überexprimiert werden. Diese Proteine phosphorylieren und inaktivieren dann das pRB. Auch die Expression von Onkoproteinen wie das humane Papilloma Virus Protein E7 kann zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens wie pRB führen, was zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle führt (Knudsen und Knudsen, 2006). Die gestörte Zellzykluskontrolle führt zur genetischen Instabilität. Genetische Instabilität führt zu einer erhöhten Mutationsrate und damit zu weiterer genetischer Instabilität welche wiederum zu erhöhter Mutationswahrscheinlichkeit führt (Loeb et al., 2003). Diese geht mit Wachstumsvorteilen, Selektion und fortschreitender Transformation der Zelle einher (Bishop, 1987; Weinberg, 1989).

1.3 Anatomie und Funktion der Prostata

Die humane Prostata ist etwa kastaniengroß und liegt zwischen dem Beckenboden und dem Harnblasengrund und umgibt die Urethra. Ihre hintere Fläche grenzt an den Mastdarm, über welchen sie mit dem Finger ertastet werden kann (Faller, 1999). Die Prostata ist ein Drüsenorgan, aus 30-50 verzweigten tubuloalveolären Einzeldrüsen (Paulsen und Lüllmann-Rauch, 2012), welche von einer derben Bindegewebskapsel umschlossen sind (Faller, 1999). Dieses Drüsengewebe der Prostata wird

unscharf in eine periphere, eine zentrale, und eine transitionale Zone (Abbildung 1.3) unterschieden (Faller, 1999).

Die tubuloalveolären Einzeldrüsen der Prostata münden in 15-30 Ausführgängen (*Ductuli prostatici*), welche letztlich in die Harnröhre münden (Faller, 1999). Jede Einzeldrüse besteht aus einem 2-reihigen Epithel, welches aus den Basalzellen und den kubischen bis zylindrischen sekretorischen luminalen Zellen sowie einzelnen neuroendokrinen Zellen besteht. Bisher nicht bewiesen aber vermutet wird eine Stammzellpopulation in der Basalschicht als Progenitorzellen für die Epithelzellen der Drüsen (Bonkhoff und Remberger, 1996; Hudson et al., 2000; Verhagen et al., 1992).

Die Drüsen sind umgeben von dem sog. Stroma, bestehend aus Kollagenfasern, die von glatter Muskulatur, Blut- und Lymphgefäßen durchzogen sind (Bucher und Wartenberg, 1997). Das Stroma enthält außerdem verschiedenste Zelltypen wie Fibroblasten, Lymphozyten, Macrophagen und Endothelzellen, sowie Nervenstrukturen (Sun et al., 2009). Weiterhin enthält das Stroma das für die Bildung des Dihydrotestosterons nötige Enzym 5-alpha-Reduktase (Bucher und Wartenberg, 1997), welches Testosteron in die aktive Form Dihydrotestosteron überführt. Die Muskelzellen des Stromas kontrahieren bei der Ejakulation und führen so zum Ausstoß des Ejakulats (Paulsen und Lüllmann-Rauch, 2012). Dieses leicht saure, milchig trübe und dünnflüssige Sekret enthält zahlreiche Enzyme wie z.B. saure Phosphatase, Immunglobuline, Spermin und Prostaglandine zur Stimulation des Uterus (Faller, 1999).

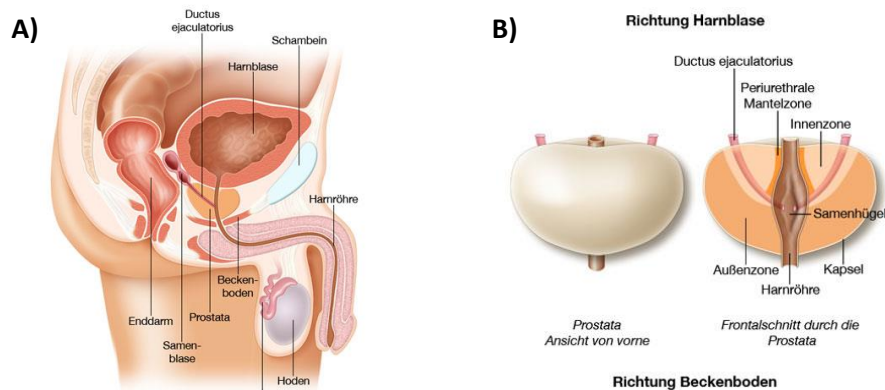


Abbildung 1.3: Lage (A) und Zoneneinteilung (B) der Prostata. Verändert nach Welsch, Schumacher, Aumüller und Netter (Welsch, 2010; Schumacher und Aumüller, 2004; Netter, 2006).

1.4 Das humane Prostatakarzinom

Biologisch und klinisch ist das humane Prostatakarzinom eine sehr heterogene, multifokale Erkrankung. Meistens entsteht das Prostatakarzinom als Adenokarzinom der Prostata ausgehend von den Prostatadrüsen, bzw. den Epithelzellen der Drüsen (Aygun, 1997). Hierbei entwickeln sich 68 % der Karzinome in der peripheren Zone, 24 % in der zentralen Zone und nur 8 % der Karzinome in der transitionalen Zone der Prostata (McNeal et al., 1988). Wesentlich seltener als das Adenokarzinom,

welches 90 % aller Prostatakarzinome ausmacht, kommen neuroendokrine Tumore, Urothelkarzinome, Plattenepithelkarzinome und kleinzellige Prostatakarzinome vor (Aygün, 1997). Diese haben auch eine deutliche schlechtere Prognose mit einer Überlebenszeit von durchschnittlich einem Jahr (Aygün, 1997).

Auch wenn die meisten Männer im Laufe ihres Lebens, irgendwann ein Prostatakarzinom entwickeln werden, versterben doch die wenigsten Männer an diesem Karzinom (Abbildung 1.4). So weisen je nach Herkunftsland zwischen 30,9 % (Griechenland) und 83 % (weiße Amerikaner) der Männer im Alter von 71 bis 80 Jahren bei Autopsien ein Prostatakarzinom auf, ohne dass sie an diesem verstorben sind (DeLongchamps et al., 2006). Im Alter von 80 bis 90 Jahren kann sogar bei 80 % aller autopsierten Afro-amerikanischen und kaukasischen Männern ein Prostatakarzinom nachgewiesen werden (Sakr et al., 1996). Dennoch sterben die meisten Männer aus einem anderen Grund als dem diagnostizierten Prostatakarzinom (Thompson et al., 2007).

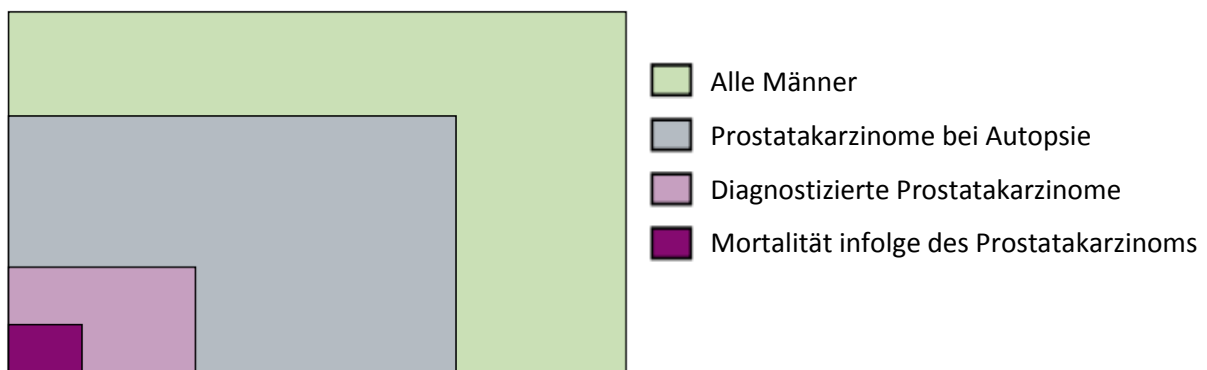


Abbildung 1.4: Verhältnis der Prävalenz des Prostatakarzinoms bei Autopsie im Vergleich zu klinisch diagnostizierten Prostatakarzinomen und Mortalität des Prostatakarzinoms. Verändert nach Damber und Aus (Damber und Aus, 2008).

Dies liegt daran, dass Krebs eine heterogene Masse neoplastischer Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften und damit auch mit unterschiedlicher metastatischer Aktivität ist (Lapointe et al., 2004; Shaffer und Pandolfi, 2006; Tomlins et al., 2007), wobei der metastatische Phänotyp des Prostatakarzinoms auch erst im Laufe der Zeit durch Veränderungen der Genexpression erworben werden kann (Klein, 2008; Chung et al., 2005). Besonders gefährdet ein klinisch relevantes Prostatakarzinom mit metastatischem Phänotyp zu entwickeln, sind dabei Patienten mit einem so genannten „*high risk prostate cancer*“, d.h. Patienten, deren Prostatakarzinome einen Gleason Score von 8 oder höher aufweisen, deren klinisches Stadium T2c oder höher ist (siehe Kapitel 1.4.4 Histologie und Stadieneinteilung des humanen Prostatakarzinoms) sowie Patienten, bei denen der initiale PSA (prostata-spezifisches Antigen)-Werte (siehe Kapitel 1.5.1.1 Prostataspezifisches Antigen (PSA)) über 20 ng/ml beträgt (D'Amico et al., 1998).

Dabei ist die Pathophysiologie der Prostatakarzinomentwicklung bis heute schlecht verstanden (Hsing und Chokkalingam, 2006). Sicher ist allerdings, dass das Prostatakarzinom eine sehr lange Historie hat. Unbehandelt stellt sich das Prostatakarzinom oft für 10 - 15 Jahre und länger indolent dar (Johansson et al., 2004), wobei viele Karzinome „insignifikant“, also klinisch ohne Relevanz bleiben. Andere Prostatakarzinome sind von Beginn an klinisch signifikant oder entwickeln sich über die Zeit zu klinisch signifikanten Prostatakarzinomen (Bastian et al., 2009; Klein, 2008). Dem Prostatakarzinom voraus geht vermutlich eine so genannte „*High grade* intraepitheliale Neoplasie“ (*high grade* PIN, HG PIN), welche sich dann zum Karzinom weiter entwickelt (McNeal und Bostwick, 1986; Ashida et al., 2004; Montironi et al., 2011). Diese Theorie wird allerdings kontrovers diskutiert (DeMarzo et al., 2003; Sakr et al., 1993), da nicht jedes Prostatakarzinom im Frühstadium eine PIN aufweist (Sakr et al., 1993; Montironi et al., 2002) und umgekehrt einige genetische Marker der PIN nicht in Prostatakarzinomen vorkommen (Emmert-Buck et al., 1995). Dennoch weisen das Prostatakarzinom und die PIN viele gemeinsame genetische Veränderungen auf (Qian et al., 1999). So ist insbesondere die Genexpression von *high grade* PIN denen des Prostatakarzinoms sehr ähnlich, so dass Ashida et al. davon ausgehen, dass zumindest einige *high grade* PIN direkte Vorläuferläsionen des Prostatakarzinoms sind (Ashida et al., 2004; Montironi et al., 2011).

Beim manifesten Prostatakarzinom spielt die Mikroumgebung des Tumors und der Tumor-Epithelzellen eine entscheidende Rolle (Chung et al., 2005). So beeinflusst die Interaktion zwischen Tumorzellen und Integrinen der Extrazellulärmatrix (ECM) die Zellpolarität, Sekretion, Adhäsion, Motilität, Invasion, Proliferation und Differenzierung. Aber auch die ECM interagiert direkt mit den Tumorzellen, wobei noch unklar ist, ob die Invasion des Prostatakarzinoms vor oder nach der Interaktion mit dem Tumor beginnt. Weiterhin beeinflussen lösliche Faktoren in der Mikroumgebung des Tumors sein Verhalten. So wird z.B. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) androgen reguliert, sekretiert und führt zur Vaskulogenese. Interleukin-6 Sekretion durch Fibroblasten und Muskelzellen führt zur Liganden-unabhängigen Aktivierung des Androgenrezeptors, was im weiteren Verlauf der Erkrankung zur Androgen-unabhängigen Progression des Tumors führt. *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) fördert zumindest im Mausmodell die neoplastische Transformation des Epithels (Chung et al., 2005).

Außerdem spielen beim Prostatakarzinom Hormone eine entscheidende Rolle. So konnten Huggins et al. bereits 1941 zeigen, dass das Prostatakarzinom eine Hormon-gesteuerte Neoplasie und damit abhängig von Androgenen ist (Huggins und Hodges, 1972; Huggins et al., 1941). Als Folge dieser Arbeit wurden die Anti-Androgentherapien entwickelt, die bis heute beim rezidivierenden Prostatakarzinom die Therapie der Wahl sind (Alva und Hussain, 2013).

1.4.1 Epidemiologie des humanen Prostatakarzinoms

Einer von 11 Männern in Europa und Nordamerika wird im Laufe seines Lebens die Diagnose Prostatakarzinom erhalten und 3 % der Männer werden als direkte Folge der Erkrankung versterben (Masters, 2011). Im Jahr 2008 erkrankten alleine in Deutschland 63.400 Männer an einem Prostatakarzinom (RKI, 2012). Dabei ist die altersstandardisierte Erkrankungsrate seit 1999 um 25 % gestiegen, der absolute Anstieg betrug sogar 50 % (RKI, 2012). Für das Jahr 2012 wird mit 67.000 Neuerkrankungen gerechnet (RKI, 2012). 2008 verstarben 12.000 Patienten an ihrem Karzinom. Damit ist das Prostatakarzinom die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern, wobei die altersstandardisierte Sterberate in Deutschland mit ca. 20 Todesfällen je 100.000 Männern relativ konstant bleibt und seit 2003 sogar leicht rückgängig ist (Kraywinkel et al., 2012; Avances et al., 2001). Seit 1980 ist ein stetiger Anstieg der jährlichen Neuerkrankungsfälle bei über 45-jährigen in Deutschland zu beobachten (RKI, 2010). Dies ist vor allem auf die gesteigerte Lebenserwartung zurückzuführen, da überwiegend Männer über 70 Jahre vom Prostatakarzinom betroffen sind (Bertz 2012). Aber auch aktuelle Screeningmaßnahmen zeigen hier ihre Wirkung. So ist der statistische Anstieg der Erkrankungsrate bei gleichbleibender Sterberate vor allem auf den Einsatz des PSA Tests in allen westlichen Industrienationen zurückzuführen (RKI, 2007). Damit einher geht auch ein Absinken des mittleren Erkrankungsalters von 73 Jahren 1990 auf 70 Jahre (Kraywinkel et al., 2012).

Lag die 5-Jahres-Überlebensrate für das Prostatakarzinom 2000-2004 noch bei lediglich 87 % (RKI, 2010) so beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland zurzeit 92 % (RKI, 2012). Diese Verbesserung im Überleben, ist auf die Vorverlagerung der Diagnose durch Screenings und den PSA-Test zurückzuführen (RKI, 2012; RKI, 2012; Labrie et al., 2004). Daher werden heute 26 % aller Karzinome im Stadium T1 oder T2 diagnostiziert. Nur 3 % aller Karzinome werden im weit fortgeschrittenen Stadium T4 diagnostiziert.

1.4.2 Risikofaktoren für das humane Prostatakarzinom

Der Hauptrisikofaktor für das Prostatakarzinom ist das Alter (Hankey et al., 1999; Gann, 2002; Patel und Klein, 2009). So liegt das Risiko eines 40-jährigen Mannes in Deutschland in den nächsten 10 Jahren an einem Prostatakarzinom zu erkranken bei 0,1 %. Das Risiko eines 70 jährigen Mannes in Deutschland in den nächsten 10 Jahren an einem Karzinom zu erkranken beträgt hingegen 6,6 % (RKI, 2012). Aber auch eine genetische Prädisposition spielt vermutlich vor allem bei jüngeren Erkrankten eine Rolle (Mitra et al., 2008; Liede et al., 2004; Bratt, 2002). So scheinen die Gene HPC1, ELAC2, MSR1, PCAP, HPCX, CAPB und HPC20 eine Rolle im familiären wie auch im sporadischen Prostatakarzinom zu spielen (Troyer et al., 2004). Außerdem scheinen Mutationen in den bei der Entstehung von Brustkrebs bekannten Genen BRCA1 und BRCA2 auch einen Einfluss auf die Entstehung des Prostatakarzinoms zu haben (Gayther et al., 2000). Die Rolle der genetischen Prädisposition wird auch durch die Häufung von Krebsfällen in

verschiedenen Ethnien validiert (Ben-Shlomo et al., 2008; Bratt, 2002). So haben dunkelhäutige Amerikaner eine um 15 % erhöhte Wahrscheinlichkeit an einem Prostatakarzinom zu erkranken wie nicht-hispanische weiße Amerikaner (Hoffman et al., 2001). Als weitere Risikofaktoren werden die Ernährung (Chan und Giovannucci, 2001; Chan et al., 2001) insbesondere fettreiche Ernährung (Gronberg, 2003; Sreekumar et al., 2004), regelmäßiger Alkoholkonsum (Sawada et al., 2014), Übergewicht (Calle et al., 2003; Strom et al., 2005) und Bewegungsmangel diskutiert (Anzuini et al., 2011). Ein Einfluss der Vitamin-D-Verfügbarkeit auf das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken – wie bei anderen Krebsarten bereits bekannt – wird ebenfalls als Risikofaktor diskutiert (Hollis et al., 2013; Garland et al., 2009). Weiterhin wird der Testosteronspiegel als ein möglicher Risikofaktor für das Prostatakarzinom diskutiert (Huggins und Hodges, 2002), während spätere Studien diesen Zusammenhang nicht mehr belegen konnten (Roddam et al., 2008). Bis heute ist daher nicht eindeutig klar, ob der Testosteronspiegel einen Risikofaktor für das humane Prostatakarzinom darstellt oder nicht (Grossmann und Wittert, 2012). Allerdings scheinen Androgene maßgeblich die Progression des Prostatakarzinoms zu beeinflussen (Bostwick et al., 2004), so dass das Robert Koch Institut heute davon ausgeht, dass das Prostatakarzinom ohne Testosteron nicht entstehen würde, und Testosteron daher als einen Hauptrisikofaktor für das Prostatakarzinom ansieht (RKI, 2012).

1.4.3 Diagnose des humanen Prostatakarzinoms

Die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms wird heute meist aufgrund eines positiven Biopsiebefundes gestellt nach einem positiven Tastbefund bei der digital-rektalen Untersuchung (DRE) und/oder der Befund eines erhöhten PSA-Wertes im Rahmen des PSA-Screenings.

In Deutschland werden die digital-rektale Untersuchung sowie eine Untersuchung der äußeren Geschlechtsorgane als Früherkennungsmaßnahme für Männer über 45 Jahren 1 x jährlich angeboten. Die Kosten hierfür werden von den Krankenkassen übernommen. Das sogenannte PSA-Screening ist hingegen nicht Teil des gesetzlichen Früherkennungsprogramms und muss vom Patienten selber bezahlt werden (Kraywinkel et al., 2012). Dies ist vor allem auf den umstrittenen Nutzen des PSA Screenings zurückzuführen (siehe Kapitel 1.5 Potentielle Biomarker für das humane Prostatakarzinom). Dennoch nutzen in Deutschland 2/3 der Männer die angebotenen Krebsfrüherkennungsprogramme, wobei 46 % der Männer sogar einen PSA Test und die DRU regelmäßig durchführen lassen (Sieverdinga et al., 2008). Der histopathologische Befund der bei Verdacht (erhöhter PSA-Wert, positiver Tastbefund) durchgeführten Stanzbiopsie ist heute der noch immer verwendete „Gold-Standard“ der Diagnose. Hierbei werden mindestens 10 - 12 Biopsiestanzen aus der Prostata entnommen (DGU, 2011). Der histopathologische Befund der Stanzbiopsie ist auch ausschlaggebend für die weitere Behandlung, wobei weder der histopathologische Befund, noch der Serum-PSA-Wert oder die digital-rektale Untersuchung eine genügend hohe Spezifität aufweisen (Stamey et al., 2004; Hsu et al., 2006; Chen et

al., 2011). Selbst der histopathologische Befund vermag in vielen Fällen keine Aussage über die klinische Signifikanz, wie z.B. die Tumorprogression zu treffen (siehe Kapitel 1.4.5 Prognose und Prädiktion des humanen Prostatakarzinoms).

1.4.4 Histologie und Stadieneinteilung des humanen Prostatakarzinoms

Bei der Diagnose des Prostatakarzinoms erfolgt ein so genanntes „Staging“, bei dem der Tumor in Stadien eingeteilt wird. Das „Staging“ erfolgt beim Prostatakarzinom nach dem „TNM“-System der UICC (Union Internationale contre le Cancer) und dem Gleason-Score. Mittels „TNM“-System werden die Tumorgöße (T), der Nodal-Status (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) begutachtet (siehe Tabelle 1.1). Der Differenzierungsgrad des Tumors (G) wird in vielen Tumoren histopathologisch durch das so genannte „Grading“ bestimmt (Wittekind C, 2005). Dabei spielen die Mitoserate, die Kernpleomorphien und die Tubulusbildung eine entscheidende Rolle (Elston und Ellis, 1991). Im Prostatakarzinom spielt der Gleason-Score (siehe unten) allerdings eine größere Rolle als das klassische „Grading“. Im Falle einer Prostatektomie werden diese Angaben zusätzlich durch die Angabe über das Vorhandensein von Resttumorgewebe im Patienten ergänzt, wobei R0 bedeutet, dass die Absetzungsränder negativ sind (tumorfrei) und sich kein Resttumor im Patienten befindet, während R1 bedeutet, dass positive Resektionsränder mit mikroskopischem Tumorrest im Patienten vorliegen. R2 bedeutet makroskopische Tumorreste im Patienten.

Tabelle 1.1: Klassifikation des Prostatakarzinoms nach dem TNM-System (Gumpp und Henß, 2010).

Stadium	Beschreibung
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Zufälliger histologischer Befund in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Zufälliger histologischer Befund in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung
T3b	Tumor infiltrierte die Samenblasen
T4	Tumor ist fixiert oder infiltrierte andere benachbarte Strukturen als Samenblasen
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachweisbar
M1a	Fernmetastasen in nicht-regionären Lymphknoten
M1b	Fernmetastasen in den Knochen
M1c	Fernmetastasen in anderen Organen und/oder Strukturen

Der Gleason-Score beim Prostatakarzinom wurde 1974 entwickelt. Er gibt den Differenzierungsgrad des Tumors an (Gleason und Mellinger, 1974). Dazu wird den Tumorzellen am Hämatoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnitt je nach Differenzierungsgrad ein Wert von eins bis fünf zugeordnet. Gut differenzierte Tumorzellen erhalten dabei den Wert eins, völlig undifferenzierte Zellen den Wert fünf (Abbildung 1.5). Anschließend werden die Werte des dominanten und des am zweithäufigsten auftretenden Musters addiert. Damit kann der Gleason-Score einen Summenwert von 2 (1+1) bis 10 (5+5) annehmen. Tumore mit einem Gleason-Score bis vier gelten dabei als gut differenzierte Tumore. Gleason-Scores von acht oder höher beschreiben hingegen schlecht differenzierte Tumore (Humphrey,

2004; Epstein, 2010). Hohe Gleason-Scores korrelieren dabei mit fortgeschrittenen Tumoren (Gleason, 1992).

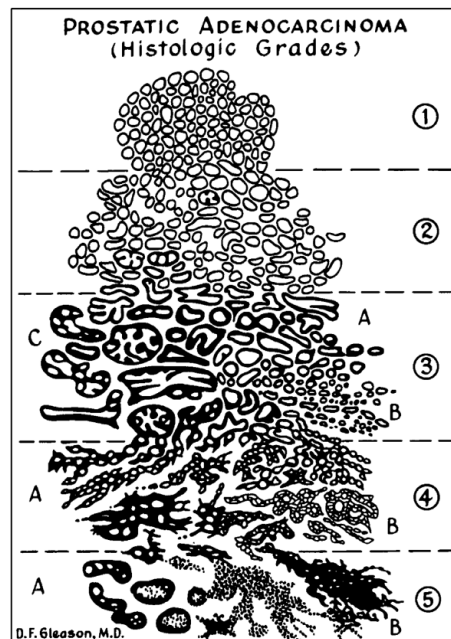


Abbildung 1.5: Histologische Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms nach Donald F. Gleason. Der so genannte Gleason-Score gibt den Differenzierungsgrad der Zellen an. Ein höherer Gleason-Score bedeutet, dass die Zellen weniger stark differenziert vorliegen. Verändert nach Humphrey (Humphrey, 2004).

1.4.5 Prognose und Prädiktion des humanen Prostatakarzinoms

Derzeit basiert die Vorhersage der Progression des humanen Prostatakarzinoms auf klinischen Parametern. Klinische Daten wie z.B. der präoperative Serum-PSA-Wert, der Gleason Score und die Ausbreitung des Tumors (Anzahl der positiven Biopsien und Anteil des Tumorgewebes pro positivem Biopsiescore bzw. klinisches Stadium des Tumors) werden als prognostische Indikatoren in so genannten Nomogrammen zusammengefasst. Diese Nomogramme sollen dann die Voraussage des Krankheitsverlaufs unterstützen (Bangma et al., 2009). Allerdings haben postoperative Nomogramme lediglich eine Treffsicherheit von 75 bis 85 %. Die Genauigkeit präoperativer Nomogramme liegt sogar nur bei ca. 70 % (Hinev et al., 2011; Guazzoni et al., 2011).

Außerdem entstanden fast alle heute angewendeten Nomogramme durch retrospektive *single center* Studien einzelner Patientenkohorten, bei denen nur selten eine externe Validierung erfolgte und kaum prospektive Evaluierung in der täglichen klinischen Routine durchgeführt wurde. Demnach ist die Vertrauenswürdigkeit der Nomogramme in einer generellen Population häufig unbewiesen (Heidenreich et al., 2011). Folglich sind Nomogramme, die den Tod durch das Prostatakarzinom oder die Metastasierungswahrscheinlichkeit durch klinische Parameter bestimmen wollen, sehr limitiert (Porter et al., 2006; Ploussard et al., 2011; Avances et al., 2001).

Da die Nebenwirkungen einer Prostatektomie gravierend sein können (erektile Dysfunktion, Harninkontinenz, Leistenbruch), wird entsprechend einer Risikoabschätzung (Risiko der Nebenwirkungen vs. Risiko eines kürzen Lebens (Vickers et al., 2012)) über eine aktive Überwachungsstrategie bei indolenten Karzinomen diskutiert. Hierbei besteht die Möglichkeit einer verzögerten kurativen Behandlung, sobald dies aufgrund von Veränderungen des Prostatakarzinoms nötig wird. Andernfalls wird auf eine Behandlung des Karzinoms verzichtet. Eine skandinavische Studie zeigt allerdings, dass Patienten, welche sich einer Prostatektomie unterzogen haben, einen Überlebensvorteil hatten im Vergleich zu einer Patientengruppe, welche aktiv überwacht wurde (Hegarty et al., 2010). Dieselbe Studie zeigt weiterhin, dass nur einer von 19 behandelten Männern einen Überlebensvorteil hat. In einer weiteren Studie war eine Fallzahl von 1055 *gescreenten* und 37 behandelten Männern notwendig, um einen Prostatakarzinom-spezifischen Tod zu vermeiden (Schroder et al., 2009). Demnach ist bis heute die Prognose und Prädiktion des Prostatakarzinoms schwierig und die Entscheidung über die Therapieform durch unzureichend vorhandene Einteilungskriterien kritisch. Weder der histopathologische Befund (Gleason, T-Stadium) noch irgendeine andere Diagnostik lassen eine sichere Aussage über die zu erwartende Tumorprogression oder ein postoperatives Rezidiv zu. Entsprechend werden dringend neue Biomarker für Diagnose und Prognose des humanen Prostatakarzinoms benötigt.

1.4.6 PSA-Rezidiv-, Rezidiv- und Metastasenentwicklung beim humanen Prostatakarzinom

Die Therapie des humanen Prostatakarzinoms richtet sich nach dem Stadium des Karzinoms. Grundsätzlich stehen die Prostatektomie, die Radiatio (Bestrahlung), eine Antihormonelle Therapie sowie eine Behandlung mit sog. *Seeds* (Brachytherapie; Implantation von radioaktiv (meist mit Jod-125) geladenen, wenige Millimeter großen Metallstiften) zur Verfügung. Weiterhin wird das sog. *Active surveillance* als Option angeboten. Das Risiko einer Rezidiventwicklung sowie die Überlebenswahrscheinlichkeiten von Patienten unterscheiden sich abhängig von der gewählten Therapieform. Meist erfolgt die Behandlung durch radikale Prostatektomie mit oder ohne Lymphadenektomie der Beckenlymphknoten (Heidenreich et al., 2011).

Ca. 1/3 aller prostatektomierten Patienten entwickeln im weiteren Verlauf ihrer Erkrankung ein biochemisches Rezidiv (Han et al., 2001; Roberts et al., 2001). Hierbei handelt es sich um einen Anstieg des PSA-Wertes nach der Prostatektomie ohne klinischen Nachweis von tumorösem Gewebe. Dabei ist die Definition des biochemischen Rezidivs in der Literatur nicht einheitlich. So werden je nach Autor PSA-Werte über 0,2 ng/ml bzw. 0,4 ng/ml als PSA-Rezidiv definiert (Rauchenwald et al., 2010). Das progressionsfreie Überleben variiert je nach Definition des biochemischen Rezidivs zwischen 63 % und 79 % im 10-Jahres *follow-up* (Stephenson et al., 2006). Risikofaktoren für ein biochemisches Rezidiv sind initialer PSA > 15 ng/ml, pT3a oder höheres Stadium, Samenblaseninvasion, Lymphknotenbefall und

Gleason ≥ 8 , sowie ein positiver Resektionsrand (Rauchenwald et al., 2010). Das biochemische Rezidiv, auch PSA Rezidiv, PSA Progress, biochemische Progression oder biochemisches Versagen genannt, geht dem klinischen Progress 6-48 Monate voraus (Lange et al., 1989) und ist mind. 9-12 Monate vor bildgebenden Verfahren positiv.

Biochemische Rezidive entstehen durch erneut wachsende Prostatakarzinomzellen, welche nach der primären Therapie (Prostatektomie, Radiatio, ...) übrig geblieben sind. Diese übrig gebliebenen Karzinomzellen wachsen entweder innerhalb oder nahe der ursprünglichen Prostata-drüse oder aber bereits in entfernten Arealen des Körpers (Metastasen). Dabei spielen biologische und molekularbiologische Eigenschaften des Karzinoms eine entscheidende Rolle beim Verhalten des Karzinoms. So konnten Singh et al. 2002 zeigen, dass eine Singnatur aus 5 Genen (Chromogranin A, *Platelet Derived Growth Factor Receptor β* (PDGFR β), Homeobox Protein Hox-C6 (HOXC6), Insotiol Triphosphat Receptor 3 (IPTR3) und Sialyltransferase-1) signifikant mit *High grade* Prostatakarzinomen assoziiert ist (Singh et al., 2002).

Ein biochemisches Rezidiv kann zunächst noch mit Anti-Androgenen behandelt werden. Im späteren Verlauf entwickelt sich allerdings in 100 % der Fälle eine Anti-Androgen Resistenz (Sharifi et al., 2005). Die Zeitspanne zwischen dem Start der Anti-Androgen Behandlung eines biochemischen Rezidivs und der Anti-Androgen Resistenzentwicklung liegt dabei meist zwischen 14 und 20 Monaten (Sharifi et al., 2005). Auf molekularbiologischer Ebene kommt es bei der Entwicklung einer Anti-Androgen Resistenz zur Genamplifikation und Überexpression des Androgenrezeptors (Ford et al., 2003; Linja et al., 2001; Visakorpi et al., 1995), Überexpression, Aktivierung oder Akkumulation von Androgen-Rezeptor Coaktivatoren (Gregory et al., 2001; Halkidou et al., 2003; Gregory et al., 2004) und/oder zu erhöhter Expression von Enzymen der Steroid-Genese (Labrie et al., 1993). Weiterhin kann es zur Sensibilisierung des Androgenrezeptors oder Transaktivierung des Androgenrezeptors durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren auch in Abwesenheit von Androgenen, zu intratumoraler *de novo* Synthese von Testosteron und Dihydrotestosteron, zur Umgehung des Androgenrezeptor (AR) Singalwegs (Bonkhoff und Berges, 2010) oder auch zur Entstehung von konstitutiv aktiven AR-Splice-Varianten (Sun et al., 2010) kommen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung entwickelt sich in nahezu 100 % der Fälle ein klinisch manifestes Rezidiv (Lange et al., 1989). An diesem sowie der mit dem klinisch manifesten Rezidiv einhergehenden Metastasenentwicklung versterben die Patienten in der Regel (Pound et al., 1999; Slovin et al., 2005). Beim Prostatakarzinom kommt es zunächst zur lymphogenen, später auch zur hämatogenen Ausbreitung des Karzinoms. Bei der hämatogenen Ausbreitung kommt es vor allem zu osteoblastischen Metastasen in Lendenwirbelsäule, proximalem Femur, Becken, thorakaler Wirbelsäule, Rippen, Sternum, dem Schädeldach (Kalotte) und den Oberarmknochen (Humerus). Hierbei kommt es zunächst zur lokalen Invasion, dann zur Intravasation, zum Transport über das Blut, zur Extravasation und schließlich zum Überleben und zur Proliferation im Zielgewebe (Loberg et al., 2005). Beim

Prostatakarzinom ist vor allem die schmerzhafteste Metastasierung in Knochen zu beobachten (Logothetis und Lin, 2005). Andere Organe wie Lunge und Leber sind nur selten von der Metastasierung betroffen (Wolff und Altwein, 2004). Die fortschreitende Zerstörung der Gewebe durch die Ausbreitung der Metastasen führt über die Funktionseinschränkung des Gewebes zum Funktionsverlust und letztlich zum Tod des Patienten. Die PSA Verdopplungszeit ist der derzeit stärkste prognostische Faktor für das Auftreten von Fernmetastasen und Mortalität (Pound et al., 1999; Maffezzini et al., 2007).

Um die aggressiven Tumore von den nicht rezidivierenden/metastasierenden Tumoren zu einem frühen Zeitpunkt (bestenfalls noch vor der Prostatektomie) unterscheiden zu können, ist ein valider Biomarker nötig. Dieser ist bisher noch nicht vorhanden. Die Identifikation solcher Biomarker ist ein dringendes Problem der Prostatakarzinomforschung.

1.5 Potentielle Biomarker für das humane Prostatakarzinom

Biomarker sind messbare Indikatoren, die Rückschlüsse auf den biologischen Status eines Patienten zulassen. Hierbei werden diagnostische, prognostische und prädiktive Biomarker unterschieden. Diagnostische Biomarker lassen Rückschlüsse auf eine Diagnose des Patienten zu, d.h. ob ein Karzinom vorhanden ist oder nicht. Prognostische Biomarker geben Hinweise darauf, wie die Prognose des Patienten ist und wie ein möglicher Krankheitsverlauf aussieht, während mit prädiktiven Biomarkern versucht wird, das Ansprechen auf eine Therapie vorauszusagen (Brünner, 2009).

Nach Ludwig et al. müssen potentielle neue Biomarker grundsätzlich spezifisch und sensitiv sein (Ludwig und Weinstein, 2005). Zur Detektion der Biomarker muss eine schnelle Methode, welche geringe Kosten verursacht, vorhanden sein, wobei die inter- und intralaboralen Schwankungen nur gering sein dürfen. Außerdem muss ein potentieller neuer Biomarker zusätzliche Informationen im Vergleich zu vorhandenen klassischen Biomarkern liefern (Ludwig und Weinstein, 2005). Ein idealer Biomarker wird spezifisch durch einen Tumor oder seine Vorläuferzellen synthetisiert und schon in frühen Stadien in die Zirkulation (Blut) eingespeist (Troyer et al., 2004).

1.5.1 Potentielle Biomarker für die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms

1.5.1.1 Prostataspezifisches Antigen (PSA)

Der wichtigste Biomarker für die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms ist das heute teilweise zum Screening des Prostatakarzinoms eingesetzte Prostataspezifische Antigen (PSA, Kallikrein-3, Semeneogelase). PSA ist ein 27kDa großes Glykoprotein mit Proteasefunktion. Produziert wird PSA durch sekretorische Zellen der Prostata Acini, wobei es als Pro-Enzym mit einer zusätzlichen 7-Aminosäuren-Peptidkette freigesetzt wird (Mikolajczyk et al., 2000). Bei der Sekretion ins Lumen spaltet Kallikrein 2 das Propeptid ins aktive und reife PSA. Im Blutstrom findet sich überwiegend durch

Proteolyse inaktiviertes freies PSA. Aktives PSA im Blutstrom wird durch Protease-Inhibitoren gebunden (Chen et al., 1997).

Der PSA-Wert hat heute seine unumstrittene Berechtigung in der Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms (vgl. Kapitel 1.4.6 PSA-Rezidiv-, Rezidiv- und Metastasenentwicklung beim humanen Prostatakarzinom). Für die Diagnose des Prostatakarzinoms ist der PSA-Wert allerdings ein ausgesprochen umstrittener Marker (Andriole et al., 2009; Schroder et al., 2009; Sandblom et al., 2011; Chou et al., 2011). So gilt der PSA-Wert heute als Biomarker für eine vergrößerte Prostata, unabhängig von der Ursache der Prostatavergrößerung (Bickers und Aukim-Hastie, 2009). Interessanterweise wird PSA nicht nur in der Prostata sondern auch im Endometrium, Brustgewebe und Nierengewebe gebildet. Damit ist der PSA-Wert weder gewebe- noch geschlechtsspezifisch (Zaviacic, 1997).

Der PSA-Wert ist nicht nur beim Prostatakarzinom erhöht, sondern kann ebenfalls bei der benignen Prostata Hyperplasie (BPH) sowie Entzündungen und Infektionen erhöht sein (Gumus et al., 2004; Hochreiter, 2008; Thorpe und Neal, 2003). Zusätzlich haben manche Patienten mit malignen Läsionen normale PSA-Werte (Tornblom et al., 1999). So haben 70 % der Männer mit einem PSA-Wert zwischen 4 und 10 ng/ml kein Prostatakarzinom, während bei 5 % der Männer mit einem PSA unter 0,5 ng/ml und sogar bei 30 % der Männer mit einem PSA zwischen 3 und 4 ng/ml ein Prostatakarzinom nachweisbar ist (Thompson et al., 2004).

Dennoch ist der PSA-Wert bis heute der einzige Biomarker zur Diagnose des humanen Prostatakarzinoms und wird teilweise als PSA Screening angeboten. Dabei können die Parameter des totalen PSA-Wertes, des freien PSA und des gebundenen (komplexen) PSA erhoben werden. Im Rahmen des PSA-Screenings wird in der Regel der Gesamt-PSA-Wert gemessen. In mehreren großen Studien wurde in den letzten Jahren versucht, die Effizienz des PSA Screenings zu validieren. Dabei gibt es nur drei vertrauenswürdige Studien zu diesem Thema, da weitere Studien häufig nicht randomisiert und damit nicht vertrauenswürdig durchgeführt wurden (Vickers et al., 2012). Bei diesen vertrauenswürdigen Studien handelt es sich um die *US Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial* (PLOC), die *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC) und die Göteborg Studie, wobei letztgenannte später Teil der ERSPC Studie wurde (Vickers et al., 2012). Unter diesen Studien weist die Göteborg Studie die längste Follow-up-Zeit und auch den größten positiven Effekt des Screenings auf, gefolgt von der ERSPC Studie, welche eine signifikante Reduktion der Prostatakarzinom spezifischen Mortalität (Risk Ratio (RR) 0.84, 95 %; Konfidenzintervall (CI) 0.73 to 0.95, 15 Jahre Follow-up) angibt (Vickers et al., 2012; Schroder et al., 2009).

Die PLOC Studie weist lediglich eine 10-jährige Follow-Up-Zeit auf und zeigt keinen positiven Effekt des PSA-Screening auf das Überleben der Männer mit Prostatakarzinom (RR 1.15, 95 % CI 0.86 to 1.54) (Andriole et al., 2009). Nach Vickers et al. weist allerdings insbesondere die PLOC Studie einige Defizite auf (Vickers et al., 2012). So hatten 45 % der teilnehmenden Männer bereits an einem PSA-Screening in

den letzten drei Jahren vor Beginn der Studie teilgenommen. Damit sind Risikopatienten oft nicht in der Studienpopulation enthalten, da sie vorher schon aussortiert wurden. Ein indirekter Beweis hierfür findet sich in der ERSPC Studie, in der doppelt so viele Erkrankungsfälle wie in der PLOC Studie auftraten. Damit ist die statistische Power der PLOC Studie limitiert (Vickers et al., 2012). Außerdem haben 40-50 % der Männer, die eigentlich der Nicht-Screening-Gruppe der PLOC Studie zugeteilt waren, dennoch ein PSA-Screening vornehmen lassen, im Vergleich zu nur 15 % der Männer der Nicht-Screening-Gruppe der ERSPC Studie (Schroder et al., 2009). Eine Metastudie, die neben der PLOC und der ERSPC Studie drei weitere Studien zum PSA Screening eingeschlossen hat, kommt zu dem Ergebnis, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Prostatakrebs-spezifischen Mortalität bei Männern mit und ohne PSA-Screening gibt (RR 1.00, 95 % CI 0.86 to 1.17) (Ilic et al., 2013). Aufgrund der Vielzahl der sich teilweise widersprechenden Studien zum PSA-Screening ist bis heute keine eindeutige Aussage über den Nutzen des PSA Screenings möglich (Vickers et al., 2012).

1.5.1.2 Weitere potentielle Biomarker für die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms

Aufgrund der Unspezifität des PSA-Wertes bei der Diagnose des humanen Prostatakarzinoms (Vergl. Kapitel 1.2.1.1 Prostataspezifisches Antigen (PSA) als potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom) wird intensiv an neuen potentiellen Biomarkern für die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms geforscht. Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) ist dabei eines der Proteine, das als potentiell neuer Biomarker für die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms beschrieben wird. AMACR ist in 80 % bis 100 % der Prostatakarzinomgeweben überexprimiert (Magi-Galluzzi et al., 2003), wobei andere Studien an 137 Prostatakarzinompatienten und 70 benignen Prostatagewebeproben eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 88 % angeben (Jiang et al., 2001). Dabei ist AMACR im Prostatakarzinom bis zu 9-fach hochreguliert im Vergleich zu Normalgewebe (Luo et al., 2002). Diese Überexpression ist auch auf mRNA-Ebene nachweisbar (Xu et al., 2000) sowie im Gewebe an Prostatabiopsiestanzen mit einer Sensitivität von 97 % und einer Spezifität von 100 % (Rubin et al., 2002). Im Serum erreicht AMACR allerdings nur eine Sensitivität von 78 % und eine Spezifität von 81 % (Sreekumar et al., 2004), während die Detektion von AMACR mittels Western Blot im Urin zwar eine Sensitivität von 100 %, aber lediglich eine 58 %ige Spezifität für das Prostatakarzinom in der Gruppe von Patienten mit negativen Biopsien erreicht (Rogers et al., 2004). Außerdem sind insbesondere einige kleinere Karzinome in der Immunhistochemie AMACR negativ, während teilweise auch Normalzellen AMACR positiv sind (Magi-Galluzzi et al., 2003). Werden mRNA-Transkripte von AMACR auf PSA normalisiert, ergeben sich sogar widersprüchliche Ergebnisse: So konnten Zielie et al. zeigen, dass AMACR normalisiert auf den PSA-Wert in Prostatasekret prädiktiv für das Prostatakarzinom ist wobei weder AMACR noch PSA mRNA Level alleine prädiktiv für das Prostatakarzinom waren (Zielie et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnten Laxman et al. im Urin keine statistische Signifikanz von AMACR

normalisiert auf den PSA-Wert nachweisen (Laxman et al., 2008). Weiterhin ist der Sinn der Normalisierung der AMACR auf PSA Level kritisch zu hinterfragen, ist PSA selber doch ein umstrittener Biomarker für das humane Prostatakarzinom (siehe Kapitel 1.5.1.1 Prostataspezifisches Antigen (PSA) als potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom).

Wie auch AMACR ist Hepsin im Prostatakarzinom überexprimiert im Vergleich zu normalem Gewebe oder der benignen Prostata Hyperplasie (BPH) und wird daher als potentieller neuer Biomarker für das humane Prostatakarzinom diskutiert (Chen et al., 2003). Hepsin zeigt in 90 % der Tumorgewebe eine Überexpression im Vergleich zu gematchten nicht-Tumorgeweben (Stephan et al., 2004). Goel et al. konnten nachweisen, dass Hepsin in 100 % aller Prostatakarzinome, allerdings auch in 11,9 % aller BPHs und in 57,14 % aller BPHs mit PIN, hochreguliert ist (Goel et al., 2011). Diese Hochregulation der Hepsin-Expression im Prostatakarzinom korreliert zwar signifikant invers mit dem klinischem Ergebnis (Dhanasekaran et al., 2001), ein Nachweis von Hepsin im Urin oder Serum ist aber nicht möglich (Talesa et al., 2009; Leman und Getzenberg, 2009). Dies macht den Nutzen von Hepsin als möglichen Biomarker für das humane Prostatakarzinom schwierig (Mukesh et al., 2011).

Early Prostate Cancer Antigen (EPCA) ist ein weiteres im Prostatakarzinom exprimiertes Protein, welches nicht im Normalgewebe exprimiert wird und daher als potentieller Biomarker diskutiert wird (Dhir et al., 2004; Uetsuki et al., 2005). Allerdings wurden in weiteren Validierungsstudien 41 % der Prostatastanzbiopsien falsch negativ klassifiziert, obwohl die Patienten ein dokumentiertes Prostatakarzinom aufwiesen (Hansel et al., 2007). Damit ist EPCA als Biomarker für die Diagnose des humanen Prostatakarzinoms nicht geeignet.

Die Hypermethylierung von Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) in Prostatakarzinomgewebe wurde bereits 1994 beschrieben (Lee et al., 1994). Die damit einhergehende verminderte GSTP1 Expression ist mit dem Prostatakarzinom assoziiert, während in normalem Gewebe eine abundante GSTP1 Expression vorliegt (Lee et al., 1994). Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass die GSTP1 Promotorhypermethylierung in mehr als 90 % aller Prostatakarzinomen vorkommt (Nelson et al., 2001; Lin et al., 2001; Brooks et al., 1998). Diese GSTP1 Promotorhypermethylierung erfolgt schon in der PIN und ist nicht nur auf den Krebs beschränkt, sondern auch schon für die benigne proliferative inflammatorische Atrophie beschrieben (Nelson et al., 2001; Nakayama et al., 2003). Außerdem ist die GSTP1 Hypermethylierung im Serum nur bei 72 %, im Urin sogar nur in 36 % aller Prostatakarzinompatienten nachweisbar, auch wenn die Methylierungsrate in lokal fortgeschrittenen und metastatischen Prostatakarzinompatienten bei 100 % lag (Goessl et al., 2000). Hinzu kommt, dass die Detektionsraten der Methylierung weder im Urin noch im Plasma verlässlich sind. Sie schwanken bei verschiedenen Studien im Urin zwischen 19 % und 76 % und im Serum zwischen 13 % und 72 %. Für eine potentielle klinische Anwendung muss demnach erst die Sensitivität der Detektion der GSTP1 Hypermethylierung verbessert werden (Tosoian und Loeb, 2010).

DD3 (Prostata spezifisches Antigen-3, PCA-3) ist ein Gen, welches eine nicht-codierende prostataspezifische mRNA exprimiert. PCA-3 ist in 94,6 % aller Prostatakarzinome bis zu 66-fach überexprimiert (Bussemakers et al., 1999; de Kok et al., 2002; Hessels et al., 2003). Weiterhin ist die PCA-3-Expression assoziiert mit pathologischen Faktoren wie der extrakapsulären Ausbreitung des Tumors, dem Tumervolumen und dem Gleason-Score (Whitman et al., 2008; Haese et al., 2008). Auch im Urin korreliert die PCA-3 Expression mit dem Tumervolumen, nicht aber mit der Prostatagröße. Eine Korrelation zwischen hohen PCA-3 Scores im Urin mit Hochrisikoprostatakarzinomen konnten Tosoian et al. allerdings nicht nachweisen (Tosoian et al., 2010). Sogar die Festsetzung eines *cut-off*-Wertes für die Prostatakarzinomdiagnose mittels PCA-3 war nicht möglich, da sich die PCA-3 Scores verschiedener Patientengruppen stark überlappten (Tosoian et al., 2010).

1.5.2 Prognostische Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

In den letzten Jahren wurden bereits einige Biomarker publiziert, die mit einem aggressiven Verhalten des Prostatakarzinoms korrelieren. Zu diesen Biomarkern gehören z.B. Hepsin-1 (Dhanasekaran et al., 2001), EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) (Varambally et al., 2002), MTA1 (*metastasis-associated protein 1*) (Hofer et al., 2004), Muc1 (Lapointe et al., 2004), Calveolin-1 (Karam et al., 2007) und Endoglin (CD105) (Svatek et al., 2008) sowie die TMPRSS2-ERG Fusion (Demichelis et al., 2007). Allerdings wird bisher noch keiner dieser Biomarker routinemäßig in der Diagnostik des Prostatakarzinoms angewendet. Die TMPRSS2-ERG Fusion, welche zu den vielversprechendsten potentiellen Biomarkern der letzten Jahre gehört, betrifft ca. 50 % aller Prostatakarzinome (Demichelis et al., 2007). Wie auch PSA ist die TMPRSS2-ERG Fusion ein Androgenrezeptor-kontrolliertes Gen. Die Relevanz von TMPRSS2-ERG als Prognosemarker für das Prostatakarzinom ist allerdings umstritten, da es mittlerweile mehrere Studien gibt, die die Vorhersagekraft der TMPRSS2-ERG Fusion aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in Frage stellen (Kristiansen, 2012). Ein weiterer viel diskutierter potentieller Marker für die Progressionsvorhersage des Prostatakarzinoms ist die Promotormethylierung von PITX2 (*paired-like homeodomain 2*) (Weiss et al., 2009). Studien von Banez et al. 2010 und Schatz et al. 2010 bestätigen die Studie von Weiss et al. 2009 zwar (Banez et al., 2010; Schatz et al., 2010), eine mögliche prognostische Aussage der PITX2 Promotormethylierung an Biopsiestanzen – die Voraussetzung dafür, dass der Marker vor einer Prostatektomie angewendet werden kann – ist allerdings noch völlig unklar (Kristiansen, 2012). Auch ein relativ unspezifischer, zum Nachweis der Zellproliferation genutzter Marker, Ki67, wurde im Zusammenhang mit dem Progressionsverhalten von Prostatakarzinomen untersucht. In verschiedenen Patientenkohorten wie "active surveillance"-Gruppen (Überwachungsgruppe) (u.a. (Stattin et al., 1997), prostatektomierte Patienten (u.a. (Bubendorf et al., 1996), sowie Patienten, die sich einer Strahlentherapie unterzogen haben, (u.a. (Khoo et al., 1999) wurde die Ki67-Expression in immunhistochemischen Analysen als signifikant höher beschrieben als bei

Patienten mit progressiven Prostatakarzinomen ($p < 0,00005$ und Schwellenwert = 3 %; $p = 0,02$ und Schwellenwert = 7,5 % bzw. $p = 0,017$ und Schwellenwert = 2,4 %). Eine Einführung in die Klinik scheitert bisher allerdings an den unterschiedlichen Schwellenwerten, ab denen die Ki67 Immunhistochemie in den verschiedenen Studien als positiv gewertet wird (Range: 2,4 – 26 %) (Kristiansen, 2012).

Calveolin-1 ist ein regulatorisches Molekül, involviert in Transport und Zellkommunikation womit es Zellwachstum, Apoptose, Angiogenese und transvasculären Austausch beeinflusst (Carver und Schnitzer, 2003). Calveolin-1 ist im Prostatakarzinom hochreguliert und unter anderem assoziiert mit hohen Gleason-Scores, Lymphknotenmetastasen aber auch mit positiven Operationsrändern, welche an sich schon negative prognostische Marker für das Prostatakarzinom darstellen (Yang et al., 1999). Eine weitere Studie demonstriert, dass Calveolin-1 mit hohem Gleason-Score und höheren initialen PSA-Werten assoziiert ist. Außerdem zeigt diese Studie, dass Calveolin-1 mit einem hohen Rezidivrisiko einhergeht (Karam et al., 2007). Allerdings konnte in einer Studie von Yang et al. kein signifikanter Unterschied in der Calveolin-1 Expression zwischen der Gruppe der rezidivierenden und der Gruppe der rezidiv-freien Prostatakarzinomen gefunden werden (Yang et al., 1998). Ähnliche teilweise widersprüchliche Ergebnisse zeigen Studien für Endoglin als potentiellen Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom. Svatek et al. konnten zwar zeigen, dass die präoperativen Blutwerte von Endoglin mit einem erhöhten Risiko der biochemischen Progression von Prostatakarzinomen korrelieren (Svatek et al., 2008; Svatek et al., 2009). Fujita et al. zeigten 2009 allerdings, dass die Endoglinwerte im Blut nicht prädiktiv für die Unterscheidung von lokalisierten Prostatakarzinomen und nicht auf das Organ beschränkten Prostatakarzinomen sind, sondern Endoglin lediglich als möglicher Diagnosemarker in Betracht kommt, da es mit dem Tumolvolumen korreliert (Fujita et al., 2009).

Auch PSA, welches heute z.T. zum Screening für das Prostatakarzinom eingesetzt wird und ein wichtiger Bestandteil der Verlaufskontrolle des Prostatakarzinoms ist, wird als prognostisch relevanter Biomarker für das Prostatakarzinom diskutiert (Lilja et al., 2011). So ist die PSA Verdopplungszeit relevant zur Vorhersage der metastatischen Progression und der krebsspezifischen Mortalität (Patel et al., 1997; Cannon et al., 2003). Allerdings geben diese Werte erst beim Auftreten des biochemischen Rezidivs Auskunft über die weitere Prognose, nicht aber zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Außerdem ist PSA bisher noch nicht prospektiv validiert worden, um die metastatische Progression und den krebsspezifischen Tod eines Patienten vorhersagen zu können (Corn und Thompson, 2010). In den Nomogrammen findet der initiale PSA-Wert zwar Eingang zur Risikoabschätzung der einzelnen Patienten, als alleiniger Marker ist der PSA-Wert allerdings nicht zur Progressionsvorhersage geeignet (Svatek et al., 2009). Auch der Gleason-Score findet heute Eingang in die Nomogramme zur Progressionsvorhersage der Prostatakarzinome. So haben 95 % der Männer mit einem Gleason-Score ≤ 6 und einem negativen Resektionsrand (R0) nach 10 Jahren noch kein Anzeichen für ein Rezidiv. Bei positiven Absetzungsrändern hingegen steigt das Rezidivrisiko dieser Gruppe auf 28 %, was dem Risiko

der Gruppe von Patienten mit einem höheren Gleason-Score als Gleason 6 und einem negativen Resektionsrand entspricht. Patienten mit einem Gleason-Score von 8 oder höher haben sogar ein 60 %iges Rezidivrisiko, bei zusätzlichem Lymphknotenbefall liegt dies sogar bei 90 % (Khan et al., 2003). Aber auch wenn der Gleason-Score ein prädiktiver Marker für ein Rezidiv ist, so ist er kein Marker, der prospektiv zwischen indolenten und aggressiven Tumoren für den einzelnen Patienten unterscheiden kann, so dass nicht klar ist, ob eine Prostatektomie nötig ist oder nicht (Troyer et al., 2004).

Generell besteht das Problem darin, dass bisher kaum ein Biomarker daraufhin getestet wurde, ob er die Vorhersagekraft von Nomogrammen verbessert. Außerdem basieren Biomarkerstudien oft auf semiquantitativen immunhistochemischen Analysen mit großer intra- und interobserver Variabilität, kurzem Follow-Up und kleinen Patientenzahlen. Außerdem wird mit den bereits bekannten Markern jeweils meist nur ein kleiner Teil aller aggressiven Tumore identifiziert. Die meisten Biomarker werden zudem kaum an Biopsiestanzen getestet, sodass bisher kein Biomarker die schlechten Nomogramme verbessern konnte und routinemäßig in der täglichen klinischen Praxis eingesetzt wird. Aus diesen Gründen ist es notwendig entweder einen neuen, sensitiveren sowie spezifischeren Marker oder eine Markerkombination zur sicheren Vorhersage eines aggressiven Tumorverhaltens zu finden. Mit einem solchen Marker könnte dann im Umkehrschluss auch wieder die Entfernung der Prostata bei einem weniger aggressiven Prostatakarzinom verhindert und die damit verbundenen Nebenwirkungen vermindert werden.

1.6 Zelllinien als *in vitro* Modelle des humanen Prostatakarzinoms

Zelllinien stellen heute eine nicht limitierte, leicht verfügbare Quelle von Tumorzellen dar, die unter kontrollierten Bedingungen kultiviert werden können. Dabei bieten sie gegenüber der Primärkultur den Vorteil, dass sie kostengünstig, leicht und dauerhaft zu kultivieren sind. Darüber hinaus sind sie genetisch leicht zu verändern. Primäre Zellen hingegen verringern mit der Zeit ihre Zellteilungsrate bzw. gehen in Seneszenz (Hayflick, 1965), während Zelllinien dauerhaft kultivierbar sind, wenn auch mit der Zeit eine Selektion auf schnell wachsende Zellen stattfindet (Schmitz, 2011). Primäre Zellkulturen sind zwar näher am *in vivo*-System als Dauerkulturen, können aber je nach Donor und Präparation variieren und sind wesentlich versorgungsintensiver und zeitaufwändiger als Zelllinien (ATCC, 2012).

Auch wenn es sich bei Prostatakarzinomzellen um einen der schwierigsten Zelltypen zur Herstellung von kontinuierlichen Zelllinien handelt und erste Versuche von Burrows 1917 nur zu kurzzeitigen primären Kulturen führten (van Bokhoven et al., 2003), gelang 1970 die erste Etablierung einer Prostatakarzinomzelllinie (Fraley et al., 1970), welche sich aber später als Cross-Kontaminationen von HeLa-Zellen herausstellte (Williams, 1980; Nelson-Rees und Flandermeyer, 1976; Masters et al., 2001). Heute stehen für das Prostatakarzinom eine Vielzahl von Zelllinien zur Durchführung von *in vitro* Zellkulturversuchen zur Verfügung. Hierbei sind die Prostatakarzinomzelllinien PC3, Du145 und LNCap

die drei „klassischen“ Zelllinien. Daneben gibt es eine Vielzahl „nicht-klassischer“ Prostatakarzinomzelllinien (van Bokhoven et al., 2003). Trotz der Vielzahl von über 200 Prostatakarzinomzelllinien und -subzelllinien (Sobel und Sadar, 2005), reflektieren sie nicht das volle Spektrum der Heterogenität des Prostatakarzinoms (van Bokhoven et al., 2003). Ihre Vorteile der kostengünstigen, leichten und dauerhaften Kultivierung, gepaart mit dem Widerspiegeln des Prostatakarzinoms, macht sie heute aber zu einem unverzichtbaren Teil der Prostatakarzinomforschung.

1.6.1 Die Prostatakarzinomzelllinie Du145

Die Herstellung der „klassischen“ Prostatakarzinomzelllinie Du145 gelang 1977 aus einer Gehirnmastase eines 69-jährigen weißen Mannes mit moderat differenziertem Adenokarzinom und lymphatischer Leukämie (Mickey et al., 1977; Stone et al., 1978). Du145 ist eine Androgen-unabhängige Zelllinie (van Bokhoven et al., 2003) und stammt vermutlich von einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom ab, auch wenn die Zellen nicht die für dieses Stadium typischen Proteine wie PSA und Androgenrezeptor exprimieren (Masters, 2011). Auch 5-alpha-Reduktase, ein Enzym zur Produktion von 5-alpha-Dihydrotestosteron, wird nicht exprimiert (Russell et al., 2003). Dennoch können die Du145-Zellen in Nacktmäusen *in vivo* die Bildung eines neuen Tumors hervorrufen und eine Vielzahl von Metastasen bilden, weshalb die Zelllinie als aggressive Prostatakarzinomzelllinie eingeordnet wird (Sobel und Sadar, 2005).

Du145-Zellen exprimieren den Basalzellmarker Keratin 5, nicht aber Keratin 14 und p63. Gleichzeitig werden die Luminalzellmarker Keratin 8 und 18 exprimiert. Die neuroendokrinen Marker Chromogranin A und Neuron-spezifische Enolase werden nicht exprimiert, während das mesenchymale Intermediatfilament Vimentin exprimiert wird. 90 % der Zellen weisen eine p53 Mutation auf (van Bokhoven et al., 2003). Auch p16, ein Gen zur Zellzykluskontrolle, ist in Du145-Zellen mutiert (Russell et al., 2003). Die Zellen weisen im Mittel 64 Chromosomen (Range: 46 -143 Chromosomen) auf (Sobel und Sadar, 2005).

1.6.2 Die Prostatakarzinomzelllinie PC3

1979 wurde die ebenfalls zu den „klassischen“ Prostatakarzinomzelllinien gehörende Zelllinie PC3 aus einer Knochenmetastase eines viert-gradigen Prostatakarzinoms eines 62-jährigen weißen Mannes etabliert (Kaighn et al., 1979). Der spendende Patient erhielt zum Zeitpunkt der Zellentnahme eine Antiandrogentherapie, was vermutlich die Antiandrogenresistenz der Zelllinie bedingt (Kaighn et al., 1979). Wie Du145 stammt auch PC3 vermutlich von einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom ab, exprimiert aber ebenfalls nicht die für dieses Stadium typischen Proteine PSA und Androgenrezeptor (Masters, 2011; Kaighn et al., 1979) sowie 5-alpha-Reduktase (Russell et al., 2003). Das Prostata-

spezifische Membran-Antigen (PSMA) wird nicht exprimiert (Ghosh et al., 2005). Die Expression saurer Phosphatasen ist gering bis nicht detektierbar (Lin et al., 1998). Wie auch Du145 exprimieren die PC3-Zellen den Basalzellmarker Keratin 5, nicht aber Keratin 14 und p63. Gleichzeitig werden die Luminalzellmarker Keratin 8 und 18 exprimiert. Die neuroendokrinen Marker Chromogranin A werden nicht exprimiert, während der neuroendokrine Marker Neuron-spezifische Enolase sowie das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin exprimiert werden. PC3-Zellen weisen eine p53 Frameshift-Mutation auf, so dass kein p53 exprimiert wird (van Bokhoven et al., 2003). Auch das Tumorsuppressorgen pTEN, ein negativer Regulator der Phosphoinositol-3-Kinase (AKT) Signalwegs, ist homozygot deletiert. Dies führt zur konstitutiven Aktivierung von PI3-Kinase oder AKT, was wiederum die zelluläre Transformation induziert (Russell et al., 2003). Wie die Du145- sind auch die PC3-Zellen in der Lage *in vivo* in Nacktmäusen Tumore zu bilden und zu metastasieren (Sobel und Sadar, 2005). Dabei weisen die PC3-Zellen im Vergleich zu den Zelllinien Du145 und LNCaP ein hohes Potential zur Bildung von Metastasen auf (Pulukuri et al., 2005). PC3-Zellen sind aneuploid und weisen im Mittel 58 Chromosomen auf (Sobel und Sadar, 2005). Auffallend ist der geringe Bedarf an Serum zum Wachstum der Zellen (Kaighn et al., 1979).

1.6.3 Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP

Die als letzte der klassischen Zelllinien etablierte Zelllinie LNCaP hat ihren Ursprung in Lymphknotenmetastasen eines 50-jährigen weißen Mannes (Horoszewicz et al., 1980; Horoszewicz et al., 1983). LNCaP-Zellen gelten als weniger aggressiv als die Zelllinien PC3 und Du145, da sie nur in 50 % der mit LNCaP-Zellen injizierten Nacktmäusen eine Tumorbildung initiieren (Sobel und Sadar, 2005).

LNCaP-Zellen exprimieren Androgen- und Östrogenrezeptoren (Horoszewicz et al., 1983), wobei die Mutation T877A im Androgenrezeptor die Bindung und Induktion der Genexpression verschiedener Steroide und Antisteroide beeinflusst (Veldscholte et al., 1990). Aufgrund dieser Androgenrezeptormutation, welche zu einem promiskuitiven Androgenrezeptor führt, der auch andere Steroide binden kann, sowie der Etablierung der Zelllinie aus einem hormonrefraktären Patienten ist die Androgenabhängigkeit der LNCaP-Zellen fraglich (van Bokhoven et al., 2003).

LNCaP-Zellen exprimieren weder den Basalzellmarker Keratin 5, noch die Basalzellmarker Keratin 14 oder p63. Dafür werden die Luminalzellmarker Keratin 8 und 18 exprimiert. Es werden weder die neuroendokrinen Marker Chromogranin A und Neuron-spezifische Enolase noch das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin exprimiert. Als einzige Zelllinie der „klassischen“ Prostatakarzinomzelllinien weisen LNCaP-Zellen Wildtyp p53 auf (van Bokhoven et al., 2003). Das Tumorsuppressorgen pTEN trägt allerdings eine „Frameshift-Mutation“, welche den PI3-Kinase/AKT-Signalweg konstitutiv aktiviert (Russell et al., 2003). Der Karyotyp von LNCaP-Zellen ist aneuploid mit 33-91 Chromosomen pro Zelle (Mittelwerte: 76-91) (Sobel und Sadar, 2005).

1.7 Grundlagen der Proteomik

Per Definition bezeichnet der Begriff „Proteom“ alle von einer Zelle gleichzeitig exprimierten Proteine eines Genoms zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen (Meyer und Stuhler, 2007). Neben fundamentalen beziehungsweise hochabundanten Proteinen der Zellarchitektur (z.B. β -Aktin, Chromatin, etc.) sind auch Enzyme, Signaltransduktoren und Rezeptoren wichtige Bestandteile des Proteoms. Es stellt daher ein exaktes und sensitives Abbild zellulärer Vitalitätsparameter dar. Da beim Proteom sowohl postranskriptionelle und postranslationale Modifikationen wie auch alternatives Spleißen und Proteindegradierung eine Rolle spielen, ist das Proteom eine beispiellose Herausforderung in Bezug auf die Probenkomplexität und den dynamischen Bereich der Proteinabundanz. Entsprechend ist das Proteom hundert Mal komplexer als das Genom, da von einem Gen etwa 10 – 100 Proteinspezies gebildet werden (Meyer und Stuhler, 2007). Genomweite Studien zeigen zusätzlich starke Dissonanz zwischen mRNA und Proteinexpressionslevel (Chen et al., 2002). Die Veränderungen im Proteinlevel vieler Organismen gehen also nicht mit den Veränderungen im Transkriptom einher (Wu et al., 2007). Weiterhin sind die Proteine die Hauptbestimmungsfaktoren für die meisten bekannten zellulären Funktionen (Ornstein und Petricoin, 2004). Außerdem lassen sich über das Genom und das Transkriptom nicht die Lokalisation der Proteine im Gewebe und in den Zellen sowie ihre Assoziation mit anderen Proteinen vorhersagen (Kondo, 2008). Auch wenn Krebs eine Erkrankung des Genoms ist, werden angesammelte genomische Aberrationen ins Transkriptom übersetzt und anschließend mit weiteren Modifikationen ins Proteom translatiert, welches dann zur Transformation der Zellen führt (Kondo, 2008). Diese genannten Eigenschaften, die größere Vielfalt des Proteoms und das damit einhergehende bessere Widerspiegeln des biologischen Systems sind die Vorteile der Proteine als potentielle Biomarkerkandidaten im Vergleich zu DNA oder mRNA (Meyer und Stuhler, 2007).

Die Analyse und Untersuchung des Proteoms erfolgt mit Techniken der sogenannten „Proteomik“. Die Proteomik umfasst dabei die Analyse der Proteine mit verschiedenen biochemischen Methoden. Der Ausdruck „Proteomik“ (englisch: *Proteomics*) wurde in den 1990er Jahren eingeführt. Seitdem wurden massenspektrometrisch (MS)-basierte Methoden zum wichtigen Tool für die Proteomik und dem wachsenden Feld der Systembiologie, um komplexe humane Krankheiten besser zu verstehen (Goo und Goodlett, 2010). Die Proteomik ist ein in den letzten Jahren schnell gewachsenes und auch in Zukunft schnell wachsendes Feld, insbesondere durch innovative experimentelle Ansätze, sowie Verbesserung von Sensitivität, Auflösung und Massengenauigkeit (Goo und Goodlett, 2010). Aufgrund der oben genannten Vorteile des Proteoms gegenüber dem Genom und dem Transkriptom in Kombination mit immer besser werdenden Proteomik-Techniken, geben Proteomikstudien Informationen, die mit anderen *omics Techniken (Genomik, Metabolomik, Transkriptomik) nicht zu erhalten sind. Proteomik kreiert den Link zwischen genomischen Informationen, biologischer Funktion und der untersuchten

Krankheit durch Studien der Proteinexpression, Modifikation und Protein-Protein Interaktion (Jimenez et al., 2007).

1.7.1 Methoden der Proteomik

1.7.1.1 Zwei-dimensionale *Difference in Gel electrophoresis* (2D-DIGE)

Unlu et al. kombinierten 1997 Fluoreszenz-Tags von Proteinen mit der 2-dimensionalen Gelelektrophorese zur so genannten 2D-DIGE Technik (Unlu et al., 1997). Es handelt sich hierbei um eine Screeningmethode zum Vergleich der Proteinprofile verschiedener biologischer Proben. Mit der DIGE-Technik ist die Separation tausender Proteine (Lilley et al., 2002), basierend auf Unterschieden im isoelektrischen Punkt und der molekularen Masse der Proteine, möglich (Tacu et al., 2010). Die Proteine werden vor der Auftrennung in einem zweidimensionalen SDS-Polyacrylamid Gel mit Cy-Farbstoffen markiert. Neben der zu untersuchenden Probe wird ein interner Standard im Gel mit aufgetrennt, der aufgrund der Verwendung eines separaten Cy-Farbstoffes individuell visualisiert werden kann. Er wird in der anschließenden Software-Auswertung für die Normalisierung verwendet (Abbildung 1.6). Dabei muss jedes Set an Farbstoffen mit den selben Aminosäureresten reagieren, die Ladung der Target-Aminosäure bewahren, ähnliche molekulare Massen sowie distinkte Fluoreszenzcharakteristika aufweisen (Minden et al., 2009).

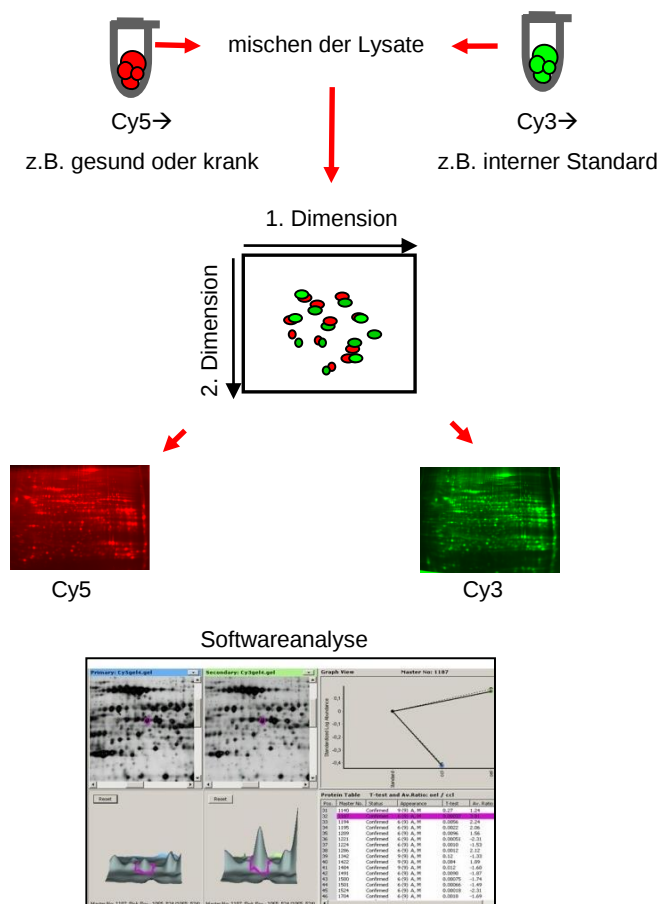


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der 2D-DIGE-Technik: Bei der Sättigungsmarkierung werden alle Cysteine einer Probe mittels Cy3 (interner Standard) oder Cy5 (Probe) mit Farbstoff markiert. Der interne Standard dient später der Quantifizierung der Proteinspots. Die Proben werden gemischt und mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Scannen der Gelbilder erfolgt die Softwareanalyse und die Detektion der differenziell regulierten Spots. Modifiziert nach Henkel (Henkel et al., 2005).

Das DIGE-System findet als Minimal-Markierungs-Technik bei Markierung von größeren Proteinmengen (Henkel et al., 2005; Tonge et al., 2001), sowie als Sättigungsmarkierung für geringe Proteinmengen Anwendung (Shaw et al., 2003; Sitek et al., 2005). Bei der Minimal-Markierungs-Technik werden 2 % aller Proteine markiert. Jedes Protein trägt maximal ein Farbstoffmolekül, welches an die Lysinreste gekoppelt wird. Bei der Sättigungsmarkierung werden 100 % alle Cystein-enthaltenden Proteine markiert, wobei der Farbstoff an Cysteine gekoppelt wird. Mit der Sättigungsmarkierung sind Proteine von 1.000-5.000 Zellen (Minden et al., 2009; Sitek et al., 2008) oder 0,5 fmol Protein (Viswanathan et al., 2006) nachweisbar, wobei diese Sensitivität vor der Entwicklung der DIGE-Technik durch die verschiedensten Proteinfärbemethoden nicht erreicht werden konnte (Sitek et al., 2005).

Der Nachteil der DIGE-Technik liegt in der nicht vorhandenen Möglichkeit der Detektion sehr großer oder sehr kleiner Proteine, Plasmamembran-assoziiierter Proteine, hydrophober, sehr basischer oder sehr saurer Proteine (Chignard und Beretta, 2004). Ein weiterer Nachteil liegt in den auftretenden Gel-zu-Gel Varianzen von ca. 20 %. Diese Varianzen machen 3-5 biologische Replikate pro analysierter

biologischer Gruppe nötig, um in den verschiedenen Gruppen Expressionsunterschiede einzelner Protein von 1,5-2 zuverlässig detektieren zu können (Karp et al., 2008). Die *Gel-zu-Gel* Varianzen werden bedingt durch heterogene Acrylamid-Polymerisation, Schwankungen der Elektrizität, des pH-Wertes und der Temperatur während des Gellaufes sowie der Variabilität der Proben in der ersten Dimension. Diese Nachteile lassen sich allerdings zusätzlich durch die Auftrennung von zwei oder mehr Proben bzw. einer Probe und eines Standards in einem Gel vermindern (Timms und Cramer, 2008). Auch wenn die 2D-DIGE-Technik sehr zeitintensiv und nicht in jedem Labor durchführbar ist, liegen die Vorteile in der Auflösung von Protein-Isoformen (Goo und Goodlett, 2010) und linearen Detektionsraten im Konzentrationsbereich von bis zu > 10.000fachen Protein Abundanzen (Viswanathan et al., 2006; Lilley et al., 2002). Dies macht die 2D-DIGE-Technik gekoppelt mit MS-basierten Identifikationen der als differenziell reguliert gefundenen Proteine zu einem vielversprechenden Tool für die Protein-Biomarker-Identifikation.

1.7.1.2 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie ist über 100 Jahre alt. Sie ist heute die Methode der Wahl zur Analyse komplexer Proteinproben (Aebersold und Mann, 2003). Möglich gemacht wurde die Nutzung der Massenspektrometrie für Proteine durch die Entwicklung „sanfter“ Ionisierungsmethoden wie Elektrosprayionisierung (ESI) oder *Matrix-assisted laser desorption/ionisation* (MALDI) (Fenn et al., 1989; Tacu et al., 2010). Neben der Ionenquelle, in der die Ionisierung des Analyten erfolgt, besteht ein Massenspektrometer grundsätzlich noch aus einem Massenanalysator und einem Detektor. Im Massenanalysator erfolgt die Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) eines ionisierten Analyten in der Gasphase. Als Massenanalysatoren werden in der Proteomik hauptsächlich Ionenfallen, *time-of-flight* (TOF), Quadrupol und *Fourier Transform ion cyclotron* (FT-MS) Analysatoren eingesetzt (Aebersold und Mann, 2003). Hierbei wird die ESI häufig mit Quadrupol oder Ionenfallen Analysatoren gekoppelt, während die MALDI häufig mit TOF oder TOF-TOF Analysatoren gekoppelt wird. Am Detektor werden letztlich die Anzahl der Ionen bei jedem m/z , also der Ionenstrom, gemessen. In der Regel werden die Detektoren als Sekundärelektronen-Vervielfacher mit vorgeschalteter Konversionsdynode eingesetzt. Die relative Häufigkeit der Ionen wird im Massenspektrum gegen ihr m/z Verhältnis aufgetragen. Die erhaltenen Informationen werden in Datenbanken eingegeben. Hierzu stehen verschiedene Algorithmen wie z.B. der Mascot-Suchalgorithmus und Datenbanken wie z.B. SwissProt zur Verfügung. Hier erfolgt der Abgleich der theoretisch in Datenbanken hinterlegten Peptid-Massen mit dem tatsächlich erhaltenen Massenspektrum als *Peptid Mass Fingerprint* (PMF), der einzigartig für jedes Protein ist. So kann mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit angegeben werden, um welches Protein es sich handeln könnte.

Proteine haben häufig eine zu hohe molekulare Masse, um sie „als Ganzes“ analysieren zu können. Sie zerfallen unter Elektronenbeschuss in ihre Untereinheiten oder Fragmente, was eine Identifikation aufgrund des Spontanzerfalls erschwert. Da zusätzlich die Massengenauigkeit des MALDI-MS im hochmolekularen Bereich ungenauer ist, werden Proteine vor ihrer massenspektrometrischen Analyse meist proteolytisch gespalten. Die proteolytische Spaltung erfolgt häufig durch die Endopeptidase Trypsin. Trypsin spaltet das Protein C-Terminal von den Aminosäuren Arginin und Lysin, wenn auf diese kein Prolin folgt, sowie hinter modifiziertem Cystein. Die entstandenen Peptide enthalten zwei geladenen Gruppen: eine basische Seitenkette am C-Terminus und eine Aminogruppe am N-Terminus.

1.7.1.3 Matrix assisted laser Desorption/Ionisation–time of flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

Die präziseste Methode für Proteinidentifikationen ist die Kopplung der MALDI mit einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF) (Feuerstein et al., 2005). Sie wird meistens eingesetzt, um einfache Peptidmischungen zu analysieren (Aebersold und Mann, 2003). Da die Identifizierung von Proteinen aus einer nicht komplexen Proben heraus einfach ist als aus einer komplexen Probe, wird die Methode häufig in Kombination mit Separierungsmethoden wie der 2D-DIGE angewendet.

Bei der MALDI-TOF erfolgt der Übergang vom festen in den gasförmigen Zustand und damit die Ionisierung der Probe aus einer trockenen, kristallinen Matrix heraus mittels Laserpuls (Aebersold und Mann, 2003). Die Probe benötigt für eine effiziente Ionisation eine Matrixsubstanz, welche für die Einbettung des Analyten in ein Kristallgitter verantwortlich ist. Die Matrixmoleküle liegen dabei in 1.000-10.000-fachem Überschuss im Vergleich zum Analyten vor. Das Ganze kokristallisiert. Die Matrix kann im festen Zustand (Kristall) bereits Substanzen mit elektrischer Ladung versehen, indem ein H^+ übertragen wird. Bei UV-Laserbeschuss im Massenspektrometer absorbiert die Matrix die Lichtenergie und verdampft schlagartig. Die positiv geladenen einzelnen Moleküle der eingebetteten Probe werden im elektrischen Feld beschleunigt. Diese Beschleunigung erfolgt in Abhängigkeit der Molekülmasse. Ionen mit einer höheren Startgeschwindigkeit entfernen sich weiter von der Probenoberfläche und erfahren nach dem Einschalten eines elektrischen Feldes eine geringere kinetische Energie als Ionen mit niedrigerer Startgeschwindigkeit. Gelangen die Proteinfragmente nun in die feldfreie Driftstrecke, werden sie nach ihrem m/z Verhältnis aufgetrennt. Ein zwischengeschalteter Reflektor verbessert die Auflösung, da unterschiedliche Anfangsenergien der Ionen ausgeglichen werden: Ionen mit höherer kinetischer Energie als andere Ionen mit gleicher Masse, dringen tiefer in das Gegenfeld des Reflektors ein. Die Gesamtflugzeit der Ionen (*time of flight*) korreliert mit der Geschwindigkeit, welche wiederum mit der erfahrenen Beschleunigung und somit mit der Masse des Moleküls korreliert.

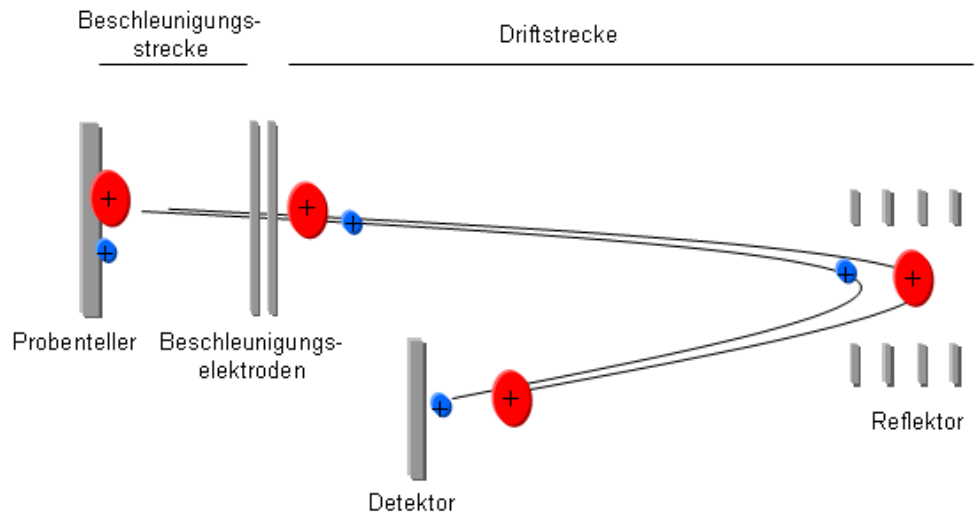


Abbildung 1.7: Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers. Nach dem Verdau der Proteine durch Trypsin werden die Peptide am Proben-teller ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt. Am Reflektor werden unterschiedliche Startenergien durch ein elektrisches Gegenfeld zur Beschleunigungs-elektrode ausgeglichen. Die Messung der Flugzeit erfolgt durch den Detektor, wobei die Flugzeit ein Maß für das Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) ist (eigene Abbildung).

1.7.1.4 Tandemmassenspektrometrie (MS/MS)

Der Identifikation von Proteinen mittels MALDI-TOF liegt das Prinzip des *Peptid Mass Fingerprints* zu Grunde (siehe Kapitel 1.7.1.2 Massenspektrometrie (MS)). Diese Methode lässt keine Rückschlüsse auf die Aminosäuresequenz eines Proteins zu. Solche Sequenzinformationen können mit der Tandemmassenspektrometrie gewonnen werden. Hierzu werden einzelne Massenpeaks einer erneuten Fragmentierung unterzogen, d.h. dem bereits durchgelaufenen MS Prozess wird ein weiterer MS Prozess angeschlossen. Die Fragmentierung kann über zwei verschiedene Wege stattfinden: 1. *Laser induced dissociation* (LID), wobei durch Erhöhung der Laserenergie die interne Energie des Ions extrem hoch ist, was zu einem metastabilem Zerfall nach Ionisierung führt. 2. mit einem Kollisionsgas (Argon/N₂) über *Collision induced dissociation* (CID), wobei der Zerfall des Peptides durch die Kollision mit Gasmolekülen initiiert wird. Der Bruch der Peptidbindung kann an 3 verschiedenen Stellen erfolgen: NH-CH, CH-CO und CO-NH wobei jeweils ein ungeladenes und ein geladenes Fragment entsteht. Diese Peptidfragmente nennt man a,b,c- (N-Terminus-) und x,y,z- (C-Terminus-) Ionen (Abbildung 1.8).

1.7.1.5 Flüssigchromatographie (*liquid chromatography*) Massenspektrometrie (LC-MS)

Die Kopplung eines Chromatographieschrittes mit der Massenspektrometrie wird Flüssigchromatographie (*Liquid-Chromatography*) Massenspektrometrie (LC-MS) genannt. Meist wird diese Methode eingesetzt, um komplexe Proteingemische zu analysieren (Aebersold und Mann, 2003). Für die LC-MS wird in der Regel die Ionisierungsmethode der Elektrosprayionisierung (ESI) genutzt. Diese ionisiert den Analyten aus einer Lösung heraus und ist daher leicht mit der Chromatographie zu koppeln (Aebersold und Mann, 2003). Die ESI ist eine schonendere Ionisierungsmethode als die MALDI, dafür aber weniger vollständig (Tacu et al., 2010). Gekoppelt wird ESI meist mit Quadrupol- oder Ionenfallen-Massenspektrometern.

Für die ESI werden Ionen im elektrischen Feld bei Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert, indem sich die positiv geladenen Proben­tröpfchen zur gegenüberliegenden Kathode bewegen. Dabei werden zunächst kleine geladene Tröpfchen aus Elektrolyten gebildet. Diese Tröpfchen verlieren durch Verdampfung Lösungsmittel, sodass die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt. Ist die Ladung der entstandenen Tröpfchen zu groß für den Radius der Tröpfchen, stoßen sich die gleichnamigen Ladungen ab und die Tropfen zerfallen immer weiter in Mikrotröpfchen (Coulomb Explosion), bis letztlich die Desolvatisierung des Analytmoleküls durch die Kollision mit Stickstoffmolekülen beim Transfer in das Massenspektrometer stattfindet (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die eigentliche Analyse der Ionen im Quadrupolmassenspektrometer erfolgt dann im Hochvakuum. Hierbei sind vier parallele, stabförmige Metallelektroden im Quadrat angeordnet. Die nebeneinander liegenden Stäbe haben eine entgegengesetzte, die gegenüber liegenden Stäbe die gleiche Polarität. Diese Elektroden sorgen mit ihren kombinierten Wechsel- (V) und Gleichspannungsfeldern (U) dafür, dass nur Ionen mit einem bestimmten m/z Verhältnis den Massenfilter auf einer stabilen oszillierenden Bahn durchfliegen können. Dabei ist die Masse m der Ionen direkt proportional zu U und V . Ionen, die nicht die entsprechende Masse proportional zur momentan anliegenden Spannung haben, fliegen auf instabilen Bahnen, was zur Kollision mit den Quadrupolen führt, wodurch die Ionen nicht am Detektor ankommen (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Neben der Kombination der ESI mit dem Quadrupol-Massenspektrometer ist auch eine Kombination mit Ionenfallen-Massenspektrometern möglich. Hierbei werden Ionen durch einen dreidimensionalen Quadrupol in einem elektrischen Feld eingefangen und für Mikrosekunden auf einer stabilen Bahn gehalten. Das elektrische Feld wird durch eine Ringelektrode und zwei Endkappen mit Wechselspannung gebildet. Die Ionen gelangen durch zentrische Öffnungen in den Endkappen in die mit Helium gefüllte Ionenfalle. Die Ionen kollidieren mit dem Helium, was ihre Eintrittsgeschwindigkeit abbremst, so dass sie eingefangen werden können (Abbildung 1.10). Dies gilt im Gegensatz zum Quadrupol-Massenspektrometer für Ionen eines weiten Massebereiches. Die Ionen werden für 0,1 bis 10 ms in der Ionenfalle akkumuliert (Lottspeich und Zorbas, 1998). Anschließend erfolgt die Ejektion nach

ansteigendem Molekulargewicht aus der Ionenfalle durch Anlegen von Multipolfeldern. Hierzu wird das quadrupole Feld an der Ringelektrode mit einem dipolaren Feld an den Endkappen gekoppelt. Die Ionen können durch das Anlegen der Multipolfelder Energie aufnehmen, welche sie in Schwingungen versetzt und aus der Ionenfalle zum Detektor herauskatapultiert (Lottspeich und Zorbas, 1998).

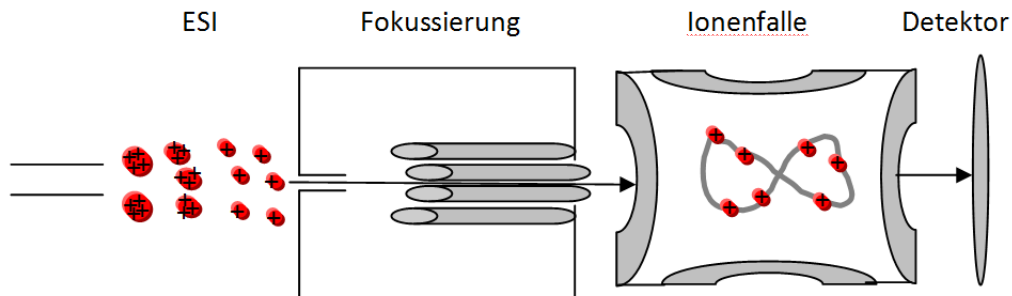


Abbildung 1.10: Schematischer Aufbau eines Ionenfallen-Massenspektrometers (eigene Abbildung).

1.7.1.6 Flüssigchromatographie-Multiple Reaction Monitoring-MS (LC-MRM-MS)

Eine relativ neue Methode, um das Proteom zu analysieren ist das sogenannte „*Selected Reaction Monitoring*“ (SRM), auch „*Multiple Reaction Monitoring*“ (MRM) genannt. Die Quantifizierung von Analyten durch Vergleiche mit isotopisch markierten internen Standards wurde 1981 erstmals für Metabolite angewendet (Van Langenhove et al., 1981). Erst 1996 wurde die Methode – damals noch als ID-MS (*isotope diluted mass spectrometry*) bekannt – für definierte Peptide eingesetzt (Barr et al., 1996). Die Weiterentwicklung dieser Methode ist heute als Flüssigchromatographie (*Liquid chromatography*)-Multiple Reaction Monitoring-MS (LC-MRM-MS) bekannt. Für das LC-MRM-MS werden so genannte Triple-Quadrupol-Massenspektrometer eingesetzt. Hierbei dient der erste Quadrupol zur Selektion eines gewünschten Peptides. Im zweiten Quadrupol erfolgt die Fragmentierung des Peptids durch die Kollision mit Kollisionsgas. Aus Fragmenten werden dann im dritten Quadrupol die gewünschten Fragmente herausselektiert und zum Detektor geleitet. Die Anzahl der am Detektor ankommenden Fragmente wird als Signalintensität dargestellt und dient im Vergleich zur bekannten Menge eines synthetischen, Isotopen-markierten Peptides der Quantifizierung des Analyten. Der Zerfall der im ersten Quadrupol selektierten Mutter-Ionen (Peptide) zu Fragment-Ionen wird dabei als „Übergang“ bezeichnet. Mehrere solcher „Übergänge“ können sequentiell aus einer Probe gemessen werden, wodurch Probenmaterial eingespart wird (Domanski et al., 2012). Die Wahl der „Übergänge“ erfolgt dabei so, dass sie möglichst spezifisch sind und Interferenzen mit anderen Analysekomponenten ausgeschlossen werden können, um eine korrekte Quantifizierung zu ermöglichen (Kuzyk et al., 2009).

Der große Vorteil von LC-MRM-MS zur Validierung von potentiellen Biomarkern im Vergleich zu Antikörper-basierten Methoden, liegt in der Möglichkeit des „*Multiplexings*“ mehrerer Moleküle (Picotti und Aebersold, 2012). Weiterhin ist die Assay Entwicklung einfacher und billiger (Picotti und Aebersold,

2012). Außerdem ist die Quantifizierung von Proteinen eines großen Konzentrationsspektrums sowie die Unterscheidung von Proteinisoformen möglich (Picotti und Aebersold, 2012). Zusätzlich werden der Methode große Chancen eingeräumt sich so weit zu entwickeln, dass ein Einsatz in der Klinik in Zukunft möglich werden wird (Picotti und Aebersold, 2012). Dies dürfte insbesondere dann interessant sein, wenn keine geeigneten Antikörper für Antikörper-basierte Analysen zur Verfügung stehen, Isoformen von Proteinen analysiert werden müssen (Wang et al., 2011) oder post-translationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen eine Rolle spielen (Mayya et al., 2006; Picotti und Aebersold, 2012). Außerdem ist die LC-MRM-MS-Methode im Vergleich zu Antikörper-basierten Methoden schneller zu etablieren: Dauert die Entwicklung eines ELISAs mit der Herstellung der Antikörper meist zwischen ein und drei Jahren, so kann die LC-MRM-MS-Methode innerhalb von zwei Monaten etabliert werden (Lemoine et al., 2012). Für die Prostatakarzinomforschung konnte die LC-MRM-MS Methode bisher nur in wenigen „*Development*“-Studien z.B. für PSA und Testosteron eingesetzt werden (Goo und Goodlett, 2010).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Reduktion von Todes- und/oder Erkrankungsfällen aufgrund von Karzinomen ist nach Kraywinkel et al. grundsätzlich nur über zwei Wege möglich: Sie kann über die Reduktion von Risikofaktoren (Primärprävention) oder aber über die Krebsfrüherkennung (Sekundärprävention) verringert werden. Da die Risikofaktoren des Prostatakarzinoms nicht bekannt sind, ist eine Primärprävention dieser Krebsart zurzeit nicht möglich. Daher ist es dringend nötig, für die Früherkennung des Prostatakarzinoms neue Biomarker zu identifizieren (Kraywinkel et al., 2012; Avances et al., 2001). Zwar wird das Prostata-spezifische Antigen (PSA) als Biomarker beim Screening zur Detektion des Prostatakarzinoms eingesetzt, der Nutzen von PSA für die Diagnose des Prostatakarzinoms ist allerdings umstritten (Andriole et al., 2009; Schroder et al., 2009; Sandblom et al., 2011; Chou et al., 2011). Unstrittig ist, dass PSA als Biomarker aufgrund einer Vorverlagerung der Diagnose in ein frühes Krankheitsstadium zu einer Verbesserung des Überlebens von am Prostatakarzinom erkrankten Patienten geführt hat (RKI, 2012; RKI, 2012; Labrie et al., 2004). Unstrittig ist aber auch, dass beim PSA-Screening eine Vielzahl von Prostatakarzinomen diagnostiziert werden, die klinisch indolent sind und vermutlich auch ohne Behandlung nicht zum Tode des Patienten führen würden (Kraywinkel et al., 2012; Avances et al., 2001; Hegarty et al., 2010; Schroder et al., 2009). Dies führt zu einer für den Patienten stark belastenden Übertherapie vieler Prostatakarzinome, da zurzeit eine Unterscheidung von klinisch indolenten Tumoren von aggressiven, behandlungsbedürftigen Tumoren nicht möglich ist (Stamey et al., 2004; Hsu et al., 2006; Chen et al., 2011; Hinev et al., 2011; Guazzoni et al., 2011; Porter et al., 2006; Ploussard et al., 2011; Avances et al., 2001).

Ziel der Dissertation ist es daher neue Biomarker ausfindig zu machen, die ein nicht-invasives Identifizieren der aggressiven Prostatakarzinome bereits zum Diagnosezeitpunkt ermöglichen. Damit sollen Patienten, bei denen die Prostatektomie mit ihren Nebenwirkungen und Risiken unnötig ist, zukünftig von jenen unterschieden werden können, die prostatektomiert werden müssen und/oder eine weiterführende Behandlung (Anti-Androgen Therapie, Chemotherapie etc.) benötigen. Zur Identifizierung und Charakterisierung solcher Biomarker sollten in der vorliegenden Arbeit proteombasierte Methoden zum Einsatz kommen. Diese spiegeln im Vergleich zu DNA oder mRNA das biologische System besser wider (Meyer und Stuhler, 2007), da sie die ausführenden Moleküle einer Zelle sind.

Zunächst sollten mittels 2D-DIGE und MS Analysen differentiell zwischen Prostatakarzinomen und tumorfreien Geweben sowie zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierte Proteine identifiziert werden. Diese sollten dann im nächsten Schritt weiter validiert werden, wobei insbesondere Western Blot und immunhistochemische Methoden zum Einsatz kommen sollten. Je nach Ergebnis dieser Validierungen sollten weitere Validierungen an *Tissue Microarrays* und/oder Urinalysen durchgeführt werden, wobei auch die Methode der LC-MRM-MS zur Validierung potentieller Biomarker

für das Prostatakarzinom ausgetestet werden sollte. In einem letzten Schritt sollten ausgewählte vielversprechende Proteine *in vitro* funktionell charakterisiert werden, da heute an einen modernen Biomarker auch die Anforderung gestellt wird, dass die Rolle, die ein Biomarker in einer Erkrankung spielt, bekannt ist (Kaulen, 2007). Damit sollten in dieser Arbeit potentielle Biomarker identifiziert werden, die das Potential besitzen, in nachfolgenden Studien an großen Patientenkollektiven erfolgreich validiert zu werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Software, Chemikalien und Lösungsmittel

3.1.1 Geräte

ABIPRISM™310Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Forster City, CA, USA
ACQUITY-UPLC mit AccQ Tag-UPLC Säule (reverse phase c18 particle 1,9 µm)	Waters	Eschborn, Deutschland
Agilent 6490 Triple Quadrupol (QQQ) Massenspektrometer	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Analytic AC 120 S	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Axiovert 100 TV	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Axiovert 25	Zeiss	Göttingen, Deutschland
Bandlin SONAPULS HD2070	BANDELIN electronic	Berlin, Deutschland
BlueMarine 100	SERVA Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
BluePower Plus	SERVA Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad	München, Deutschland
Calibration Check pH-Meter HI 221	Hanna Instruments	Kehl am Rhein, Deutschland
Casy 1 TT	Schärfe System GmbH	Reutlingen, Deutschland
Centrifuge 5415 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Cytair	Equipements Scientifiques & Industriels s.a.	Garches, Frankreich
Digital Heatblock II	VWR	Darmstadt, Deutschland
Disruptor Genie	Scientific Industries	New York, NY, USA
E 2000 D	Sartorius	Göttingen, Deutschland
EPS 600	GE Healthcare	München, Deutschland
Ettan DALT II System	GE Healthcare	München, Deutschland
Ettan IPGphor 3	GE Healthcare	München, Deutschland
Gel iX Imager	Intas	Göttingen, Deutschland
GenePulserIIElectroporation System	Bio-Rad	München, Deutschland
Harvard PicoPlus 11 Syringe Pump	Jarvard Apparatus	Holliston, MA, USA
Hera Cell Inkubator	Heraeus	Hanau, Deutschland
Hera Safe	Heraeus	Hanau, Deutschland
Herafreez	Heraeus	Hanau, Deutschland
Herasafe HSP 15	Heraeus	Hanau, Deutschland
IEC Micromax RF	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
IKAMAG RCT Magnetrührer	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
infinite M200	Tecan	Crailsheim, Deutschland
Kopf UW 2070	Bandelin electronic	Berlin, Deutschland
Labor-pH-Meter 765	Knick	Berlin, Deutschland
Light Cycler iQ5	Bio-Rad	München, Deutschland

LTQ Orbitrap Velos	Thermo Scientific	San Jose, CA, USA
LTQ Velos Pro	Thermo Scientific	San Jose, CA, USA
Magnetrührer MR 2002	Heidolph	Schwabach, Deutschland
MaXis 4G	Bruker Daltonik	Bremen, Deutschland
MC1 Analytic AC 120 S Waage	Satorius	Göttingen, Deutschland
Megafuge 1.0	Heraeus	Hanau, Deutschland
Micro Zentrifuge	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Milli-Q biocel	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
MR 2002	Heidolph	Schwabach, Deutschland
NanoDrop ND-1000	peqLab	Erlangen, Deutschland
Nicool LM10	Air Liquide	Düsseldorf, Deutschland
Novex Mini-Cell	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
OPTIMAX X-Ray Film Processor 1170-1-0000	PROTEC Medizintechnik GmbH & Co. KG	Oberstenfeld, Deutschland
Orbi Elite	Thermo Scientific	Bremen, Deutschland
PALM Axiovert 200M	Carl Zeiss Microscopy	Göttingen, Deutschland
Pipetboy	IBS Integra Bioscience	Fernwald, Deutschland
Polymax 1040	Heidolph	Schwabach, Deutschland
PowerPac HC	Bio-Rad	München, Deutschland
Pipette Reference 0,1 – 2,5	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette Reference 0,5 – 10	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette Reference 10 – 100	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette Reference 100 – 1000	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipette Reference 2 – 20	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Shaker ST5	CAT	Staufen, Deutschland
Sorvall RC 5B Plus	Du Pont	Neu-Isenburg, Deutschland
Speedvac concentrator 5301	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
ST 5	Ingeneurbüro CAT, M. Zipperer GmbH	Staufen, Deutschland
Stab SH 70G	Bandelin electronic	Berlin, Deutschland
Sub-Cell GT	Bio-Rad	München, Deutschland
SX 250 Power Supply	Hoefer	Holliston, MA, USA
Trans-Blot SD Semidry Transfercell	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
Typhoon 9410	GE Healthcare	München, Deutschland
Ultimate 3000 RSLCnano System	Dionex	Idstein, Deutschland
U3000 LC System	Dionex	Idstein, Deutschland
Unimax 1010	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad Branson 220	Branson Ultraschall	Dietzenbach, Deutschland
Ultraflex III	Bruker Daltonik	Bremen, Deutschland
UltraflexXtreme	Bruker Daltonik	Bremen, Deutschland
Vacusaft comfort	IBS Integra Biosciences	Fernwald, Deutschland

Varioklav	Thermo Scientific	Schwerte, Deutschland
Versorgung HD2070	Bandelin electronic	Berlin, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific-Industries	Bohemia, NY, USA
XCell4 SureLock Midi-Cell	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland

3.1.2 Chromatographiesäulen

25 cm reversed-phase Viper Acclaim PepMap100 C18 Säule (300 µm i.d. x 5 mm) 100 A	Dionex	Idstein, Deutschland
50 cm reversed-phase Acclaim PepMap RSLC C18 Säule, 2 µm, 100 A (75 µm i.d. x 5 mm) nanoViper	Dionex	Idstein, Deutschland
Acclaim PepMap100, 75 µm x 25 cm, 2 µm particles C18, 3 µm, 100 A	Dionex	Idstein, Deutschland
Acclaim PepMap, 75 µm x 25 cm, 2 µm, 100 A,	Dionex	Idstein, Deutschland
Acclaim PepMap100, 75 µm x 25 cm, 5 µm particles C18, 100 A, 300 µm i.d. x 5 mm	Dionex	Idstein, Deutschland

3.1.3 Software

Bioedit Version 7.0.4.1	Bioedit	Manchester, UK
BioTools 3.2	Bruker Daltonik	Bremen, Deutschland
Chromeleon 6.8 SR8	Dionex	Idstein, Deutschland
CloneManager 8	Scientific&Educational Software	Cary, NC, USA
Compass 1.3 for micOTOF-SR1 Software	Bruker Daltonik	Bremen, Deutschland
Delta2D	Decodon	Greifswald, Deutschland
Excel 2007	Microsoft	Redmond, WA, USA
Excel 2013	Microsoft	Redmond, WA, USA
Flex Analysis 3.3	Bruker Daltonik	Bremen, Deutschland
Flex Control 3.3	Bruker Daltonik	Bremen, Deutschland
ImageJ	National Institute of Health	Bethesda, MD, USA
ImageQuant TL v2003	GE Healthcare	München, Deutschland
Ingenuity Pathway Analysis	Qiagen	Redwood City, CA, USA
Mass Hunter Optimizer for Peptides B.05.00	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Mass Hunter Quantitative Analysis B.04.00	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Mass Hunter Workstation B.04.01	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Mass Hunter Workstation B.05.00	Agilent Technologies	Santa Clara, CA, USA
Matthew Monroe's Molecular Weight Calculator	Matthew Monroe	Richland, WA, USA
OriginPro 8.6	OriginLab Corporation	Northampton, MA, USA
Photoscape	MOOII Tech	Korea

Photoshop CS5.1	Adobe	Mountain View, CA, USA
PIA Protein Interference Algorithmus	Medizinisches Proteom Center	Bochum, Deutschland
Powerpoint 2007	Microsoft	Redmond, WA, USA
Primer3Web Frodo.wi.mit.edu/primer3/	Howard Hughes Medical Institute und National Institutes of Health	Chevy Chase, MD Bethesda, MD, USA
Progenesis LC-MS Verison 4.1.483242146	Nonlinear Dynamics	Newcastle, UK
Proteinscape 2.0	Bruker Daltonic	Bremen, Deutschland
Protoem Discoverer 1.3 Version 1.3.0.399	Thermo Scientific	Bremen, Deutschland
SPSS 15.0	SPSS	Chicago, IL, USA
Visual Studio 2010	Microsoft	Redmond, WA, USA
Word 2007	Microsoft	Redmond, WA, USA
Word 2013	Microsoft	Redmond, WA, USA

3.1.4 Datenbanken

ENSEMBL Datenbank	http://www.ensembl.org
ExPasy peptide Cutter	http://web.expasy.org/peptide_cutter/
Mascot Datenbanksuche	http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF
Mascot Datenbanksuche	http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS
NCBI Nucleotide Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
NCBI Protein Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Uniprot/Swissprot 2.3.02	http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html
Uniprot	http://www.uniprot.org/

3.1.5 Chemikalien und Lösungsmittel

2-Mercaptoethanol	Bio-Rad	München, Deutschland
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)	Bio-Rad	München, Deutschland
6-Aminoquinoyl-N-hydroxy-succinimidyl-carbamat (AccQ Tag Ultra)	Waters	Eschborn, Deutschland
Aceton	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Acetonitril (CHROMASOLV)	Riedel-de Haen	Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)	Bio-Rad	München, Deutschland
Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Aluminiumkaliumsulfat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ammoniumhydrogencarbonat (pro analysis)	Fluka	Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ammoniumhydrogenphosphat	Fluka	Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat	BioRad Laboratories	München, Deutschland
Ammoniumsulfat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Roth	Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Bio-Rad	München, Deutschland
Bacto-Agar	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Bacto-Trypton	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Bio-Rad	München, Deutschland
CHAPS	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
Chloralhydrat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Chloroform	VWR	Darmstadt, Deutschland
Citrat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Coomassie	Bio-Rad	München, Deutschland
Coomassie Brilliant-Blau (R-250)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
D(+)-Saccharose	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Diethyldicarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) (>99,5%)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT) (für die Molekularbiologie)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100% (Rotipuran)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (EMSURE)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Bio-Rad	München, Deutschland
Formaldehyd >35% (reinst)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Formamid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
FuGene HD	Roche	Grenzach, Deutschland
G418	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycerol wasserefrei (Rotipuran >99,5%)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycin (Electran)	VWR	Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Hefeextrakt	Roth	Karlsruhe, Deutschland

HPLC-Wasser	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Iodacetamid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
IPG Buffer pH 3 – 11 NL	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Isopropanol (AnaIR NORMAPUR)	VWR	Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (pro analysis)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Kristallviolett	Riedel-de Haen	Taufkirchen, Deutschland
Kristallviolett	Merck	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Ultra)	Fluka	Taufkirchen, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (pro analysis)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR	Darmstadt, Deutschland
Methanol (AnaIR NORMAPUR)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Natriumcarbonat (BioXtra , >99,0%)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid , >99,5%	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Natriumdioxycholat	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Natrium-Iodat	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Natriumthiosulfat-Pentahydrat >99,5%	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
NuPAGE MOPS SDS-Running Buffer	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
Pepton	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Phenolkristalle	Fluka	Taufkirchen, Deutschland
Polyacrylamid	Applichem	Darmstadt, Deutschland
Puromycin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Silbernitrat (ReagentPlus, >99%)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (20%)	Bio-Rad	München, Deutschland
TCEP Bond-Breaker stock solution	Thermo Fisher Scientific	Pittsburgh, PA, USA
TEMED	GE Healthcare	München, Deutschland
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Thioharnstoff	Roth	Karlsruhe, Deutschland
TPCK Trypsin	Worthington Biochemical Corporation	Lakewood, NJ, USA
Tris (Ultrapure >99,9%)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Triton X-100	Bio-Rad	München, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Bio-Rad	München, Deutschland
Xylencyanol	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

3.1.6 Kits

BigDyeTerminatorv1.1.Cycle Sequenzig Kit	Applied Biosystems	Carlsbad, CA, USA
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche	Mannheim, Deutschland
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad	München, Deutschland
Novex Sharp Protein Standard	Invitrogen	Darmstadt, Deutschland
PCR Mycoplasma Test Kit	Promokine	Heidelberg, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific	Bonn, Deutschland
Protein Assay	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
QIAamp DNA Minikit	Qiagen	Hilden, Deutschland
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
Quick Start Bovine Serum Albumin (BSA) Standard	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
Reverse Transcription System	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
Reverse Transcription System	Promega	Madison, WI, USA
SbyrGreen Mastermix	Bio-Rad	München, Deutschland
SuperSignal West Femto	Thermo Fisher Scientific	Bonn, Deutschland
SureSilencingshRNAPlasmid for Human TTC38	Qiagen	Hilden, Deutschland
Trizol Reagent	Ambion (invitrogen)	Darmstadt, Deutschland
Terminator Ready Reaction Mix	Applied Biosystems	Forster City, CA, USA
XTT Cell Proliferation Kit II Version 17	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
DAKO protein block serum free	Dako	Hamburg, Deutschland
Dako Envision premade biotin-free enhancer solution for detection of mouse and rabbit primary Abs	Dako	Hamburg, Deutschland
Dako Liquid DAB Substrate Chromogen System Kit	Dako	Hamburg, Deutschland
GE CyDye DIGE Fluor Labeling Kit	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific	Rockford, IL, USA

3.1.7 weitere Reagenzien

Tissue Tec O.C.T	Sakuro	Alphen aan den Rijn, Niederlande
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche	Mannheim, Deutschland
Biospiestanzten	Pfm Medical AG	Köln, Deutschland
Casyton	Schärfe Systems GmbH	Reutlingen, Deutschland
Protein low-bind Tubes	Qiagen	Hilden, Deutschland
Peptide calibration Standard	Bruker Daltonics	Bremen, Deutschland
Pierce Aminoacid Standard	Thermo Scientific	Bremen, Deutschland
18%iges TGX Gel	Anamed	Groß-Bieberau/Rodau, Deutschland
Millipore Amicon Ultra-4 centrifugal filter units,	Electrophoreses GmbH	Billerica, MA, USA
	EMD Millipore	

10.000 MWCO	Corporation	
Waters oasis 69 well μ Elution Plates (30 μ g Sorbent) with HBL Media	Waters	Eschborn, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Novex NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Polyvinylidene Fluorid Membran	Millipore Cooperation	Bedford, MA, USA
Amershan Hyperfilms	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Milchpulver	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
TRIzol Reagenz	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
SYBR-Green Mastermix	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
shRNA Plasmid pGeneClip	promega	Madison, WI, USA
pCMV6-AC	OriGene Technologies	Rockville, MD, USA
BD BioCoat Growth Factor Reduced Matrigel	BD Biosciences	Bedford, MA, USA
Invasion Chamber		
VitroClud	Langenbrinck	Emmendingen, Deutschland

3.1.8 Puffer und Lösungen

Lysepuffer	30 mM Tris-HCl 2M Thiourea 7M Harnstoff 4% CHAPS pH 8,0
10-fach SDS-Puffer	250ml 20%SDS 150g TRIS 720g Glycin Ad 5 l Aqua Bidest
Rehydrierungspuffer	7mM Harnstoff 2 M Thiourea 2 % (w/v) CHAPS 1 % DTT 1 % IPG Buffer pH 3 – 11 NL 0,002 % Bromphenolblau
Equilibrierungspuffer I	50 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 360,5 g Harnstoff 306 ml Glycerin 100 ml SDS (20 %) 10 g DTT Bromphenolblau Ad 1l Aqua Bidest

Equilibrierungspuffer II	50 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 360,5 g Harnstoff 306 ml Glycerin 100 ml SDS (20 %) 5 g DTT Bromphenolblau Ad 1l Aqua Bidest
Fixierlösung	45 % Methanol 5 % Essigsäure 50 % Aqua Bidest
Natriumthiosulfatlösung	0,02 % (Protokoll Silberfärbung)
Silbernitratlösung	0,1 % (Protokoll Silberfärbung)
Entwicklungslösung für die Silberfärbung von Gelen	0,04 % Formaldehyd 2 % Natriumcarbonat
Stopplösung für die Silberfärbung von Gelen	1% Essigsäure Ad 1 l Aqua Bidest
Entfärberlösung für Silbergele	15 mM Natriumthiosulfat 50 mM Kaliumhexacyanoferrat III
Waschlösung A für Silbergefärbte Gelspots	10 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Waschlösung A für Silbergefärbte Gelspots	5 mM Ammoniumhydrogencarbonat 50 % Acetonitril
Trypsinlösung	25 µg/ml Trypsin 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Waschlösung für die Targetpräparation	10 mM Ammoniumhydrogenphosphat 0,1 % Trifluoressigsäure
Denaturierungspuffer	8 M Harnstoff 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat
Worthington TPCK Trypsinlösung	0,9 mg Trypsin Ad 1 ml 10 mM CaCl ₂ -dihydrat/15mM Ammoniumhydrogencarbonat
Natriumdioxycholatlösung	200 mg Natriumdioxycholat Ad 2 ml 25mM Ammoniumhydrogencarbonat
TCEP Lösung	100 µl 0,5 M TCEP Bondbreaker stock solution 900 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Iodacetamidlösung	36,992 mg Iodacetamid Ad 2 ml 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat

Western Blot Transferpuffer	5,82 g Tris 2,92 g Glycine 1,86 ml SDS (20%) 200 ml Methanol Ad 1000ml Aqua Bidest
4 x SDS-Probenpuffer	20ml SDS (20%) 50ml 0,5M Tris-HCl pH 6.8 40 ml Glycerin 0,002 % Bromophenol Blau 10 % β -Mercaptoethanol Ad 100 ml Aqua Bidest
TBS-T	0,5 M NaCl 1 M Tris pH 7,5 0,5 % Tween
Citratpuffer	2g Citronensäure ad 1000 ml Aqua Bidest 5M NaOH ad pH 6,0
PBS	160 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 M NaCl
DEPC Wasser	0,1% (w/v) DEPC in Aqua Bidest
TBE Puffer	89 mM Tris 2 mM EDTA 89 mM Borsäure Ad pH 8,3
Mayers Hamalaun-Lsg.	1 g Hamatoxylin 200 mg Natrium-Iodat 50 g Aluminiumkaliumsulfat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure Ad 1000 ml Aqua Bidest

3.1.9 Medien und Zusätze für die Zellkultur

RPMI 1640	Gibco Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
DMEM (low glucose)	Gibco Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
FCS	Gibco Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Gibco Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Penicillin	Gibco Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Streptomycin	Gibco Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco Life Technologies	Darmstadt, Deutschland

3.1.10 Medien zur Anzucht und Kultivierung von E.coli

LB-Medium	10 g Natriumchlorid 10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt Ad 1000 ml Aqua Bidest (pH 7.4)
LB-Agar	10 g Natriumchlorid 10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 15 g Bacto-Agar Ad 1000 ml Aqua Bidest (pH 7.4)
SOC-Medium	10 g Hefeextrakt 20 g Bacto-Trypton 10 mM Natriumchlorid 2.5 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 20 mM Glucose Ad 1000 ml Aqua Bidest (pH 7.0)

3.2 Klinisches Patientenmaterial

3.2.1 Kryokonserviertes Gewebe für die 2D-DIGE und nachfolgende Western Blot Analysen

Die in dieser Arbeit durchgeführten 2D-DIGE Analysen wurden an Prostatektomieproben aus den Unikliniken Dresden und Aachen durchgeführt. Hierzu wurden 12 Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv, 11 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv sowie 14 korrespondierende tumorfreie Prostatektomieproben analysiert. Soweit möglich wurden für beide Tumorgruppen (mit und ohne Rezidiv im Follow-up) Alters-, Tumorstadium- und Gleasonscore-angepasste Patientenproben verwendet. Patienten, die vor der Prostatektomie therapiert wurden, wurden von der Studie

ausgeschlossen. Alle Proben wurden zwischen 1998 und 2010 entnommen. Details sind im Anhang in Tabelle 7.1 dargestellt. Positive Ethikvoten der Ethikkommissionen der jeweiligen Unikliniken lagen vor (Ethikvotum Aachen: EK 206/09, Ethikvotum Dresden: EK194092004 und EK195092004).

Die Patientenproben wurden nach der Resektion in Stickstoff eingefroren und gelagert. Die Klassifikation der Tumore erfolgte durch Pathologen nach dem etablierten UICC TNM-System (Wittekind C, 2005). Aufgrund geringer Probenmengen konnten nachfolgende Western Blot Analysen nicht immer mit dem identischen Patientenkollektiv durchgeführt werden. Details der für die Western Blot verwendeten Patientenproben sind im Anhang in Tabelle 7.2 und Tabelle 7.3 aufgeführt.

3.2.2 Formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe (FFPE)

Immunhistochemische Analysen wurden an Formalin fixiertem und paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe des Universitätsklinikums Dresden durchgeführt. Die Proben wurden in den Jahren 1998 bis 2010 entnommen und am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Dresden formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Patienten mit neoadjuvanter Therapie wurden von den Studien ausgeschlossen. Positive Ethikvoten für die Verwendung des Gewebes von den Ethikkommissionen des Universitätsklinikums Dresden lagen vor (EK194092004 und EK195092004). Die Klassifikation der Tumore erfolgte durch Pathologen nach dem etablierten UICC TNM System (Wittekind C, 2005). Details zum verwendeten Patientenkollektiv sind im Anhang in Tabelle 7.4 und Tabelle 7.5 aufgeführt.

3.2.3 Tissue Micro Arrays (TMA) für Immunhistochemische Analysen

Die Tissue Micro Arrays (TMA) für immunhistochemische Analysen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. Glen Kristiansen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Studie wurde vom *Institutional Review Board* (IRB) des Universitätsklinikums Bonn genehmigt. Die Proben wurden in den Jahren 2004 bis 2007 an der Universitätsklinik Bonn entnommen. Die Herstellung der TMAs erfolgte wie bereits von Kallioniemi und Mortezaei beschrieben (Mortezaei et al., 2011; Kallioniemi et al., 2001). Ausführliche Patientencharakteristika sind im Anhang in den Tabelle 7.6 bis Tabelle 7.8 dargelegt.

3.3.4 Urin- und Serumproben des Universitätsklinikums Aachen zur Verwendung in Validierungsexperimenten

Für Western Blot Analysen und die Flüssigchromatographie-Multiple Reaction Monitoring-MS (LC-MRM-MS) wurden Urin- und Serumproben des Universitätsklinikums Aachen verwendet. Die Proben wurden in den Jahren 2005 bis 2010 in der Klinik für Urologie entnommen und im Institut für Pathologie gesammelt, aufgearbeitet und gelagert. Ein Ethikvotum der Ethikkommission lag vor (Ethikvotum Aachen:

EK 206/09). Patientencharakteristika sind im Anhang in den Tabelle 7.9 bis Tabelle 7.11 näher beschrieben.

Serum- und Urinproben wurden nach der Entnahme in Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.4 Serumproben des Universitätsklinikums Bonn zur Verwendung in LC-MRM-MS-Analysen

Die in den LC-MRM-MS-Versuchen verwendeten Serumproben aus Bonn wurden freundlicherweise von PD Dr. med. Jörg Ellinger (Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden in den Jahren 2000 bis 2008 in der Klinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Bonn gesammelt. Ein positives Ethikvotum für die Durchführung der LC-MRM-MS Versuche lag von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn liegt vor (EK 340/12). In der durchgeführten Studie wurden nur Patienten mit Prostatakarzinom eingeschlossen, die vorher keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Ausschlusskriterium waren unvollständige Follow-up Daten oder kurze Follow-up Zeiten (< 2 Jahre bei Nichtauftreten eines Rezidivs). Klinikopathologische Charakteristika des verwendeten Patientenkollektivs sind im Anhang in Tabelle 7.12 aufgeführt. Das für die LC-MRM-MS Versuche verwendete Patientenkollektiv "Serum" setzt sich zusammen aus dem Patientenkollektiv "Serum Bonn" und dem Patientenkollektiv "Serum Aachen".

3.3 Manuelle Mikrodisektion und Probenvorbereitung für die zwei-dimensionale *Differences in Gel Electrophoresis* (2D-DIGE) sowie für Western Blot Analysen

Alle kryokonservierten Gewebeproben wurden bei -80°C bis zur RNA- und Proteinisolation gelagert. Proteine für die 2D-DIGE-Analysen wurden aus einem 4 mm² großen und 14 µm dicken kryokonserviertem Schnitt mit mindestens 80%igem Drüsenanteil isoliert. Das während der Einbettung und dem Einfrieren genutzte *TissueTec® O.C.TTM Compound* (Sakuro, Alphen aan den Rijn, Niederlande) wurde durch Inkubation in 70%igem Ethanol entfernt. Anschließend erfolgte die Färbung der Schnitte durch Inkubation in Aqua bidest, Hämalun, erneutem Aqua bidest und 70%igem Ethanol. Alle Lösungen wurden mit *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben versetzt (eine Tablette auf 50 ml Lösung). Das Gewebe, das von Interesse war, wurde durch Verwendung des Lasers vom PALM Axiovert 200M (Carl Zeiss Microscopy, Göttingen, Deutschland) markiert und anschließend manuell mikrodisektiert. Die Zellen wurden in 10 µl Lysepuffer (30mM TrisCl, 2 M Thiourea, 7 M Harnstoff, 4% (w/v) CHAPS; pH 8,0) aufgenommen. 10-15 *Glass beads* mit einem Durchmesser von 0,5 mm (Scientific industries, New York, USA) wurden den Proben hinzugegeben. Es folgte der Zellaufschluss mittels *Disruptor Genie* (Scientific industries, New York, USA)

für 15 Minuten bei 3000 rpm. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13.000 g, 15 Minuten, 4°C) und der Überstand bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4 Proteombasierte Methoden

3.4.1 Herstellung von 2D-SDS-Polyacrylamidgelen

Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurden SDS-Polyacrylamidgele der Größe 20 cm x 24 cm verwendet. Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten mit absolutem Ethanol erfolgte das Gießen der Gele in einer Ettan Dalt Kammer (GE Healthcare, München, Deutschland). Pro Gel wurden 31,25 ml Polyacrylamid (Applichem, Darmstadt, Deutschland), 25 ml Tris-HCl pH 8,8, 500 µl 20%iges SDS (Bio-Rad Laboratories, München) 42,25 ml AquaBidest, 500µl 10%iges Amoniumpersulfat (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) und 33 µl TEMED (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Die Gele wurden mit Isopropanol überschichtet. Nach Ausbildung einer geraden Gelkante, jedoch vor dem Austrocknen der Gele, wurde Isopropanol durch 1%igen SDS Puffer ersetzt. Die Gele polymerisierten über Nacht bei Raumtemperatur (RT) aus.

3.4.2 Sättigungsmarkierung von Proteinen und 2-dimensionale *Difference in Gel Electrophoresis* (2D-DIGE)

Die manuell mikrodissoziierten Proteinlysate wurden mit 2mM Cy5 (GE CyDye DIGE Fluor Labeling Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) nach Herstellerangaben gelabelt. Ein Pool aus allen Patientenproben diente als interner Standard. Für jedes Gel wurden 5 µg von diesem internen Standard mit 2mM Cy3 gelabelt. Nach dem Mischen von jeweils einer Cy5 gelabelten Patientenprobe mit 5µg Cy3 gelabelten Standard wurden die Proben mit Rehydrierungspuffer (7mM Harnstoff, 2 M Thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 1% DTT, 1% IPG Buffer pH 3-11 NL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), 0,002% bromphenol blau) auf ein Gesamtvolumen von 450 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der 24 cm IPG-Streifen (pH3-11, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) mit der Probenlösung über Nacht abgedunkelt bei RT. Die IPG-Streifen wurden am nächsten Tag in die isoelektrische Fokussiereinheit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) überführt und für 16-24 Stunden nach folgendem Programm fokussiert:

Spannung [V]	Modus	Dauer [h]
350	Step	0,5
500	Gradient	1
1500	Gradient	1
1500	Step	7
3500	Gradient	6
3500	Step	bis zum Erreichen von ca. 50 kV*h

Bei Bedarf konnten die Streifen nach diesem Schritt bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren werden. Nach dem Auftauen erfolgte bei RT die Equilibrierung der Streifen für 20 Minuten mit Equilibrierungspuffer 1 (50 ml 0,5 M Tris-HCL pH 6,8, 360,5 g Harnstoff, 306 ml Glycerin, 100 ml SDS (20%), 10g Dithiothreitol (DTT), Bromphenolblau, Aqua bidest ad 1 l), gefolgt von einer 20minütigen Inkubation in Equilibrierungspuffer 2 (50 mL 0,5 M Tris-HCL pH 6,8, 360,5 g Harnstoff, 306 ml Glycerin, 100 ml SDS (20%), 5g DTT, Bromphenolblau, Aqua bidest ad 1 l). Damit war die Vorbereitung der Streifen für die zweite Dimension abgeschlossen. Die Streifen wurden luftblasenfrei auf die vorbereiteten Gele (siehe Kapitel 3.4.1 Herstellung von 2D-SDS-Polyacrylamidgelen) aufgelegt und mit 2% Agarose in SDS-Puffer mit 0,02% Bromphenolblau überschichtet. Die Gele wurden in die mit 7l 1x SDS Puffer gefüllte Gellaufkammer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) überführt, mit 2x SDS-Puffer aufgefüllt und über Nacht bei 65V bis zum Erreichen des Gelendes durch die blaue Bromphenollauffront elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele am Typhoon 9410 Fluoreszenzscanner (GE Healthcare, UK) visualisiert. Die Extinktions/Emissionswellenlängen betrugen dabei 554/575 nm für Cy3 und 648/663 nm für Cy5. Die Auflösung des Scanns betrug 100 microns bei 550V.

3.4.3 Gelauswertung und statistischen Analysen der 2-dimensionale *Difference in Gel Electrophoresis* (2D-DIGE)

Die Gelauswertung und statistischen Analysen wurden mit der Software Delta 2D 4.0 (Decodon, Greifswald, Deutschland) dem durch die Software vorgegebenem Arbeitsablauf folgend durchgeführt. Die 2D-Gelbilder wurden hierbei zu einem Fusionsbild überlagert. Auf diesem wurden dann die Spots identifiziert. Die Spotintensitäten wurden durch Normierung des jeweiligen Spots mit dem zugehörigen Spot des mitgelaufenen internen Standards berechnet. Spots mit einem *fold change* von Mindestens 1,5 zwischen beiden Tumorgruppen (mit und ohne Rezidiv) bzw. zwischen Tumor- und Normalgewebe wurden für statistische Analysen weiterverwendet. In der durchgeführten Studie wurden sowohl ein U- als auch ein T-Test verwendet, da in der Literatur umstritten ist, welcher Test die geeignetere Analyseemethode ist. So finden in bereits veröffentlichten Studien sowohl T-Tests (Corona et al., 2010), als auch U-Tests (Hosako et al., 2012; Oshita et al., 2010) Anwendung. Für diese Studie wurden daher

Spots als signifikant dereguliert definiert, die entweder im Students T-Test (als nicht parametrischen Test) oder im Mann-Whitney U-Test (als parametrischen Test) einen p-Wert < 0,05 aufwiesen.

3.4.4 Herstellung präparativer 2D-Gele

Für die Herstellung präparativer 2D-Gele wurden 400-600 µg Protein mit Rehydrierungspuffer auf 450 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden 24 cm IPG Streifen pH3-11 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) mit der Probe über Nacht bei Raumtemperatur rehydriert. Die folgende isoelektrische Fokussierung und zweite Dimension der Elektrophorese wurden wie oben beschrieben (3.4.3 Sättigungsmarkierung von Proteinen und 2-dimensionale *Difference in Gel Electrophoresis* (2D-DIGE)) durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in Fixierlösung (45% Methanol / 5% Essigsäure / 50% Wasser) überführt und für mindestens 30 Minuten (alternativ über Nacht) inkubiert.

3.4.5 Silberfärbung präparativer 2D-Gele

Nach der Fixierung der präparativen 2D-Gele in Fixierlösung (45% Methanol / 5% Essigsäure / 50% Wasser) wurde die Essigsäure durch mindestens dreimaliges 20minütiges Waschen mit Wasser entfernt. Anschließend wurden die Proteine durch eine 1-2minütige Inkubation mit 0,02% Natriumthiosulfatlösung sensibilisiert. Nach dem zweimaligen Waschen mit Wasser für je eine Minute erfolgte die Färbung mit 0,1%iger gekühlter Silbernitratlösung für 30 Minuten. Nach erneutem zweimaligem Waschen für jeweils eine Minute mit Wasser wurden die Gele mit 0,04% Formaldehyd / 2% Natriumcarbonatlösung entwickelt. Bei Erreichen der gewünschten Färbeintensität wurde die Reaktion mit 1%iger Essigsäure abgestoppt und die Gele in dieser Lösung aufbewahrt.

3.4.6 Tryptischer Verdau der zu identifizierenden Gelspots

Zur Proteinidentifikation wurden die mittels 2D-DIGE identifizierten signifikant deregulierten Proteine aus einem präparativen 2D Gel mit einer Biopsiestanze (pfm Medical AG, Köln, Deutschland) ausgestochen und in *Protein low-bind Tubes* (Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt. Die aus den Silbergelen ausgestochenen Spots wurden mit einer Lösung aus 15 mM Natriumthiosulfat und 50 mM Kaliumhexacyanoferrat III entfärbt. Anschließend wurden alle Spots vier- bis fünfmal alternierend mit 10 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung und 5 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung mit 50% Acetonitril gewaschen. Es folgte die vollständige Trocknung in der Vakuumzentrifuge. Die Spots konnten so bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt werden.

Sowohl für die MALDI-TOF als auch für die LC-MS Identifikation der Proteine wurden die in den Spots enthaltenen Proteine im nächsten Schritt mit dem Enzym Trypsin zu Peptiden verdaut. 100 µg

Trypsinlyophilisat wurden in 100 µl 50 mM Essigsäure gelöst und aliquotiert weggefroren. Bei Bedarf wurden auf jeden Spot 2 µl der 25 µg/ml Lösung von Trypsin in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung (Promega, Madison WI, USA) hinzugegeben. Um eine vollständige Durchtränkung des Spots mit Trypsin zu gewährleisten, wurde ggf. noch weitere 3 µl 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung auf den Spot gegeben, bis dieser durchsichtig wurde. Der Trypsinverdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Proteinspots, welche mittels LC-MS identifiziert wurden, wurden von Frau Kathrin Lüdemann und Frau Dr. rer. nat. Hanna Diehl am Medizinischen Proteomcenter (MPC) in Bochum (Ruhruniversität Bochum) tryptisch verdaut.

3.4.7 Proteinidentifikation mittels *Matrix assisted laser desorption ionization time of flight* (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (MS) und MS/MS

Zur Identifikation der Proteine mittels MALDI-TOF mussten die tryptisch verdauten Proteine zunächst aus dem Gelspot extrahiert werden. Hierzu erfolgte die Zugabe von 0,1%iger Trifluoressigsäurelösung (TFA) zum Gelspot. Während der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Matrix für die Dünnschichtpräparation zur MALDI-TOF Identifikation der Proteine vorbereitet. Hierzu wurden 10-20 mg *Alpha-cyano-4-hydroxycinnamicacid* (Alpha-Cyanohydroxymizsäure, CHCA, Sigma-Aldrich, USA) in 1,5 ml 97% Aceton mit 0,1% TFA gelöst und für 10 Minuten im Ultraschallbad sonifiziert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde die Matrix auf das *Anchor-Chip Target* aufgebracht. Pro Proteinspot wurde 1 µl Peptid-TFA Lösung auf die Matrix von drei Targetspots aufgetragen und ko-kristallisiert. Zusätzlich wurde 0,5 µl *Peptide calibration standard* von Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland) auf die Zwischenpositionen des Targets aufgetragen. Es folgte das Waschen der aufgetragenen Peptide mit 10 mM Ammoniumhydrogenphosphat in 0,1%iger Trifluoressigsäure. Die Messung und Identifikation der Proteine wurde am Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) des Deutschen Wollforschungszentrum an der RWTH Aachen oder alternativ am Ultraflex III des medizinischen Proteomcenters in Bochum durchgeführt. Bei Ultraflex extreme wurden Massen im einem Bereich von 700 – 3500 Da bei einer Laserpower von 25% gemessen. Am Ultraflex III wurde die Laserpower nach Probemessungen des *Peptide calibration standard* jeweils so angepasst, dass die Besten Messergebnisse erzielt wurden. Die Spektren von 4000 Laserschüssen wurden dabei aufsummiert, wobei der Laser in zufälligen Bewegungen den zu messenden Spot abrastert. Für MS/MS Messungen wurden wenn möglich MS-Massen herausgesucht, die einen m/z zwischen 1200 m/z und 2500 m/z mit einer Peak-Intensität von 600 oder höher und einem Signal-zu-Hintergrund Verhältnis >5 aufwiesen. Ließen sich keine solche Massen finden, wurde der Massebereich auf alle gemessenen Werte erweitert. Die Auswertung der MS-Spektren erfolgte mit Hilfe der Software BioTools™ (Bruker Daltonics, Bremen) über „*Peptid-Mass Fingerprint*“ mit Hilfe des Mascot Servers über die Mascot Datenbanksuche (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2

&SEARCH=PMF). Die Auswertung der MS/MS Spektren erfolgte über den *Mascot MS/MS ion Search* über den Mascot Server (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS). Die Suchkriterien waren dabei wie folgt festgelegt: Precourser Masse 400 – 10.000 Da, Signal-zu-Hintergrund *Threshold* 1,5, Massentoleranz 5 ppm – 100 ppm und Fragment und Precourser Massentoleranz 0,4 Da. Trypsin wurde als Protease angegeben, wobei ein *missed cleavage* erlaubt war. Trypsinmassen wurden bei der Suche herausgefiltert. Ab einem dreimalig signifikanten Score der MS-Messungen oder einem signifikanten Score der Messungen sowohl in der MS- als auch in der MS/MS-Messung galt ein Protein als eindeutig identifiziert. Die MALDI-Messungen erfolgten teilweise durch Frau Dr. rer. nat. Hanna Diehl (MPC Bochum) und Frau Kathrin Lüdemann (MPC Bochum).

3.4.8 Proteinbestimmungen mittels Aminosäurenanalyse (ASA)

Um Proteine mittels LC-MS identifizieren zu können ohne die Chromatographiesäulen zu überladen, erfolgte vor der LC-MS eine Proteinbestimmung mittels Aminosäurenanalyse (ASA). Diese weist eine wesentlich höhere Genauigkeit auf als kolorimetrische Methoden wie der Bradfordassay. Diese Genauigkeit wird für die LC-MS Läufe benötigt. Die ASA wurde auf einer ACQUITY-UPLC mit AccQ Tag Ultra-UPLC Säule (reverse phase c18 particle 1,9 µm, Waters, Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Bei 150°C erfolgte die Hydrolyse der Peptidbindungen durch Zugabe von 1-2 Phenolkristallen und 300 – 500 µl HCl. Primäre und sekundäre Aminogruppen wurden anschließend mit dem Fluorophor 6-Aminoquinoyl-N-hydroxy-succinimidyl-carbamat (ACQ) derivatisiert. Die Derivate wurden über die C18 Säule aufgetrennt. Es folgte die Detektion der Derivate bei 395nm. Zusätzlich wurde Pierce Amino Acid Standard (Thermo Scientific, Bremen, Deutschland) als externer Standard mitdetektiert. Durch Abgleich der Signalintensitäten der Aminosäurederivate mit dem externen Standard erfolgte die Quantifizierung der jeweiligen Aminosäure. Die Probenvorbereitungen für die ASA wurden von Frau Kathrin Lüdemann (MPC Bochum) durchgeführt. Die ASA wurde am MPC Bochum durchgeführt von Frau Jale Stoutjesdijk und Frau Kathrin Barlog.

3.4.9 Proteinidentifikation mittels *Liquid-chromatographie Massenspektrometrie* (LC-MS)

Zur Identifikation der Proteine mittels LC-MS mussten die tryptisch verdauten Proteine zunächst aus dem Gelspot extrahiert werden. Hierzu wurden 10-20 µl Extraktionslösung (0,1%TFA/Acetonitril 1:1) auf den Spot gegeben und 15 Minuten im Eis-Wasser-gefüllten Ultraschallbad bei 50 Hz inkubiert. Der Überstand wurde in ein Probengefäß überführt. Auf den Spot wurden erneut 10-20 µl Extraktionslösung gegeben. Es folgte wiederum eine 15minütige Ultraschallbehandlung im Ultraschallbad. Anschließend wurde der Überstand zu dem ersten Überstand in das Probengefäß überführt. Der Ansatz wurde in der Speedvac concentrator 5301 (Eppendorf, Deutschland) vakuumzentrifugiert um Acetonitril zu entfernen.

Die übriggebliebene Peptidlösung wurde mit 0,1% TFA auf 17 ml aufgefüllt. Es folgte die LC-MS Messung auf einer LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, San Jose, USA). Die Proben wurden zunächst über eine Vorsäule (25 cm reversed Phase Viper Acclaim PepMap100 C18 Säule (300 μm i.d. x 5 mm), 100 $\text{\AA}$, Dionex, Idstein) und anschließend über eine Hauptsäule (Acclaim PepMap 100, 75 μm x 25 cm, 2 μm particles C18, 3 μm , 100 $\text{\AA}$, Dionex, Idstein) chromatographisch im Ultimate 3000 RSLCnano System (Dionex, Idstein) aufgetrennt. Die *FlowRate* betrug 0,4 $\mu\text{l}/\text{Minuten}$ bei einem linearen Gradienten von 4-35% Puffer B (84% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) für 65 Minuten. Die MS Analyse erfolgte im *FT-Master Scan Modus*. Die Kollisionsenergie betrug 35 eV mit einer Aktivierungszeit von 10 Sekunden. Die Intensitätscounts für die Auswahl zur MS/MS betrugen 500 counts bei einer dynamischen Exklusionszeit von 35 Sekunden. Die Auswahl der Peptide für die MS/MS erfolgte nach der TOP5 Methode, wonach die besten 5 Peptide mit der höchsten Intensität für die MS/MS ausgewählt wurden. Nach jeder Probenmessung erfolgte ein Spülschritt. Die Datenauswertung erfolgte mittels *Proteom Discoverer* 1.3 (Version 1.3.0.399; Thermo Scientific, Bremen) und der Mascot Datenbank (Version 2.3) als Suchmaschine über die UniprotKB/Swiss-Prot Datenbanksuche (Uniprot/Swissprot-Release 2012 02; 534.695 Einträge). Die Suchkriterien waren wie folgt festgelegt: Precourser Masse 400 – 10.000 Da, Signal-zu-Hintergrund *Threshold* 1,5, Massentoleranz 5 ppm und Fragment und Precourser Massentoleranz 0,4 Da. Trypsin wurde als Protease angegeben, wobei eine nicht erfolgte Spaltung (*missed cleavage*) erlaubt war. Oxidation von Methionin wurde als dynamische Modifikation erlaubt.

Nach dieser Messung nicht identifizierte Proteine wurden erneut ausgestochen und wie beschrieben aufgearbeitet. Die MS-Identifikation erfolgte anschließend auf einer LTQ Velos Pro (Thermo Scientific, San Jose) wie oben beschrieben. Im Gegensatz zum oben beschriebenen Protokoll wurde eine Acclaim PepMap RSLC, 75 μm x 25 cm, C18, 2 μm , 100 $\text{\AA}$ Säule (Dionex, Idstein) zur Analyse eingesetzt.

Zehn Proteine (siehe Tabelle 7.16 und Tabelle 7.17 im Anhang) wurden mit einer MaXis 4G (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) unter Kontrolle der *Compass 1.3 for micrOTOF –SR1 Software* (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) identifiziert. Die Maxis 4G war online an ein U3000 LC System (Dionex, Idstein, Deutschland) angeschlossen und wurde durch die Software *Chromeleon 6.8 SR8* gesteuert. Das U3000 LC System war mit einer 25 cm langen, auf 50°C erhitzten analytischen C18 Säule (ID 75 μm) ausgestattet. Die Analyse von 30 μl Probe aufgenommen in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) erfolgte bei einer Flussrate von 350 nl/min mit einem linearen Gradienten von 5 – 40% Acetonitril. Die MS-Analyse erfolgte bei einer Ion Spray Kapillar Spannung von 4.800 V und einem Gasfluss von 4 l/min. Die Proteinidentifikation erfolgte mit ProteinScape 2.0 (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) und der Mascot Datenbank (Version 2.3) als Suchmaschine über die UniprotKB/Swiss-Prot Datenbanksuche (Uniprot/Swissprot-Release 2012 02; 534.695 Einträge) unter Berücksichtigung folgender Suchkriterien: Als Protease wurde Trypsin angegeben wobei eine nicht erfolgte Spaltung (*missed cleavage*) erlaubt war. Variable Methionin Oxidation war erlaubt. Die Massentoleranz betrug 15 ppm für Peptid und 0,1

Da für die MS/MS Identifikation. Die Proben zur Proteinidentifikationen mittels LC-MS wurden von Frau Kathrin Lüdemann aufgearbeitet, von Frau Christina John gemessen und von Frau Dr. rer. nat. Hanna Diehl ausgewertet (alle MPC Bochum).

3.4.10 Identifikation differentiell regulierter Proteine mittels LC-MS und „Progenesis“

Zur Identifikation potentieller Zielproteine von TTC38 wurden Proteinlysate der einzelnen TTC38 Knockdownklone sowie der TTC38 Überexpressionsklone und jeweiliger zugehöriger Kontrollen mittels LC-MS analysiert. Ziel war es, so viele deregulierte Proteine wie möglich zu identifizieren. Hierzu wurden einmal 10 µg und einmal 20 µg Protein der in 2D-DIGE-Lysepuffer ohne CHAPS aufgenommen Proben kurz über ein sogenanntes *Short-Gel* (18%iges TGx Gel, Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau/Rodau) aufgereinigt. Diese Aufreinigung erfolgte analog zur Durchführung eines Western Blots, allerdings liefen die Proben nur für 15 Minuten bei 100 V in das Gel ein. Das Gel wurde anschließend Coomassie gefärbt, die Banden ausgeschnitten und wie in Kapitel 3.4.6 Tryptischer Verdau der zu identifizierenden Gelspots beschrieben, tryptisch verdaut. Die 10 µg Proben wurden mit den 20 µg Proben vereinigt. Es folgte eine ASA (siehe Kapitel 3.4.8 Proteinbestimmungen mittels Aminosäurenanalyse (ASA)). Je Probe wurden 300 ng Peptide über Vorsäule (300 µm I.d. x 5 mm, packed with Acclaim PepMap100 C18 5 µm, 100 Å (300 µm i.d. x 5 mm), 100 Å, Dionex, Idstein) und Hauptsäule (50 cm reversed-phase Säule Acclaim PepMap RSLC C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm i.d. x 50 cm, nanoViper, Dionex, Idstein) chromatographisch im Ultimate 300 RSLCnano System (Dionex, Idstein) aufgetrennt. Die Flussrate betrug 0,4 µl/Minute bei einem linearen Gradienten von 5-40% Puffer B (84% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) für 65 Minuten. Die massenspektrometrische Identifikation der Proben erfolgte auf einer Orbi Elite (Thermo Scientific, Bremen) im *TF Master Scan Modus* mit einer Auflösung von 60.000 bei 400 m/z. Die Kollisionsenergie betrug 35 eV mit einer Aktivierungszeit von 10 Sekunden. Kriterien zur Auswahl eines Peptides für die MS/MS waren mindestens 500 Zählungen dieses Peaks. Die Auswahl erfolgte nach der Top20 Methode. Die dynamische Exklusionszeit betrug dabei 30 Sekunden. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software Progenesis LC-MS Version 4.1.4832.42146 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). Die Daten der eingeladenen LC-MS Läufe wurden automatisch *aligned* und manuell überprüft. Der Alignmentscore musste mindestens 90% betragen. Die Bestimmung der Sensitivität der auszuwählenden und zu quantifizierenden Peaks erfolgte automatisch. Ein maximaler Ionenladungszustand von 5 wurde vorgegeben. Peaks der ersten 10 Minuten und nach Minute 113 des LC-MS Laufes wurden für die Auswertung ignoriert. Die Identifikation der Peptide erfolgte direkt von Progenesis aus über den *Proteom Discoverer* 1.3 (Version 1.3.0.399; Thermo Scientific, Bremen). Die variablen Modifikationen „Oxidation am Methionin“ und „Proinamide am Cystein“ waren erlaubt. Es wurden ausschließlich monoisotope Massen gesucht. Als Verdauenzym wurde Trypsin angegeben, wobei eine nicht erfolgte Spaltung (*missed cleavage*) erlaubt war. Für die Identifikation der Peptide war

eine Toleranz von 5 ppm erlaubt. Die MS/MS Tolearanz betrug 0,5 Da. Suchdatum war der 16.05.2013. Für alle Läufe wurden nach der Identifikation noch einmal MGFs der RAW-Dateien erstellt. Auch diese wurden mit den gleichen Einstellungen wie die Progenesis Suche über den MascotServer identifiziert. Auf PSM (*Peptide Spectrum Match*) Ebene wurde die *False discovery rate* (FDR) mit Hilfe des Programms PIA (Protein interference algorithmus, <http://www.medizinisches-proteom-center.de/index.php/de/software-top-de/165-protein-inference-algorithms-pia>) berechnet. Identifikationen mit einer FDR>1% wurden verworfen. Identifizierte Proteine, die mindestens zweifach signifikant zwischen verschiedenen Klongruppen dereguliert waren, wurden für weitere Analysen ausgewählt. Signifikanz war hierbei definiert als $p < 0,05$ in der ANOVA Analyse. Die Vorbereitung der aus Aachen stammenden Proteinlysate für die LC-MS Messungen erfolgte durch Frau Kathrin Lüdemann am MPC Bochum. Die Probenmessung erfolgte durch Frau Christina John am MPC Bochum. Die Auswertung der Messungen mit dem Programm Progenesis wurde von Frau Dr. rer. nat. Hanna Diel und Herrn Julian Uszokreit am MPC in Bochum durchgeführt.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Korrelationskoeffizienten zwischen der Expression von TTC38 und der Expression der als dereguliert zwischen den einzelnen Klongruppen identifizierten Proteine wurden als Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet.

3.4.11 Quantifizierung ausgewählter Proteine mittels Flüssigchromatographie-*Multiple Reaction Monitoring*-MS (LC-MRM-MS)

Zur Validierung ausgewählter Proteine im Urin und Serum als potentielle Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom wurde die Methode der Flüssigchromatographie-*Multiple Reaction Monitoring*-MS (LC-MRM-MS) verwendet. Für das LC-MRM-MS wurden so genannte Triple Quadrupol Massenspektrometer eingesetzt. Hierbei diente der erste Quadrupol zur Selektion eines gewünschten Peptides. Im zweiten Quadrupol erfolgte die Fragmentierung des Peptids durch die Kollision mit Kollisionsgas. Aus Fragmenten wurden dann im dritten Quadrupol die gewünschten Fragmente herausselektiert und zum Detektor geleitet. Die Anzahl der am Detektor ankommenden Fragmente wurde als Signalintensität dargestellt und diente im Vergleich zur bekannten Menge eines synthetischen, Isotopen-markierten Peptides der Quantifizierung des Analyten. Der Zerfall der Precursorionen zu Fragmentationen wurde dabei als „Übergang“ bezeichnet. Mehrere solcher „Übergänge“ konnten sequentiell aus einer Probe gemessen werden, wodurch Probenmaterial eingespart werden konnte. Die Wahl der „Übergänge“ bei der Optimierung der Peptide erfolgte dabei so, dass sie möglichst spezifisch waren, um eine korrekte Quantifizierung zu ermöglichen.

Die Arbeiten zur Validierung potentieller neuer Biomarker für das humane Prostatakarzinom mittels LC-MRM-MS erfolgten am Genome BC Proteomics Center (Victoria BC, Kanada; Leitung: Prof. Dr. rer.

nat. Christoph Borchers) unter Anleitung von Frau Angela Jackson. Die Arbeit gliederte sich in 11 Arbeitsschritte:

1. Etablierung eines Protokolls zum tryptischen Verdau von Proteinen aus Urin
2. Auswahl der zu validierenden Proteine basierend auf den Vorergebnisse und Literaturrecherche
3. Auswahl der Markerpeptide für sämtliche ausgewählte Proteine
4. Synthese der stabil isotope-n-gelabelten Standard (SIS) Peptide
5. Optimierung der SIS-Peptide
6. Bestimmung der Retentionszeit der Peptide
7. Interferenzscreening der SIS-Peptide in Serum und Urin
8. Balancing der SIS-Peptide
9. Probenmessung
10. Auswertung der Messerergebnisse und Bestimmung der „Response Ratio“
11. statistische Auswertung der Ergebnisse

3.4.11.1 Etablierung eines Protokolls zum tryptischen Verdau von Proteinen aus Urin und Serum

Für Urinproben musste die Probenaufarbeitung für die LC-MRM-MS zunächst etabliert werden. Hierzu standen die Methode der Trichloressigsäurefällung und des *Molecular Weight Cut-Offs* (MWCO) zur Verfügung.

Für die Trichloressigsäure- (TCA) fällung wurde die Urinprobe mit 1/9 Volumen eiskalter TCA versetzt und für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für 30 Minuten bei 4°C und 14.000g. Es folgen zwei Waschschrirte mit 90% und 100% Aceton. Nach jedem dieser Schritte wurden die Proben für 10 Minuten bei 4°C und 14.000g zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde bei 4°C getrocknet und resuspendiert. Für den nachfolgenden tryptischen Verdau nach Selevsek et al. (Selevsek et al., 2011) wurden die Proben in 80 µl denaturierendem Puffer (8M Harnstoff (Sigma-Aldrich, USA) und 0,1M Ammoniumbicarbonat (Sigma-Aldrich, USA)) aufgenommen. 18,75 µl dieser Lösung wurden benötigt und mit 81,25 µl denaturierendem Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Für den tryptischen Verdau nach einem Protokoll von Frau Angela Jackson (Genome BC Proteomics Center) wurden die Proben in 80 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat aufgenommen. Hiervon wurden 18,75 µl für den tryptischen Verdau eingesetzt.

Für die Probenvorbereitung mittels *MWCO* wurde der Urin bei 3.900 g für 30 Minuten (4°C) zentrifugiert. Zellen und Zelltrümmer wurden entfernt. 4 ml des Überstandes wurden bei 4°C und 3.900 g für mindestens 15 Minuten bzw. bis max. 500 µl Flüssigkeit übrig waren im Zentrifugalfilter in *Millipore Amicon Ultra-4 centrifugal filter units, 10.000 MWCO* zentrifugiert. Die Proteinlösung wurde auf dem Filter mit 8 ml (2faches Originalvolumen) 20% Acetonitril/25 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Im letzten Waschrirte wurde die

Proteinlösung wie beschrieben mit 4 ml (1faches Originalvolumen) 25 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen und zentrifugiert bis 100 µl Lösung übrig waren. Die aufgrund von Erfahrungswerten abgeschätzte Proteinkonzentration betrug nun 0,08 µg/ µl (entspricht 80 µg Protein / ml Urin). Für den tryptischen Verdau nach Selevsek et al. wurden 18,75 µl Proteinlösung mit 81,25 µl denaturierendem Puffer (8M Harnstoff und 0,1M Ammoniumbicarbonat) versetzt. Für den tryptischen Verdau nach Angela Jackson wurden 18,75 µl Proteinlösung eingesetzt.

Vorbereitung der Serumproben für den tryptischen Verdau

Zur Vorbereitung der Serumproben für den tryptischen Verdau wurden die Proben 1:10 mit denaturierendem Puffer (8M Harnstoff und 0,1M Ammoniumbicarbonat) verdünnt. Für den tryptischen Verdau nach Angela Jackson wurden 3,75 µl dieser Lösung mit denaturierendem Puffer ad 18,75 µl aufgefüllt. Für den tryptischen Verdau nach Selevsek et al. wurden 3,75 µl Proteinlösung mit denaturierendem Puffer ad 100 µl versetzt.

Trypsinverdau der Serum- und Urinproben zur nachfolgenden Analyse mittels LC-MRM-MS

Nach eingehender Literaturrecherche zum tryptischen Verdau von Serumproben wurde das Protokoll nach Angela Jackson mit einem leicht variierten Protokoll nach Selevsek et al. (Selevsek et al., 2011) verglichen.

Für den tryptischen Verdau nach Selevsek et al. (Selevsek et al., 2011) wurden 100 µl Proteinlösung mit 1 µl einer 1,2 M DTT Lösung (Endkonzentration 12 mM DTT) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit 8µl einer 0,5M Iodacetamid-lösung (Endkonzentration 40mM Iodoacetamide, Sigma-Aldrich, USA) für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln alkylt. Es folgte die Verdünnung der Proben mit 300 µl einer 0,1 M Ammoniumbicarbonatlösung (Sigma-Aldrich, USA), um eine finale Ureakonzentration unter 2 M zu erreichen. Die 409 µl dieser Proteinlösung wurden anschließend mit 3,3 µl einer Worthington TPCK Trypsinlösung (0,9 mg Trypsin + 1 ml 10mM CaCl₂-dihydrat/25mM Ammoniumbicarbonat – erst unmittelbar vor Gebrauch ansetzen!) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für den tryptischen Verdau nach Angela Jackson wurden den 15 µl Proteinlösungen jeweils 3,8 µl 10% Natriumdioxycholat (200 mg Natriumdioxycholat + 2 ml of 25 mM Ammoniumbicarbonat) und anschließend 3,7 µl 0,05 M TCEP (100 µl 0,5 M Bondbreaker stock solution + 900 µl of 25 mM Ammoniumbicarbonat) zugesetzt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 60°C reduziert. Es folgte die Zugabe von 4,1 µl einer 0,1M Iodacetamidlösung (36,992 mg Iodacetamid + 2 ml of 25 mM Ammoniumbicarbonat) und die Alkylierung dieser Proben bei 37°C für 30 Minuten. Zum Quenchen der Proben wurden anschließend 4,1 µl 0,1M DTT (30.85 mg DTT + 2 ml of 25 mM Ammoniumbicarbonat)

zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proteinlösung wurde nun mit 3,3 µl einer Worthington TPCK Trypsinlösung versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Vergleichende LC-MRM-MS Messung von beiden Urinaufarbeitungsmethoden (*molecular weight cut off* und Trichloressigsäurefällung) sowie zwei verschiedenen Protokollen für den tryptischen Verdau von Urinen

Zum Vergleich der beiden Aufarbeitungsprotokolle von Urinproben und der beiden Protokolle für den tryptischen Verdau von Proteinen wurde ein am Genome BC Proteomics Center bereits etablierter 72 Peptide umfassender SIS-Peptide Mix eingesetzt. Dieser SIS (stabile Isotopen-gelabelte Standard)-Peptide-Mix bestand aus 45 bereits beschriebenen Peptiden (Kuzyk et al., 2009) sowie weiteren 27 neu am Genome BC Proteomics Center etablierten Peptiden. Die 27 neu etablierten Peptide sind im Anhang (Tabelle 7.13) aufgeführt. Der 72 SIS-Peptide-Mix wurde in einer Konzentration von 100 fmol/µl SIS-Peptide pro Injektion eingespickt, wie in (Domanski et al., 2012) beschrieben. Die Probe wurde mittels *Waters Oasis 96well µElution Plates (30 µg Sorbent)* (Waters, Eschborn) nach Herstellerangaben entsalzt und anschließend wie in Domanski et al. beschrieben mit dem Agilent 6490 Triple Quadrupol Massenspektrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert (Domanski et al., 2012). Für jedes der vier möglichen Protokolle (MWCO + tryptischer Verdau nach Salveska et al., MWCO + tryptischer Verdau nach Angela Jackson, TCA-Fällung + tryptischer Verdau nach Salveska et al., TCA-Fällung + tryptischer Verdau nach Frau Angela Jackson) wurden vier LC-MRM-MS Ansätze gemessen. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die Response Ratio aller 72 Peptide wie in Domanski et al. beschrieben, ermittelt (Domanski et al., 2012). Peptide, die Interferenzen zeigten, wurden für die weitere Analyse ausgeschlossen. Das beste Protokoll war jenes, bei dem bei möglichst vielen Peptiden möglichst hohe Abundanzen gemessen wurden, während gleichzeitig die Standardabweichungen möglichst gering waren. Daher wurden von allen Peptiden, die keine Interferenzen zeigten, einerseits die Standardabweichungen aller vier Messansätze ermittelt und addiert und andererseits die mittleren Abundanzen der Peptidmessungen (dargestellt als "Response Ratio" (RR) = Peakfläche der schweren (SIS) Peptide im Verhältnis zur Peakfläche der leichten, internen Peptide) aller vier Messansätze addiert.

3.4.11.2 Auswahl der zu validierenden Proteine basierend auf den Vorergebnissen und Literaturrecherche

Aufgrund der Vorergebnisse aus den 2D-DIGE-Analysen, Western Blot Versuchen und immunhistochemischen Analysen wurden die Proteine Tetraatricopeptid Domain Protein 38 (TTC38), Secernin-1, Prostataspezifische Saure Phosphatase, Vinculin und Galectin-3 für die Etablierung mittels LC-MRM-MS ausgewählt. Zu den in Vorversuchen identifizierten Proteinen 78kD Glucose-reguliertes Protein, Alpha-1B-Glycoprotein, Annexin A5 und Gelsolin waren bereits SIS-Peptide am Genome BC

Proteomics Center vorhanden, so dass diese Peptide zur Validierung der entsprechenden Proteine mitgenutzt werden konnten.

3.4.11.3 Auswahl der Markerpeptide für sämtliche ausgewählte Proteine

Die Quantifizierung ausgewählter Proteine mittels Flüssigchromatographie-*Multiple Reaction Monitoring*-MS (LC-MRM-MS) erfolgte durch die Messung sogenannter „Markerpeptide“. Diese wurden quantifiziert durch den Vergleich mit in die Probe eingespickten sequenzidentischen, aber isotopisch gelabelten SIS-Peptiden, deren Konzentration bekannt war. Markerpeptide wurden nach einer Reihe von Kriterien für jedes zu quantifizierende Protein ausgewählt. So mussten die Markerpeptide eine Effizienz des Trypsinverdau von mindestens 95% im ExPASy Peptide-Cutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/) aufweisen. Die Peptidelänge sollte >6 und kleiner <20 Aminosäurereste betragen, da bei kleineren Peptiden die Schwierigkeiten der Detektion im Massenspektrometer zunehmen. Größere Peptide hingegen waren schwierig zu synthetisieren. Weitere Grundvoraussetzung der Markerpeptide war die Existenz dieser in allen zu untersuchenden Isoformen. Außerdem durften die Aminosäuren Methionin und Cystein aufgrund ihrer häufigen Modifikationen nicht vorkommen. Da die Synthese von Peptiden mit sequenziellen Prolinen oder Serinen sowie N-terminalem Glutamin schwierig war, durften auch diese Aminosäuren nicht im Peptid vorhanden sein. Die Aminosäureabfolge Asparaginsäure-Glycin musste aufgrund der Bildung instabiler Intermediate ausgeschlossen werden und die Aminosäureabfolge Asparagin-Glutamin musste aufgrund der Möglichkeit der Deaminierung ausgeschlossen werden. Ein weiteres wichtiges Kriterium war die Abwesenheit von natürlichen Varianten und glykosylierten Resten. Die Überprüfung dieses Kriteriums erfolgte in UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Grundvoraussetzung für jedes Markerpeptid war außerdem die Einmaligkeit im humanen Genom. Dieses Kriterium wurde über die NCBI BLASTp Suche (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) überprüft.

Wenn nun noch genug Peptide als potentielle Markerpeptide zur Verfügung standen, wurden die Peptide bevorzugt, die in massenspektrometrischen Experimenten besonders häufig detektiert werden konnten. Um dies zu analysieren, wurden die Datenbanken *GPM* (<http://gpmdb.thegpm.org/index.html>) und *Peptide Atlas* (<https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/Search>) nach den entsprechenden Peptiden durchsucht. Massenspektrometrische Experimente und die hierbei detektierten Peptide sind in diesen Datenbanken hinterlegt. Die Anzahl der Treffer für das gesuchte Peptid spiegelt dabei die Häufigkeit der Beobachtung dieses Peptides im Massenspektrometer wieder. Dies lässt indirekt den Rückschluss zu, ob die Wahrscheinlichkeit ein gewünschtes Peptid detektieren zu können gegeben ist oder nicht. Weiterhin werden Peptide, die die Aminosäure Tryptophan enthalten, wenn möglich ausgeschlossen, da Tryptophan anfällig für Oxidationen ist. Alle verwendeten SIS-Peptide sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: LC-MRM-MS-Proteine und die ausgewählten und verwendeten Markerpeptide

Protein	Peptide
78 kDa glucose-regulated protein	ELEEIVQPIISK NQLTSNPENTVFDAK ITPSYVAFTPEGER
Alpha-1B-Glycoprotein	ATWSGAVLAGR GVTFLLR LETPDFQLFK
AnnexinA5	GTVTDFPGFDER
Galectin-3	IALDFQR IQVLVEPDHFK VAVNDAHLLQYNHR GNDVAFHFNPR
Gelsolin	AGALNSNDAFVLK HVPNEVVVQR TGAQELLR
Prostata-spezifische saure Phosphatase	FQLESETLK FVTLVFR LSGLHGQDLFGIWSK
Secernin-1	DEVQEVVYFSAADHEPESK PFIFVDDVK
Tetratricopeptide Domain Protein 38	IVQLGGSNAQR LFDATLTQYVK VLELLPIR
Vinculin	ALASQLQDSLK GILSGTSDLLTFDEAEVR SLGEISALTSK

3.4.11.4 Synthese der stabil isotopen-gelabelten Standard (SIS) Peptide

Die Synthese und die Aufreinigung der SIS-Peptide wurde von Frau Juncong Yang mit Unterstützung durch weitere Mitarbeiter des Genome BC Proteomics Centers übernommen. Die Synthese erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Percy et al., 2013).

Von einigen der Zielproteine waren schon synthetisierte SIS-Peptide vorhanden. Auch wenn diese teilweise nicht allen Kriterien für ein optimales Markerpeptid entsprachen, wurden sie dennoch aus Kostengründen für die LC-MRM-MS Versuche genutzt, sofern ihre Einmaligkeit im Genom gegeben war.

3.4.11.5 Optimierung der SIS-Peptide

Bevor die SIS-Peptide nach ihrer Synthese zur vergleichenden Quantifizierung der natürlichen Peptide in den Serum- und Urinproben eingesetzt werden konnten, mussten die am besten geeigneten Übergänge hierfür ausgewählt werden. Dazu wurden pro Durchgang, wenn möglich, 10 verschiedene SIS-Peptide gruppiert und 1:10 auf eine Endkonzentration von 1 pmol/ μ l in einer Lösung aus 30% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure (= Hydrocarbonsäure, Methansäure, *Formic acid*) verdünnt. Kombinationen von Peptiden, die sich um weniger als 10 Da unterschieden, wurden vermieden, um die Überlappung der m/z (Masse zu Ladung) Werte bei höheren Ladungszuständen zu vermeiden. Die Peptide wurden durch „direkte Infusion“ mittels ESI auf einem Agilent 6490 Triple Quadrupol (QQQ) Massenspektrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit MassHunter Workstation Software (Agilent, B.05.00) analysiert. Die direkte Infusion erfolgte mit der *Harvard PicoPlus 11 Syringe Pump* (Jarvard Apparatus, Holliston, MA, USA) bei einer Flussrate von 7 μ l/Minute. Eine Liste aller möglichen b- und y-Serien Fragmentationen für die Ladungszustände 2+ und 3+ der Vorläuferionen wurde mittels *Agilent Mass Hunter Optimizer For Peptides* Software (Version B.05.00) für den Massenbereich 200 bis 1100 m/z erstellt. Produktionen, die sich um weniger als 1 Da unterschieden, wurden von der Analyse ausgeschlossen, da nicht gewährleistet werden konnte, dass ausschließlich die gewünschte Produktion analysiert wurde. Bei langen Peptiden, die zu mehr als 30 Übergängen pro Ladungszustand führen, wurden Ionen mit einem Ladungszustand >2+ nach Abgleich mit einer peptidspezifischen Fragmentierungstabelle (erstellt mittels *Mathew Monroe's Molecular Weight Calculator* Freeware) eliminiert. Alle nicht in der Fragmentierungstabelle aufgeführten Ionen wurden gelöscht. Waren weiterhin zu viele Produktionen vorhanden, wurden zunächst die großen b++-Ionen, wenn nötig auch noch b-Ionen von der Analyse ausgeschlossen.

Die MS-Analyse erfolgte bei einer Ion Spray Kapillar Spannung von 3.500 V und einer *nozzle*-Spannung von 300 V. Die Gastemperatur betrug 150°C bei einer Flussrate von 15 l/Minute, während die „sheath gas“-Temperatur 250°C betrug bei einer Flussrate von ebenfalls 11 l/Minuten. Zerstäuber (nebulizer) Gasfluss betrug 60psi, die Fragmentator Spannung lag bei 380 V. Die cell accelerator Spannung betrug 7 V. Die Kollisionsenergie wurde pro Messung in 4 V Schritten von 5 auf 53 V erhöht. Die Scanzeiten betrugen 500 ms. Pro Peptid wurden die fünf Übergänge mit dem höchsten Signal für den Interferenz-Screen ausgewählt.

3.4.11.6 Bestimmung der Retentionszeiten der Peptide (Peptide Scheduling)

Vor dem Start der eigentlichen LC-MRM-MS-Messungen und der Interferenzscreenings mussten die Retentionszeiten jedes einzelnen Peptides bestimmt werden. Dies war nötig, um möglichst viele Messpunkte für ein Peptid messen zu können. Eluieren zu viele Peptide zu einem ähnlichen Zeitpunkt

von der LC-Säule, können diese Peptide nur jeweils mit einer unzureichenden Anzahl an Messpunkten im Massenspektrometer quantifiziert werden. Zur Bestimmung der Retentionszeit wurden 10 µl entsalzte Probe direkt mit einer Flussrate von 400 µl/Minute und einem Gradienten von 3-90% mobile Phase B (90% Acetonitril/0,1% Ameisensäure) über eine Laufzeit von 43 Minuten auf die *reverse phased* Säule injiziert. Der Gradient der Lösungen A (0,1% Ameisensäure) und B setzte sich wie folgt zusammen:

Minute	% Lösung A	% Lösung B
0	97	3
1,5	93	7
16	85	15
18	84,7	15,3
33	75	25
38	55	45
39	10	90
43	97	3

Die Säule wurde dabei auf 50°C erhitzt.

Die Ionisierung des Säuleneluats und die Probenanalyse erfolgten auf einem Agilent 6490 Triple Quadrupol (QQQ) Massenspektrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit *Mass Hunter Workstation* Software (Agilent, B.04.01) bei einer Ion Spray Kapillar Spannung von 3.500 V und einer nozzle-Spannung von 300 V. Die Gastemperatur betrug 150°C bei einer Flussrate von 15 l/Minuten, während die „sheath gas“-Temperatur 250°C betrug bei einer Flussrate von ebenfalls 11 l/Minuten. Der Zerstäuber (nebulizer) Gasfluss betrug 30psi, die Fragmentator-Spannung lag bei 380 V. Der MS Betriebsdruck betrug 5×10^5 Torr, während Q1 und Q3 auf eine Auflösung von 0,7 FWHM (full width at half maximum = Breite des Peaks bei 50% der Gesamthöhe) gesetzt wurden. Die Fragmentator-Spannung lag bei 380 V. Die cell accelerator Spannung betrug 5 V. Die Verweildauer zur Messung eines Übergangs betrug mindestens 20 ms. Pro Peptid wurden die fünf besten Übergänge der Peptidoptimierung im LC-MRM-MS Modus gemessen. Die gemessenen Retentionszeiten wurden in die *Mass Hunter Workstation* Software Methode zur Quantifizierung der Peptide übernommen.

3.4.11.7 Interferenzscreening der SIS-Peptide in Serum und Urin

Zur weiteren Auswahl der besten Übergänge für die LC-MRM-MS-Messungen wurden Interferenzscreenings durchgeführt. Hierzu wurden zunächst jeweils drei tryptische Verdau von Urin (aufgearbeitet mittels MWCO) und Serum nach dem abgeänderten Protokoll von Selevsek et al. angesetzt ((Selevsek et al., 2011); siehe Kapitel 3.4.11.1 Etablierung eines Protokolls zum tryptischen Verdau von Proteinen aus Urin und Serum). Jedem Ansatz wurden 100 fmol eines jeden SIS-Peptids pro

Injektion zugesetzt. Anschließend wurden die Proben mittels *Waters Oasis 96well μ Elution Plates 30 μ g sorbent Batch no 115B with HBL Media* entsalzt. Dazu wurden die μ Elution Platten mit 200 μ l 100%igem Methanol angefeuchtet. Die Elution erfolgte mittels Druckluft bei 1 psi. Nach der Equilibration der Platten mit 200 μ l 0,1 % Ameisensäure und der erneuten Zugabe von 100 μ l Ameisensäure erfolgte die Zugabe von 100 μ l Probe. Nach der Elution bei 1 psi wurden die Proben mit 200 μ l 0,1 %iger Ameisensäure gewaschen. Proben, welche Harnstoff enthielten, wurden mit 400 μ l 0,1%iger Ameisensäure gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der Proben mit 100 μ l einer 50%igem Acetonitril, 0,1%iger Ameisensäure Lösung. Nach kurzem abzentrifugieren wurden die Proben bei -80°C eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert.

Zur Vorbereitung auf die LC-MRM-MS-Messung wurden die Proben in 0,1% Ameisensäure (Mobile Phase A) rehydriert. Die LC-MRM-MS-Messung erfolgte wie beschrieben (siehe Kapitel 3.4.11.5 Optimierung der SIS-Peptide) im 3-fach Ansatz von drei tryptischen Urinverdaue 3 tryptischen Serumverdaue und 3 Ansätzen SIS-Peptide in 0,5% Ameisensäure (entspricht jeweils 9 Messungen für Urin, Serum und Puffer).

Die Ermittlung der Top 3 Übergänge und Interferenzen erfolgte für Urin und Serum jeweils unabhängig voneinander. Zur Identifikation von Interferenzen und den Top 3 Übergängen für jedes Peptid wurden die Mittelwerte der Abundanz aller 3 Messungen für einen Ansatz (SIS Peptid in Serum, natürliches Peptid in Serum und SIS-Peptid in Puffer für Serum bzw. SIS Peptid in Urin, natürliches Peptid in Urin und SIS-Peptid in Puffer für Urin) gebildet. Hieraus wurde für jeden Übergang eine relative *Response Ratio* berechnet, wobei die relative *Response Ratio* eines jeden Übergangs aus den Abundanzen für einen Übergang dividiert durch die maximale Abundanz des Peptides gebildet wird. Demnach wird für jeden Übergang eines Peptides eine relative *Response Ratio* für das SIS-Peptid im Serum bzw. Urin, für das SIS-Peptid im Puffer und für das natürliche Peptid im Serum bzw. Urin gebildet. Diese drei relativen *Response Ratios* wurden nun für jeden Übergang eines jeden Peptides gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Aus der Standardabweichung wurde die relative Standardabweichung (RSD, CV, *coefficient of variation*) durch Division mit dem Mittelwert der relativen *Response Ratios* ermittelt. Die RSD sollte dabei $\leq 25\%$ sein. Als Top 3 Übergänge ohne Interferenzen wurden die Übergänge ausgewählt, bei denen die Peakform dem natürlichen Peptid und dem SIS-Peptid möglichst ähnlich war, die gleichen Retentionszeiten, eine möglichst hohe relative *Response Ratio* und eine möglichst niedrige RSD vorlagen. Der Beste dieser drei Übergänge wurde später zur Quantifizierung eines Peptides in einer Probe herangezogen („Quantifier“), während die beiden anderen Übergänge als „Qualifier“ der Qualitätssicherung dienten. Qualifier und Quantifier sind in Tabelle 3.2 angegeben.

Tabelle 3.2: Quantifier und Qualifier des 21 Peptide-Mixes zur Etablierung potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom mittels LC-MRM-MS

Protein / Peptid	Peptid (heavy / Light)	Quantifier				Qualifier 1				Qualifier 2			
		Ion	Precursor	Product	CE [V]	Ion	Precursor	Product	CE [V]	Ion	Precursor	Product	CE [V]
78 kDa glucose-regulated protein ELEEIVQPIISK	L	2y7	699,8	785,0	17	2y6	699,8	685,8	21	2y5	699,8	557,7	21
78 kDa glucose-regulated protein ELEEIVQPIISK	H	2y7	703,8	793,0	17	2y6	703,3	693,8	21	2y5	703,8	565,7	21
78 kDa glucose-regulated protein NQLTSNPENTVFDK	L	2b2	893,9	243,2	25	2y9	893,9	1021,1	25	3y7	560,3	794,9	13
78 kDa glucose-regulated protein NQLTSNPENTVFDK	H	2b2	843,9	243,2	25	2y9	843,9	1029,1	25	3y7	562,9	802,9	13
78 kDa glucose-regulated protein ITPSYVAFTPEGER	L	2y12++	784,4	677,2	21	3y12++	523,2	677,2	5	3y5	523,2	587,6	13
78 kDa glucose-regulated protein ITPSYVAFTPEGER	H	2y12++	788,9	681,8	21	3y12++	526,3	681,8	5	3y5	526,3	597,3	13
Alpha-1B-Glycoprotein ATWSGAVLAGR	L	2y8	545,1	730,8	25	2y9++	545,1	459,0	9	2y7	545,1	643,8	25
Alpha-1B-Glycoprotein ATWSGAVLAGR	H	2y8	550,1	740,8	25	2y9++	550,1	464,0	9	2y7	550,1	653,8	25
Alpha-1B-Glycoprotein GVTFLLR	L	2y5++	403,5	649,8	9	2y3	403,5	401,5	13	2y4	403,5	548,7	17
Alpha-1B-Glycoprotein GVTFLLR	H	2y5++	408,5	330,4	9	2y3	408,5	411,5	13	2y4	408,5	558,7	17
Alpha-1B-Glycoprotein LETPDFQLFK	L	y8++	619,3	498,3	13	y8	619,3	995,5	17	y7	619,3	894,5	17
Alpha-1B-Glycoprotein LETPDFQLFK	H	y8++	623,3	502,3	13	y8	623,3	1003,5	17	y7	623,3	902,5	17
AnnexinA5 GTVTDFPGFDER	L	y6	670,8	720,3	17	y8	670,8	982,4	21	y9	670,8	1083,5	21
AnnexinA5 GTVTDFPGFDER	H	y6	675,8	730,3	17	y8	675,8	992,4	21	y9	675,8	1093,5	21
Galectin-3 IALDFQR	L	2y5	431,7	678,4	9	2y6	431,7	749,4	13	2y4	431,7	565,3	9
Galectin-3 IALDFQR	H	2y5	436,7	688,4	9	2y6	436,7	759,4	13	2y4	436,7	575,3	9
Galectin-3 IQVLVEPDHFK	L	3y9++	442,2	542,3	9	2b2	662,9	242,2	21	3b2	442,2	242,2	9
Galectin-3 IQVLVEPDHFK	H	3y9++	444,9	546,3	9	2b2	666,9	242,1	21	3b2	444,9	242,1	9
Galectin-3 VAVNDAHLLQYNHR	L	4y11++	413,2	690,8	9	3y13++	550,6	775,9	13	3y12++	550,6	740,4	13
Galectin-3 VAVNDAHLLQYNHR	H	4y11++	415,7	695,8	9	3y13++	554,0	780,9	13	3y12++	554,0	745,4	13
Galectin-3 GNDVAFHFNPR	L	3y7++	425,2	444,7	9	3y9++	425,2	551,8	9	3y5++	425,2	335,7	9
Galectin-3 GNDVAFHFNPR	H	3y7++	428,5	449,7	9	3y9++	428,5	556,8	9	3y5++	428,5	340,7	9
Gelsolin AGALNSNDAFVLK	L	b3	660,4	200,1	21	y2	660,4	260,2	29	y3	660,4	359,3	25
Gelsolin AGALNSNDAFVLK	H	b3	664,4	200,1	21	y2	664,4	268,2	29	y3	664,4	367,3	25
Gelsolin	L	3b7++	426,2	775,9	5	3y4	426,2	501,6	13	3b2	426,2	237,3	29

HVVPNEVVVQR													
Gelsolin	H	3b7++	429,5	388,4	5	3y4	429,5	511,6	13	3b2	429,5	237,3	29
HVVPNEVVVQR													
Gelsolin	L	y5	444,3	658,4	13	y6	444,3	729,4	13	y4	444,3	530,4	13
TGAQELLR													
Gelsolin	H	y5	447,3	664,4	13	y6	447,3	735,4	13	y4	447,3	536,4	13
TGAQELLR													
Prostataspezifische saure Phosphatase	L	2y8	612,3	948,5	17	2b2	612,3	276,1	13	2y7	612,3	819,5	21
FQELESETLK													
Prostataspezifische saure Phosphatase	H	2y8	616,3	956,5	17	2b2	616,3	276,1	13	2y7	616,3	827,5	21
FQELESETLK													
Prostataspezifische saure Phosphatase	L	2y5	441,3	635,4	9	2b2	441,3	247,1	9	2y4	441,3	534,3	17
FVTLVFR													
Prostataspezifische saure Phosphatase	H	2y5	446,3	645,4	9	2b2	446,3	247,1	9	2y4	446,3	544,3	17
FVTLVFR													
Prostataspezifische saure Phosphatase	L	3y6	5553,3	737,4	9	3y13++	5553,3	729,4	9	3y2	5553,3	234,1	25
LSGLHGQDLFGIWSK													
Prostataspezifische saure Phosphatase	H	3y6	556,0	745,4	9	3y13++	556,0	733,4	9	3y2	556,0	242,2	25
LSGLHGQDLFGIWSK													
Secernin-1	L	3y16+++	727,0	612,6	13	3y2	727,0	234,1	29	3b3	727,0	344,2	9
DEVQEVVYFSAADHEPESK													
Secernin-1	H	3y16+++	729,7	615,3	13	3y2	729,7	242,2	29	3b3	729,7	344,1	9
DEVQEVVYFSAADHEPESK													
Secernin-1	L	2b2	540,3	245,1	17	2y7	540,3	835,5	13	2y2	540,3	246,2	17
PFIFVDDVK													
Secernin-1	H	2b2	544,3	245,1	17	2y7	544,3	843,5	13	2y2	544,3	254,2	17
PFIFVDDVK													
Tetratricopeptide Domain Protein 38	L	2y9++	571,8	465,7	9	2y7	571,8	689,3	13	2b3	571,8	341,2	13
IVQLGGSNAQR													
Tetratricopeptide Domain Protein 38	H	2y9++	576,8	470,7	9	2y7	576,8	699,3	13	2b3	576,8	341,2	13
IVQLGGSNAQR													
Tetratricopeptide Domain Protein 38	L	2y9	649,9	1038,6	17	2b2	649,9	216,2	13	2.b3	649,9	376,2	17
LFDATLTQYVK													
Tetratricopeptide Domain Protein 38	H	2y9	653,9	1046,6	17	2b2	653,9	261,2	13	2.b3	653,9	376,2	17
LFDATLTQYVK													
Tetratricopeptide Domain Protein 38	L	2y7	533,4	853,6	17	2y6	533,4	724,5	13	2b2	533,4	213,2	5
VLELLPIR													
Tetratricopeptide Domain Protein 38	H	2y7	538,4	863,6	17	2y6	538,4	734,5	13	2b2	538,4	213,2	5
VLELLPIR													
Vinculin	L	2y9	587,7	990,1	13	2y8	587,7	919,0	17	2b3	256,3	256,3	17
ALASQLQDSLK													
Vinculin	H	2y9	591,7	998,1	13	2y8	591,7	927,0	17	2b3	591,7	256,3	17
ALASQLQDSLK													
Vinculin	L	2y8	1018,5	966,5	33	3y6	679,4	718,3	21	3y8	679,4	966,5	21
GILSGTSDLLLTDFDEAEVR													
Vinculin	H	2y8	1023,5	976,5	33	3y6	682,7	728,3	21	3y8	682,7	976,5	21
GILSGTSDLLLTDFDEAEVR													
Vinculin	L	2y9	553,6	906,0	17	2y6	553,6	606,7	13	2b2	553,6	201,2	5
SLGEISALTSK													
Vinculin	H	2y9	557,6	914,0	17	2y6	557,6	614,7	13	2b2	557,6	201,2	5
SLGEISALTSK													

3.4.11.8 Balancing der SIS-Peptide

Um die Standardabweichung bei der Quantifizierung von Peptiden möglichst niedrig zu halten, wurde eine zwischen SIS-Peptid und natürlichem Peptid ausbalancierte Konzentration an SIS-Peptiden benötigt (Kuzyk et al., 2009). Dies bedeutete, dass die Konzentration des SIS-Peptides, wenn eben möglich, an die

Konzentration des natürlichen Peptides angepasst wurde. Hierzu wurde die Abundanz der SIS-Peptide mit der Abundanz der natürlichen Peptide in der LC-MRM-MS-Messung abgeglichen. Die Abundanz jeden SIS-Peptides sollte bei mindestens 1×10^3 bis 1×10^4 liegen, um eine möglichst fehlerfreie Messung und Quantifizierung zu gewährleisten. Bei niedrigeren Abundanzen im Interferenzscreen wurden die SIS-Peptidkonzentrationen entsprechend so angeglichen, dass in weiteren Messungen ähnliche Abundanzen zu erwarten waren. In einem zweiten Schritt wurde die Konzentration an SIS-Peptiden an die Konzentration der natürlichen Peptide angepasst. War die Abundanz der SIS-Peptide höher als die des natürlichen Peptides und höher als 1×10^4 wurden die Menge an SIS-Peptiden in den Proben verringert, solange zu erwarten war, dass die Abundanzen in weiteren Messungen nicht unter 1×10^4 fallen. Lag die Abundanz der SIS-Peptide unter der Abundanz der natürlichen Peptide, wurde die Menge an SIS Peptiden in der Probe entsprechend erhöht. Bei diesen Anpassungen wurden die erwarteten Deregulationen der Proteine in Karzinompatienten im Vergleich zu tumorfreien Patienten mit berücksichtigt. Tabelle 3.3 gibt die final eingespikten Konzentrationen an SIS-Peptiden an.

Tabelle 3.3: Konzentrationen und Molekulargewichte der eingesetzten SIS-Peptide

Protein / Peptid	Uniprot Accession Nummer	Molekulargewicht natürl. Peptid	Molekulargewicht SIS-Peptid	eingesetzte Konzentration [fmol]	AAA	CZE [%]	correction factor	absolute Quantifizierung
78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) ELEEVQPIISK	P11021	1397,6	1404,7	2000	k.a.	k.a.	k.a.	
78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) NQLTSNPENTVFDK	P11021	1677,8	1684,7	2000	k.a.	k.a.	k.a.	nein
78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) ITPSYVAFTPEGER	P11021	1566,8	1575,8	2000	77,0	98,3	0,757	ja
Alpha-1B-Glycoprotein ATWSGAVLAGR	P04217	1088,2	1097,5	2000	k.a.	k.a.	k.a.	nein
Alpha-1B-Glycoprotein GVTFLLR	P04217	805,0	814,5	1000	100,0	91,8	0,918	nein
Alpha-1B-Glycoprotein LETPDFQLFK	P04217	1237,43	1244,6	200	66,0	97,7	0,645	ja
AnnexinA5 GTVTDFPGFDER	P08758	1340,4	1349,6	2000	82,0	98,5	0,808	ja
Galectin-3 IALDFQR	P17931	862,0	871,5	2000	167,1	92,0	1,538	ja
Galectin-3 IQVLVEPDHFK	P17931	1324,5	1331,7	200	46,5	92,8	0,432	nein
Galectin-3 VAVNDAHLLQYNHR	P17931	1649,8	1658,8	2000	91,2	99,3	0,906	nein
Galectin-3 GNDVAFHFNPR	P17931	1273,4	1282,4	2000	k.a.	k.a.	k.a.	nein
Gelsolin AGALNSNDAFVLK	P06396	1319,5	1326,7	2000	96,5	100,0	0,965	nein
Gelsolin HVPNEVVVQR	P06396	1275,5	1284,7	2000	k.a.	k.a.	k.a.	ja

Gelsolin TGAQELLR	P06396	887,01	892,5	200	94,5	98,3	0,929	nein
Prostatasepezifische saure Phosphatase (PPAP) FQLESETLK	P15309	1223,4	1230,5	2000	100,0	100,0	1,000	nein
Prostatasepezifische saure Phosphatase (PPAP) FVTLVFR	P15309	881,1	890,1	2000	80,0	67,6	0,541	ja
Prostatasepezifische saure Phosphatase (PPAP) LSGLHGQDLFGIWSK	P15309	1657,9	1665,0	200	90,0	61,3	0,552	nein
Secernin-1 DEVQEVVYFSAADHEPESK	Q12765	2179,3	2188,3	20000	k.a.	k.a.	k.a.	nein
Secernin-1 PFIFVDDVK	Q12765	1079,3	1086,4	2000	k.a.	k.a.	k.a.	nein
Tetratricopeptide Domain Protein 38 (TTC38) IVQLGGSNAQR	Q5R314	1142,3	1151,3	2000	90,0	61,3	0,552	ja
Tetratricopeptide Domain Protein 38 (TTC38) LFDATLTQYVK	Q5R314	1298,5	1305,6	2000	110,0	47,9	0,527	nein
Tetratricopeptide Domain Protein 38 (TTC38) VLELLPIR	Q5R314	1065,4	1074,4	200	80,0	60,3	0,482	nein
Vinculin ALASQLQDSLK	P18206	1173,3	1180,6	200	k.a.	k.a.	k.a.	nein
Vinculin GILSGTSDLLLTDEAEVR	P18206	2036,3	2045,0	20000	k.a.	k.a.	k.a.	nein
Vinculin SLGEISALTSK	P18206	1105,3	1112,6	2000	k.a.	k.a.	k.a.	ja

AAA= Aminosäurenanalyse, in [%] Reinheit; CZE= capillar zone electrophoreses, in [%] Reinheit der Peptide

3.4.11.9 Probenmessung mittels LC-MRM-MS

Zur Vorbereitung der Proben auf die LC-MRM-MS-Messungen wurden die Urinproben wie bereits beschrieben mittels MWCO aufgearbeitet und anschließend nach einem abgeänderten Protokoll von Selevsek et al. (Selevsek et al., 2011) verdaut. Auch die Serumproben wurden nach diesem abgeänderten Protokoll von Selevsek et al verdaut. Nach dem einspielen der SIS-Peptide in entsprechend angepasster Konzentration (siehe Tabelle 3.3), wurden die Proben wie beschrieben entsalzt und lyophilisiert. Die LC-MRM-MS-Messung der Proben erfolgte nach Aufnahme in 0,1%ige Ameisensäure wie im Kapitel „3.4.11.7 Interferenzscreening der SIS-Peptide in Serum und Urin“ beschrieben.

3.4.11.10 Auswertung der Messerergebnisse und Bestimmung der „Response Ratio“ (RR)

Nach den LC-MRM-MS-Messungen wurden alle Daten mit der *Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis Software* (Agilent B.04.00) ausgewertet. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit dem *Agilent Integrator Algorithm for Peak Integration*. Alle Peaks wurden manuell kontrolliert, um die korrekte Peak Detektion und Integration zu gewährleisten. Die Ratio der integrierten Fläche des endogenen natürlichen Peptides zu integrierter Fläche des korrespondierenden SIS-peptides entspricht der *Response Ratio* (RR). Die Konzentration jedes Peptides wurde berechnet durch die Multiplikation der RR mit der Konzentration des SIS-Peptides. Durch Multiplikation dieses Wertes mit dem sog. „Correction factor“, der die Reinheit des SIS-Peptides widerspiegelt und aus den Ergebnissen der Aminosäurenanalyse und

Kapillarzonenlektrophorese ermittelt wurde, erfolgte die absolute Quantifizierung der Peptide. In Tabelle 3.3 (Seite 68) sind die Peptide gekennzeichnet, für die eine absolute Quantifizierung durchgeführt wurde.

3.4.11.11 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für absolut quantifizierte Proteine wurden statistische Analysen der verschiedenen Tumor- und Kontrollgruppen durchgeführt. Sämtliche statistischen Analysen des Patientenkollektives wurden mit dem Programm SPSS Version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Statistische Signifikanz war definiert ab einem p -Wert ≤ 0.05 . Die Unterschiede in der Proteinexpression von zwei Gruppen wurden mittels eines zweiseitigen, nicht-parametrischen Mann-Whitney U -Tests ermittelt. Statistische Signifikanz war wiederum definiert ab einem p -Wert ≤ 0.05 .

3.5 Proteinchemische und immunhistochemische Methoden

3.5.1 Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay

Sofern in dieser Arbeit nicht anders angegeben, wurden alle Proteinbestimmungen mittels Bradford-Assay durchgeführt. Hierzu wurden jeweils im Doppelansatz 10 μ l Bradford Reagenz (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) mit 1 μ l Probe gemischt und mit Aqua bidest auf 50 μ l aufgefüllt. Zusätzlich wurde eine BSA-Standardverdünnungsreihe aus jeweils 10 μ l Bradfordreagenz und 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g, 4 μ g bzw. 5 μ g Bovines Serum Albumin (BSA) aufgefüllt auf 50 μ l mit Aqua Bidest, hergestellt. Als Blank wurden 40 μ l Aqua Bidest mit 10 μ l Bradford-Reagenz gemischt. Die Proben wurden in eine 96-Well-Platte überführt und die Extinktion bei 595 nm am ELISA Reader Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Mit Hilfe der Verdünnungsreihe erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentration der unbekannten Proben. Bei Bedarf wurden die Proben zur Bestimmung der Proteinkonzentration verdünnt.

3.5.2 Western Blot Analysen

Für alle durchgeführten Western Blots wurden die Proteinproben 1:4 mit 4x SDS Probenpuffer (4% SDS, 0,5 M Tris-Hcl pH 6,8, 40% Glycerin, 10% β -Mercapthoethanol, 0,002% Bromphenol blau) versetzt. Die Proben wurden anschließend bei 95°C für 5 Minuten inkubiert und dann auf ein Novex NuPAGE 4-12% Bis-tris Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für 10 Minuten und weiter bei 120-140 V bis die Bromphenolblaulauffront das Ende des Gels erreichte. Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Polyvinylidene Fluorid Membran (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) transferriert. Hierzu wurde die Membran für 15 Sekunden in Methanol

aktiviert, 2 Minuten mit Aqua Bidest gewaschen und 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte der Semi-dry Blot in der *Transblot SD Semidry Transfercel* (Biorad Laboratories, München, Deutschland). Hierzu wurde für 1 Stunde eine Stromstärke von 2mA/cm² angelegt. Die Blots wurden für 1 Stunde bei RT (alternativ über Nacht bei 4°C) in 10% Milchpulver in TBS-T (0,5 M NaCl, 1 M Tris pH 7,5, 0,5% Tween) geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem gewünschten Erst-Antikörper. Die Inkubationsbedingungen für alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4: erst-Antikörperbedingungen

Antikörper	Herkunft	Typ	Lieferant	Verdünnung
TTC38 (HPA029302)	Hase	polyklonal	Sigma Aldrich, USA	1:500
β-Actin (A5441)	Maus	monoklonal	Sigma Aldrich, USA	1:500
TK1 (WA-AT4248a)	Maus	monoklonal	Abgent, USA	1:500
TCP1alpha clone EPR4082	Hase	monoklonal	Epitomics, USA	1:500
Calponin	Maus	monoklonal	Sigma Aldrich, USA	1:20.000
Gelsolin	Maus	monoklonal	BD Transduktion Laboratories, Heidelberg, Deutschland	1:5.000
Annexin A5	Maus	monoklonal	Abcam, UK	1:1.250
Secernin-1	Hase	polyklonal	Sigma Aldrich, USA	1:500
PFDN	Hase	polyklonal	Proteintech, Manchester, UK	1:1000
UBC	Hase	monoklonal	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Vinculin	Maus	monoklonal	Fitzgerald Industries International, USA	1:1000
Anti-Maus + HRP (P0447)	Ziege	polyklonal	DAKO, Hamburg, Deutschland	1:5.000
Anti-Hase + HRP (P0448)	Ziege	polyklonal	DAKO, Hamburg, Deutschland	1:5.000
Peroxidase Anti-Maus IgG (PI-2000)	Pferd	polyklonal	Vector Laboratories, USA	1:10.000
Peroxidase Anti-Hase IgG (PI-1000)	Ziege	polyklonal	Vector Laboratories, USA	1:20.000

Die Blots wurden 4 x für je 15 Minuten in TBS-T gewaschen, bevor sie für 30 Minuten mit dem geeigneten Zweit- Antikörper inkubiert wurden. Nach erneutem viermaligem Waschen in TBS-T für jeweils 15 Minuten wurde die Membran zur Visualisierung mit *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) oder *Pierce ECL Westernblotting Substrat* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) nach Herstellerangaben inkubiert. Es folgte die Exposition eines Amersham Hyperfilmes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) und die Entwicklung im Optimax 1170-1-0000 (Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG, Oberstenfeld, Deutschland). Western Blot Analysen von potentiellen TTC38 Zielproteinen wurden teilweise von Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

3.6.3 Immunhistochemische Analysen an Formalin fixiertem paraffineingebettetem (FFPE) Gewebe

Zur immunhistochemischen Färbung der FFPE Gewebe mussten diese zunächst entparaffiniert und gewässert werden. Dies erfolgte in der Reihenfolge 3 x Xylol für je 15 Minuten, 2 x 100% Ethanol für je 10 Minuten, 2 x 96% Ethanol für je 5 Minuten, 70% Ethanol für 5 Minuten und 3 x Wasser für je 5

Minuten. Anschließend wurden die Antigene in 20% Citratpuffer pH 6,0 für 30 Minuten bei 98°C im Wasserbad demaskiert. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte für 30 Minuten 5 x in PBS gespült. Die endogene Peroxidase wurde durch 15 minütige Inkubation mit 3% H₂O₂ in PBS geblockt. Erneut wurden die Schnitte 5 x mit PBS gespült und anschließend die freien Bindungsstellen mit *DAKO protein block serum-free* (Dako Hamburg, Deutschland) für 20 Minuten bei 37°C geblockt. Nach dem Ablauf der Blockierungslösung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Alle Primärantikörper wurden in 1% Milchpulver in PBS angesetzt. Die Inkubationsbedingungen für die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Inkubationsbedingungen der in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper

Zielprotein	Antikörper	Spezie	Firma	Verdünnung	Inkubationszeit und Temperatur	Positiv Kontrolle
Secernin-1	polyklonal	Hase	Sigma Aldrich, USA	1:1000	60 Minuten, 37°C	Testis
TTC38	polyklonal	Hase	Sigma Aldrich, USA	1:400	45 Minuten, 37°C	Leber
Vinculin	monoklonal	Maus	<i>Fitzgerald Industries International, USA</i>	1:1000	üN, 4°C	Testis
KCTD12	polyklonal	Hase	Proteintech, UK	1:100	60 Minuten, 37°C	GIST*

*Gastrointestinaler-Stroma-Tumor

Nach dem fünfmaligen Waschen der Schnitte in PBS wurden diese für 30 Minuten bei 37°C mit einigen Tropfen *DAKO Envision premade biotin-free enhancer solution for detection of mouse and rabbit primary* Aks inkubiert. Nach erneutem Waschen (4 x PBS) wurden die Schnitte für eine Stunde in PBS eingestellt. Zum Entwickeln wurde das *DAKO Liquid DAB Substrate Chromogen System* Kit (Dako, Hamburg, Deutschland) verwendet. Es wurde 1 ml Puffer mit einem Tropfen DAB gemischt und die Schnitte mit dieser Lösung bis zum Erreichen der gewünschten Farbtintensität inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua Bidest gespült und für 5 Minuten in PBS eingestellt. Die Schnitte wurden mit Hämalaun 10 Minuten gefärbt, mit Aqua Bidest gespült und für 10 Minuten im warmen Leitungswasser gebläut. Die Entwässerung der Schnitte erfolgte durch 1 x 70% Ethanol für 1 Minuten, 1 x 96 % Ethanol für 1 Minuten, 2 x 100% Ethanol für je 2 Minuten und 2 x Xylol für je 5 Minuten. Eingedeckelt wurden die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte mit einem Tropfen Vitroclud (R. Langenbrinck Labor und Medizintechnik, Emmendingen).

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 RNA Isolation aus Zelllinien und Frischgewebe

Für die RNA Isolation aus kryokonserviertem Gewebe wurden 50 – 100 mg Gewebe mit 1 ml TRIzol Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) versetzt. Für die RNA Isolation aus Zelllinien wurden 500 µl

TRIzol auf die Zellen einer Petrischale (10 cm) gegeben, mit einem Zellschaber gelöst und die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt.

Allen Ansätzen wurde nach einer fünfminütigen Inkubation in TRIzol jeweils 200 µl Chloroform hinzugegeben und der Ansatz nach dem Mischen für 2-3 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (4°C, 12.000g, 15 Minuten) konnte die obere wässrige Phase abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt werden. Nach der Inkubation von 10 Minuten und einem erneuten Zentrifugationsschritt (4°C, 12.000g, 10 Minuten) wurde der Überstand verworfen. Die RNA wurde mit 1000 µl 75% Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen und für 5 Minuten mit 5.000 g bei 4°C zentrifugiert. Die RNA wurde getrocknet und anschliessend in 17 - 52 µl DEPC Wasser resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 60°C für 10 Minuten. Die RNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. RNA Isolationen aus Zelllinien wurden teilweise von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.6.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (RNA und DNA)

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA erfolgte photometrisch am NanoDrop-ND1000 auf der Grundlage des Lambert'schen Gesetzes. Hierbei kann die Konzentration (C) aus der Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda(E_\lambda)$, der Weglänge des Lichtes im Material (l) und dem natürlichen molaren Extinktionskoeffizienten ($\alpha\lambda$) berechnet werden nach der Formel

$$C = (E_\lambda) / (l * \alpha\lambda).$$

Der NanoDrop-ND1000 wurde zunächst mit 2 µl des zur Lösung der Nukleinsäuren verwendeten Lösungsmittels kalibriert. Anschließend erfolgte die eigentliche Messung durch das Auftragen von 2 µl Nukleinsäurelösung. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm, da aromatische Ringe der Basen bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum haben. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Nukleinsäuren erfolgte eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Der Koeffizient OD260 nm/ OD 280 nm spiegelt dann den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung wieder. Für RNA sollte dieser Wert bei >2,0, für DNA >1,8 liegen.

3.6.3 Reverse Transkription von RNA

Die Reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte mit dem Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben. 1 µg RNA wurde für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe des Reaktionsmixes (Tabelle 3.6) wurden die Proben zunächst zur Primer-Bindung für 10 Minuten bei RT, im Anschluss für die cDNA Synthese für 15 Minuten bei 42°C inkubiert.

Tabelle 3.6: Reaktionsansatz der reversen Transkription von RNA in cDNA

Komponente	Endkonzentration
MgCl 25 mM	5 mM
10* RT Puffer	1-fach
dNTP Mix 10 mM each	1 mM each
Rnase Inhibitor 40U/ μ l	20 Units
AMV RT	15U/ μ g
Oligo dT	0,5 μ g
Random Primer	0,5 μ g
RNA 1 μ g	1 μ g
DEPC Wasser	Ad 20 μ l

Die cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.6.4 Semiquantitative Real-time PCR

Zur Bestimmung der Expressionstärke eines Gens auf mRNA-Ebene wurde die semi-quantitative Real-time PCR verwendet. Hierbei lässt sich die mRNA Expression nach jedem PCR-Zyklus in Echtzeit messen. Das verwendete Prinzip beruht auf der Fluoreszenz des Fluorchroms SYBR Green. SYBR Green interkaliert in die kleine Furche der cDNA. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 498$ nm, während grünes Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 522$ nm emittiert wird. Liegt SYBR Green hingegen ungebunden in Lösung vor, ist keine Fluoreszenz messbar. So kann nach jedem PCR-Amplifikations-Zyklus vom Anstieg der Fluoreszenz auf die Menge der cDNA rückgeschlossen werden.

Für die Durchführung der Real-time PCR wurde das IQ5 System (Biorad Laboratories, München, Deutschland) verwendet. Zur Analyse der Expression eines Zielgenes aus Zelllinien und kryokonserviertem Gewebe wurde 1 μ l cDNA (0,05 μ g/ μ l) (siehe Kapitel 3.6.3 Reverse Transkription von RNA) als Template eingesetzt, zur Analyse der Zielgenexpression aus FFPE Gewebe wurden 2 μ l cDNA eingesetzt. Ein Standard Real-time PCR-Ansatz enthielt:

10 μ l SYBR-Green Mastermix (Biorad Laboratories, München, Deutschland)
 0,5 μ l 3'-Primer (10 μ mol/ μ l)
 0,5 μ l 5'-Primer (10 μ mol/ μ l)
 1 μ l DNA-Template
 8 μ l dH₂O

Jede Real-time PCR wurde im 3-fach Ansatz einmal für das Zielgen und zur Standardisierung für das Haushalts-Gen Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) durchgeführt. Es wurden nur intronüberspannende Primer verwendet, um eine Synthese von genomischer DNA ausschließen zu können. Das Primerdesign erfolgte mit der Software Primer3Web (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Alle verwendeten Real-time Primer sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Verwendete Real-time PCR Primer

Name	Sequenz (5'→3')	TA[°C]	Produktlänge [bp]
TTC38	GCG CTG ACC ATC TAC GAT AC ATC TGC AGG CGG TAG AGC AT	60	100
GAPDH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG	60	114

Zur Überprüfung ob spezifische PCR Produkte gebildet wurden, wurde im Anschluss an jede Real-time PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Temperatur schrittweise von 40°C auf 95°C erhöht. Dies führte zu einer schrittweisen Denaturierung der PCR-Produkte, wodurch in die DNA interkaliertes SYBR Green freigesetzt wurde und die Fluoreszenz abnahm. Der Schmelzpunkt eines jeden PCR Produktes ist spezifisch und charakteristisch, da es maßgeblich auf den CG Gehalt der DNA zurückzuführen ist. Die Schmelzkurven ergaben sich aus der Ableitung der Funktion der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur.

Auswertung der Real-time PCR

Die Auswertung der Real-time PCR erfolgte nach der komparativen C_T Methode nach Fink (Fink et al., 1998). Hierzu werden zunächst die C_T Werte jeder Probe bestimmt. Der C_T Wert gibt an, wann die Fluoreszenzintensität erstmals die Hintergrundintensität übersteigt. Ab diesem Wert erfolgt ein exponentieller Anstieg der PCR Produkte und somit der Fluoreszenz. Bei hohen Ausgangskonzentrationen der Template cDNA ist dieser Wert schneller erreicht als bei einer niedrigen cDNA Konzentration. Es erfolgt hierbei keine absolute Quantifizierung der cDNA Menge, sondern eine relative Quantifizierung nach der logarithmisch linearen Reaktionskinetik. Hierbei wird die Differenz der Fluoreszenzintensität zwischen zwei Zeitpunkten genutzt. Anschließend werden die ΔC_T Werte vom Zielgen nach folgender Formel ins Verhältnis zu denen des Referenzgenes (Haushaltsgen GAPDH) gesetzt:

$$\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Zielgen}} - \Delta C_{T \text{ Referenz}}$$

Diese Werte werden wiederum zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen (z.B. Tumor vs. Normalgewebe, Tumor mit Rezidiv vs. Tumor ohne Rezidiv, Wildtypzelllinie- oder Kontrollklon vs. transfiziertem Klon) durch Ermittlung des $\Delta \Delta C_T$ -Wertes zueinander ins Verhältnis gesetzt. Hierzu wird ein gemessener Wert als Normwert für jede Gruppe festgesetzt (im Falle von Zelllinien z.B. in der Regel der Wildtyp zur Normierung).

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ Norm Gruppe 1} - \Delta C_T \text{ Norm Gruppe 2}$$

Abschließend folgt die Berechnung des relativen Expressionslevel nach

$$\text{Expressionlevel} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Die Reverse-Transkription von RNA sowie semiquantitative Real-time PCRs von Zelllinien wurden teilweise von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit und Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit jeweils unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.6.5 DNA Isolation aus Zelllinien

Zur Isolation von DNA aus Zelllinien wurden die Zellen einer zu 80% konfluenten T75er Flasche trypsinisiert und das Zellpellet bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die DNA Isolation erfolgte mit dem QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Zur Lyse der Zellen und Freisetzung der DNA wurden 200 µl PBS, 20 µl Proteinase K, 8 µl RNase A (50 mg/ ml) und 200 µl Puffer AL zugegeben und das Falcon 15 Sekunden gut gemischt (gevortext). Anschließend wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 56°C inkubiert.

Zur Präzipitation der DNA wurden 200 µl absoluter Ethanol zugegeben. Nach dem Mischen („vortexen“) wurde die Suspension in ein *QIAmp SpinColumn* überführt und 1 Minute bei 5.900 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die DNA wurde mit 500 µl Puffer AW1 gewaschen. Nach dem Zentrifugieren bei 8.000 rpm für eine Minute wurden 500 µl Puffer AW2 auf das *QIAmp SpinColumn* pipettiert und erneut zentrifugiert (16.100 g, 1 Minuten). Der Durchfluss wurde verworfen und der Ansatz für eine weitere Minute bei 16.100 g trocken zentrifugiert. Die DNA wurde mit 52 µl warmen Elutionspuffer AE oder 10 mM Tris-HCl pH 8,0 für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und durch Zentrifugation bei 5.900 g für 1 Minute eluiert.

3.6.6 Cycle-PCR von Plasmiden

Vor der Transfektion der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 wurden die eingesetzten Plasmide sequenziert, um die Sequenz auf Fehler zu überprüfen. Hierbei wurde der *Terminator Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) eingesetzt. 0,5 µg DNA wurden mit 4 µl Puffer, 10 mM Primer und 4 µl *Terminator Ready Reaction Mix* versetzt und die PCR wie folgt durchgeführt: 96°C für 1 Minute gefolgt von 25 Zyklen 96°C für 10 Sekunden, 55°C für 5 Sekunden, 60°C für 4 Minuten. Der Puffer enthielt sowohl Didesoxynukleotide (ddNTP's) als auch dNTP's. Der Einbau von ddNTP's während der DNA Amplifikation führt zum Abbruch der Kettenverlängerung (Sanger et al., 1977). Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung der vier ddNTP's ist nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Amplifikate ein Rückschluss auf die DNA Sequenz möglich. Die 20 µl PCR Produkte wurden durch Zugabe von 80 µl HPLC-Wasser, 10 µl Natriumacetatlösung (3M, pH 4,6) und 250 µl Ethanol präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 25 µl Formamid aufgenommen und auf dem AbiPrism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) sequenziert. Die

erhaltene Sequenz wurde mit Hilfe der Software Bioedit (Version 7.0.4.1) mit der vom Hersteller angegebenen Plasmidsequenz verglichen.

Die Plasmidsequenzierung der sh-RNA Plasmide von TTC38 wurden von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.6.7 Transformation von E. coli

Vor der Transfektion der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 wurden die Plasmide vermehrt. Dies erfolgte mit der Kombination aus Elektrotransformation von E. Coli, anschließender Flüssig über Nacht Kultur der transformierten E. Coli und einer Plasmidisolation.

Die Transformation von E. Coli wurde mittels Elektroporation durchgeführt, da hier eine hohe Transformationseffizienz von 10^9 transformierten Zellen pro μg DNA erreicht werden kann (Glick B, 1995). 40 -50 μl E. Coli JM 83 wurden mit 10 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine sterile Küvette überführt. Der Elektroschock erfolgte bei 2,5 kV. Anschließend wurden 400 – 500 μl SOC Medium zu den Bakterien gegeben. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C wurden 1 μl der Lösung auf LB_{Amp} Platten (100 μg Ampicillin pro ml Medium) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.6.8 Flüssig über Nacht Kultur der transformierten E.coli

Zur Vermehrung der transformierten E. Coli JM 83 wurden eine Kolonie der über Nacht Kultur (siehe Kapitel 3.6.7 Transformation von E. coli) gepickt und steril in 10 ml flüssiges LB_{Amp} Medium (100 μg Ampicillin pro ml Medium) überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 150 rpm im Unimax 1010 Schüttler (Heidolph, Schwabach, Deutschland) inkubiert.

3.6.9 Plasmidisolation

Die Isolation der amplifizierten Plasmide aus E. Coli JM 83 erfolgte mit dem *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die Zellen aus 100 ml Flüssig über Nacht Kultur (Kapitel 3.6.8 Flüssig über Nacht Kultur der transformierten E.coli) wurden bei 6.000 g für 15 Minuten bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden in 10 ml Puffer P1 durch Vortexen vollständig resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P2 zugegeben und die Lösung für 5 Minuten bei RT inkubiert. 10 ml Puffer P3 wurden hinzugegeben. Der Ansatz wurde durch Vortexen gut gemischt und anschließend in eine vorbereitete *QIA Filter Cartridge* überführt. Während der 10 minütigen Inkubation wurden die QIAGEN TIPS mit 1 ml Puffer QBT equilibriert. Das Lysat wurde anschließend durch das *QIA Filter Cartridge* gedrückt und auf dieselbe Weise 3 x mit 15 ml Puffer QF gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 ml Puffer QF. Die eluierte DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und bei 15.000 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde mit 5 ml 50% EtOH

gewaschen, für 10 Minuten bei 15.000 g zentrifugiert und anschließend bei RT getrocknet. Nach Aufnahme in steriles Wasser erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop (siehe Kapitel 3.6.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (RNA und DNA)).

Transformation von E.coli, Flüssig Über-Nacht Kultur dieser sowie die Plasmidisolation der TTC38 shRNA Plasmide wurden von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.6.10 PCR zur Testung humaner Zelllinien auf Mykoplasmen

Die Testung der genutzten humanen Zelllinien auf Mykoplasmen erfolgte mit dem PCR Mycoplasma Test Kit I/C (Promokine, Heidelberg, Deutschland) nach Herstellerangaben. Ein Milliliter Mediums-Überstand der jeweiligen 80-90% konfluenten Zellkulturen wurde bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. Der Mediumsüberstand wurde bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl DNA-freiem DEPC-Wasser aufgenommen. 22 µl Rehydrierungspuffer wurden mit 1 µl Taq-Polymerase und 2 µl Probe gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1 Zyklus	95 °C für 2 Minuten.
38 Zyklen	94 °C für 30 sek.
	55 °C für 30 sek.
	72 °C für 40 sek.

Anschließend wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert. Die PCR-Tests auf Mykoplasmen wurden alle 3 Monate von Frau Norina Labude durchgeführt und ausgewertet. Eventuell kontaminierte Zellkulturen wurden verworfen.

3.6.11 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dem Auftrennen von DNA Molekülen nach ihrer Größe. Dabei macht man sich die negative Ladung der DNA zu nutze. Die negativ geladenen DNA Moleküle wandern in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Ein engmaschiges Netz, wie z.B. ein Agarosegel, wirkt dabei wie ein Sieb. Aufgrund dessen korreliert die Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional mit dem Logarithmus der Molekülgröße. Eingesetzt wurden 0,8 - 3%ige Agarose, die in 1 x TBE Puffer aufgekocht wurde. Nach dem Abkühlen auf 80°C wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel ausgehärtet. Die DNA wurde 1:4 mit 4-fach Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 5 V/cm durchgeführt. Nach dem Ende der Elektrophorese konnte die DNA durch Anregung mit 302 nm auf dem UV-Transilluminator als Bande im Gel sichtbar gemacht werden, da

das zugesetzte Ethidiumbromid während der Elektrophorese in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix interkalierte und bei 302 nm fluoreszierte.

3.7 Zellbiologische Methoden

3.7.1 Verwendete humane Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien und ihr Ursprungsgewebe sind in Tabelle 3.8 aufgelistet. Zum Ausschluss einer Mykoplasmeninfektion wurden alle verwendeten Zelllinien alle 3 Monate mittels Mykoplasmen-PCR (siehe Kapitel 3.6.11, PCR zur Testung humaner Zelllinien auf Mykoplasmen) getestet.

Tabelle 3.8: Verwendete humane Zelllinien und ihr Ursprungsgewebe

Zelllinie	Herkunftsorgan	Herkunftsgewebe
PC-3	Prostata	Adenokarzinom, Knochenmetastase
Du145	Prostata	Adenokarzinom, Gehirnmastase
LnCap	Prostata	Karzinom, linker supraclaviculärer Lymphknoten
MDA-MB-231	Brust	Adenokarzinom, pleurale Effusion
HepG2	Leber	Hepatozelluläres Karzinom

3.7.2 Auftau humaner Zelllinien

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zelllinien wurden unmittelbar nach Entnahme aus dem Stickstoff im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut. Die Zellsuspension wurde umgehend in 10 ml Medium überführt und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert um toxisches DMSO (Dimethylsulfoxid) vom Einfrierprozess zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium mit 20% FCS aufgenommen. Das Medium mit den Zellen wurde in eine T75-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.7.3 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt um Kontaminationen zu vermeiden. Die humanen Karzinomzelllinien wurden in den in Tabelle 3.9 aufgelisteten Medien kultiviert. Alle verwendeten Lösungen, Medien und verwendete Gefäße waren steril, wurden sterilisiert, steril autoklaviert oder filtriert.

Tabelle 3.9: Verwendete humane Zelllinien und Medien

Zelllinie	Herkunftsorgan	Grundmedium	Zusätze
PC-3	Prostata	RPMI 1640	+ 10% FCS + L-Glutamin (reinst, 5ml/500ml) + Penicillin 100U/ml + Streptomycin 10µg/ml
Du145	Prostata	RPMI 1640	+ 10% FCS + L-Glutamin (reinst, 5ml/500ml) + nicht-essentielle Aminosäuren + Penicillin 100U/ml + Streptomycin 10µg/ml
LnCap	Prostata	RPMI 1640	+ 10% FCS + L-Glutamin (reinst, 5ml/500ml) + Penicillin 100U/ml + Streptomycin 10µg/ml
MDA-MB-231	Brust	DMEM (low glucose) (Dulbecco's Modifies Eagle Medium)	+ 10% FCS + L-Glutamin(reinst, 5ml/500ml) + Penicillin 100U/ml + Streptomycin 10µg/ml

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90% trypsinisiert, gesplittet und in frischen T75-Zellkulturflaschen weiter kultiviert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden 3 ml 0,25% Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) auf die Zellen einer T75-Zellkulturflasche gegeben. Bei kleineren Kultivierungsgefäßen wurden entsprechend angepasste Mengen Trypsin-EDTA Lösung verwendet. Trypsin baute hierbei die Adhäsionsproteine der Zellen ab, während EDTA die zur Adhäsion benötigten 2-wertigen Kationen komplexiert. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen nach ca. 3-5 Minuten (Kontrolle im Lichtmikroskop) wurde die Trypsin-Reaktion mit 3 ml Medium abgestoppt und die Lösung in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:20 (bei Bedarf auch in höheren Konzentrationen) neu ausgesät. Verbrauchtes Medium wurde zweimal pro Woche durch frisches Medium ersetzt. Für sämtliche durchgeführte Zellkulturassays wurden Zellen mit einer Konfluenz von max 70% verwendet, da die Zellen bei höheren Dichten nicht mehr exponentiell wachsen und ihr Expressionsprofil und Verhalten bereits verändern.

Die Kultivierung der humanen Zelllinien wurde teilweise u.a. von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit und Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit jeweils unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.7.4 Kryokonservierung humaner Zelllinien

Um Zelllinien dauerhaft ohne Veränderung ihrer Eigenschaften zu lagern, wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden die Zellen einer T75er-Zellkulturflasche zunächst trypsinisiert (siehe Kapitel 3.7.3 Kultivierung humaner Zelllinien) und anschließend in 3 ml kaltem Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen. DMSO diente als Frostschutzmittel und verhinderte die Bildung von Kristallen,

welche die Zellen beim Einfrierprozess schädigen würden. Die Zellsuspension wurde zügig auf drei Kryokonservierungsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden im Stickstoffdampf eines Einfriergerätes (NICOOL LM10, Air Liquide) für 60 Minuten eingefroren und anschließend in Stickstofftanks gelagert.

Die Kryokonservierung der humanen Zelllinien wurde teilweise von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit und Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit jeweils unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.7.5 Zellzahlbestimmung mittels Casy

Für sämtliche durchgeführte Zellkulturassays war zunächst eine Zellzahlbestimmung nötig. Diese diente dem Aussäen der Zellen in einer bestimmten Dichte, die zum einen für optimale Wachstumsbedingungen sorgte und zum anderen eine Vergleichbarkeit der Assays zuließ. Vor dem Zählen der Zellen wurden diese trypsiniert (siehe Kapitel 3.7.3 Kultivierung humaner Zelllinien) und in 10 ml Medium resuspendiert. 100 µl dieser Lösung wurden entnommen und in 9,9 ml Elektrolytpuffer Casy®ton aufgenommen. Diese Lösung wurde von einer Kapillare des Casy 1 TT Zellzählgerätes (Schärfe-System GmbH, Reutlingen) aufgezogen und durch ein elektrisches Feld zwischen zwei Platinelektroden geleitet. Beim Durchtritt der Zellen durch das elektrische Feld kommt es zur messbaren Änderung des Widerstandes. Die Größe der Änderung spiegelt dabei die Zellgröße wider, die Anzahl der Widerstandsänderungen die Zellzahl. Somit ist eine Diskriminierung von Zelltrümmern, toten Zellen und lebenden Zellen möglich. Die Zellen konnten aufgrund der Messergebnisse in der benötigten Konzentration verdünnt werden und für die Zellkulturassays eingesetzt werden.

3.7.6 Stabile Transfektion der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Um die Funktionen von TTC38 im Zellkontext und ihren Einfluss auf das karzinogene Geschehen zu analysieren, waren adäquate Modelle nötig. Zelllinien stellen solche adäquaten Zellkulturmodelle dar. Sie sind eine leicht verfügbare Quelle, die den jeweiligen Tumorsubtyp repräsentieren können (Neve et al., 2006). Da das Zellkulturmodell über einen längeren Zeitraum ein stabiles System zur funktionellen Analyse darstellen muss, wurde die Technik der stabilen Transfektion gewählt. Hierbei wurden die Zellen stabil mit dem jeweiligen Zielgenen bzw. der entsprechenden shRNA transfiziert.

Für ein adäquates Zellkulturmodell standen die humanen Prostatakarzinomzelllinien Du145 und PC-3 zur Auswahl. Aufgrund der TTC38 Expressionsergebnisse der beiden Zelllinien (siehe Kapitel 4.6.3.1 Funktionelle *in vitro* Charakterisierung der TTC38 Transfektanden), wurde zunächst Du145 als Zellkulturmodell für die stabile TTC38 Überexpression gewählt. Da hier eine erfolgreiche TTC38 Überexpression nicht möglich war, wurde im nächsten Schritt PC-3 als Zellkulturmodell für den stabilen

TTC38 Knockout gewählt. Später wurde vergleichend aus dieser Zelllinie noch ein Zellkulturmodell für die TTC38 Überexpression etabliert. Die verwendeten Vektoren sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

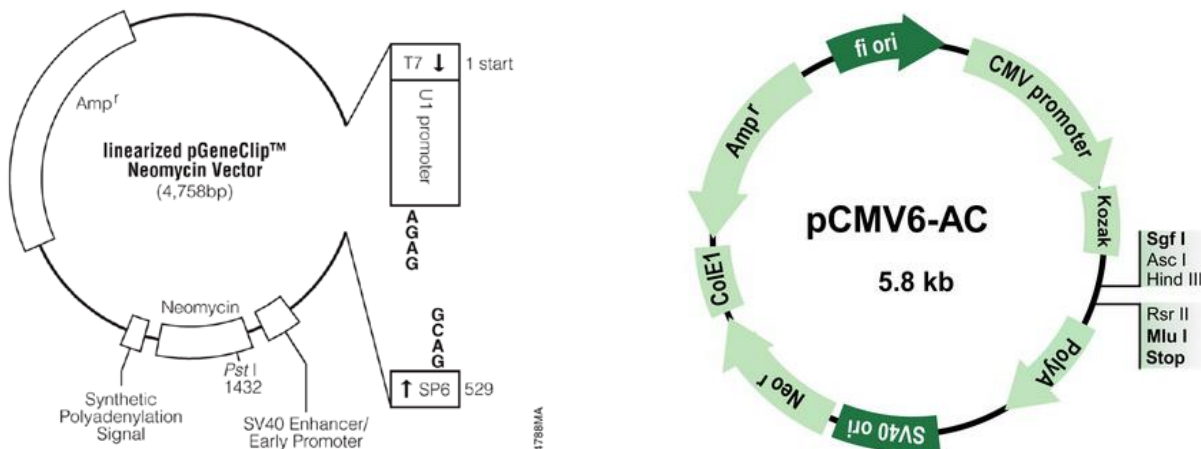


Abbildung 3.1: Verwendete Vektoren für den TTC38 Knockdown und die TTC38 Überexpression in der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3. **A)** Vektorkarte des shRNA Plasmides pGeneClip™ (Promega, Madison, WI, USA) zur Herstellung stabiler TTC38 knockdown Klone. Der Vektor enthält den U1-Promotor unterhalb dessen die shRNA-Sequenz eingefügt wird, ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion der stabilen Transfektanten und ein Ampizillinresistenzgen zur Selektion transformierter *E. Coli*. (Quelle: <http://www.promega.com/~pdf/products/rna-analysis/rna-interference/geneclip-u1-hairpin-cloning-systems/>, Promega (Madison, WI, USA)) **B)** Vektorkarte des Vektors pCMV6-AC (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) zur Herstellung der stabilen TTC38 Überexpressionsklone. Der Vektor enthält einen CMV-Promotor, eine Neomycinresistenz zur Selektion der stabilen Transfektanten, sowie ein Ampizillinresistenzgen zur Selektion transformierter *E. coli*. (Quelle: www.origene.com/destination_vector/PS100020.aspx, OriGene Technologies (Rockville, MD, USA)).

Für den TTC38 Knockdown standen vier verschiedene Plasmide zur Verfügung (Tabelle 3.10). Alle vier Plasmide wurden einmal getrennt und einmal als Mix aus allen Plasmiden transfiziert und die Transfektionseffizienz später mittels Real-time PCR überprüft. Zur Kontrolle diente ein Plasmid, welches „scrambled“ shRNA enthielt, die gegen kein Gen eines Organismus gerichtet ist.

Tabelle 3.10: Eingesetzte shRNA Sequenzen zum Knockdown der TTC38 Expression in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Plasmid	shRNA-Sequenz
Rot (Knockdown)	gtgaagacaatggtggagatttcttctgtcaaaatctccaccattgtcttcact
Gelb (Knockdown)	gcactgggctttatatctgattcttctgtcaaatcagatataaagcccagtgtct
Grün (Knockdown)	gtcttcaaccagctgctgattcttctgtcaaatcagcagctggtgaagacct
Blau (Knockdown)	gagattctgttgctcgaatttcttctgtcaaaatcgagcaacagaatctcct
Weiß (Kontrolle)	ggaatctcattcgatgcataccttctgtcagatgcatcgaatgagat

G418 und Puromycin Konzentrationsbestimmungen

Um stabil transfizierte Klone herstellen zu können, ist es nötig, die Zellen, die ein Plasmid erfolgreich integriert haben, von denen zu selektieren, die kein Plasmid integriert haben. Hierzu wurden Selektivantibiotika eingesetzt. Für die Vektoren pGeneClip™ (Promega, Madison, WI, USA) und pCMV6-AC (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) wurde zur Herstellung stabiler TTC38 Überexpressions- bzw. Knockouttransfektanten G418 als Selektivum eingesetzt. Vor der eigentlichen Transfektion mussten die optimalen Konzentrationen des Selektivmediums identifiziert werden. Hierzu wurden 3×10^5 Zellen pro Well einer 6-Well-Schale ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel und die Zugabe der entsprechenden Antibiotikakonzentrationen 0 µg/mL, 200 µg/mL, 250 µg/mL, 300 µg/mL, 350 µg/mL, 400 µg/mL, 450 µg/mL, 500 µg/mL und 1000 µg/mL für G418 und 0 µg/mL, 0,04 µg/mL, 0,08 µg/mL, 0,14 µg/mL, 0,21 µg/mL, 0,41 µg/mL, 1,02 µg/mL, 2,05 µg/mL und 3,07 µg/mL für Puromycin. Jede Konzentration wurde im Doppelansatz ausgetestet. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt und durch frisches Medium und Antibiotika ersetzt. Die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der nach 7-10 Tagen alle Wildtypzellen abgestorben waren, wurde als Selektionskonzentration gewählt.

Durchführung der stabilen Transfektion

Es wurden 3×10^5 Zellen in 6-Well Schalen ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei einer Konfluenz von 80% erfolgte die Transfektion mit dem Transfektionsreagenz FuGENE HD (Promega, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben. Hierzu wurden für alle verwendeten Plasmide verschiedenen Ratios Transfektionreagenz:DNA eingesetzt (siehe Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: Ratio von serumfreiem Medium (SFM), Fugene HD und Plasmid-DNA für die Transfektion der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Well	SFM (µl)	Fugene HD (µl)	DNA (µg)	Funktion
A	100	0	0	Zellkontrolle
B	94	6	0	Toxizitätskontrolle Fugene HD
C	100	0	1	Toxizitätskontrolle Plasmid
D	97	3	1	Transfektion (3:1)
E	97	3	2	Transfektion (3:2)
F	94	6	1	Transfektion (6:1)

Das SFM (serumfreie Medium) wurde vorgelegt. Nach Zugabe von Transfektionsreagenz und DNA erfolgte eine 30 minütige Inkubation. In dieser Zeit bildeten sich die Liposomen, die die Transfektion vermitteln: Die negativ geladenen Vektoren DNA bildeten mit den positiv geladenen Liposomen des Transfektionsreagenz einen Komplex, der wiederum mit der Zellmembran verschmelzen konnte und somit die DNA in die Zelle einbrachte (Lottspeich, 2008). Nach Zugabe der Transfektionslösung zu den Zellen wurden diese für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze B)

und C), die der Toxizitätskontrolle dienten, verworfen. Die Zellen der Ansätze A, D, E und F wurden trypsinisiert und in Verdünnungsreihen 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:5000 und 1:10000 in 10 cm Petrischalen ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 Stunden erfolgte die Zugabe des Selektivums in der zuvor bestimmten Konzentration. Die Zellen wurden für 10-14 Tage unter Selektionsdruck inkubiert bis alle Wildtypzellen unter dem Selektionsdruck gestorben waren.

Zur Isolation von Einzelklonen wurden mit Silikonpaste eingefettete Klonierungsringe verwendet. Diese wurden um die Einzelkolonien befestigt. Hierin fand anschließend die Trypsinierung der Einzelkolonien (siehe Kapitel 3.7.3 Kultivierung humaner Zelllinien) statt. Die einzelnen Kolonien wurden in 96-Well Schalen umgesetzt und mit konditioniertem Medium ($\frac{1}{2}$ frisches Medium + $\frac{1}{2}$ strilfiltriertes Medium von PC-3 Wildtypzellen) inkubiert. Jeweils bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen trypsinisiert und in das nächst größere Kulivierungsgefäß (48-, 24-, 12-, 6 well, T25-, T75-Zellkulturflasche) überführt. Bis zum Wachstum der Zellen in 6-Well Platten wurde konditioniertes Medium verwendet, anschließend wurden die Zellen in normalem Zellkulturmedium weiter kultiviert.

Die Herstellung der TTC38 knockdown Klone erfolgt durch Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler.

3.7.7 Funktionelle *in vitro* Experimente

3.7.7.1 XTT-Assay

Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde mittels XTT Cell Proliferation Kit II (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben untersucht. Der Assay beruht auf dem Prinzip der Umwandlung des Tetratzolium Derivates XTT 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid zu Formazansalz durch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen (Berridge et al., 2005). Formazansalz färbt das Medium der Zellen gelb und absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 450 – 500 nm. Dies konnte im ELISA Reader gemessen werden. Als Referenz dienten Messungen bei einer Wellenlänge von 650 nm.

Zur Durchführung des Assays wurden 300 - 500 Zellen je Well einer 96-Wellplatte für die verschiedenen Messzeitpunkte (Tag 0 - Tag 7) ausgesät. Am Tag der Messung wurde das Medium der Zellen gewechselt. Anschließend wurden 50 µl XTT Reagenz mit 1 µl Elektronenentkopplungsreagenz aktiviert und dem Well einer 96-Well Schale zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 4 Stunden erfolgte die Messung am ELISA Reader Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz). Alle Messungen erfolgten im 6-fach Ansatz.

XTT-Assay wurden teilweise von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit und Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit jeweils unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.7.7.2 Kolonienbildungstest (*Colony Formation Assay*)

Mit dem Kolonienbildungstest (*Colony Formation Assay*) werden das Kolonienbildungsvermögen einzelner Zellen und das Wachstumsverhalten der Zellen über einen längeren Zeitraum untersucht. Hierbei spielen Migration, Proliferation und die Vitalität der Zellen eine Rolle. Weiterhin lässt sich die Morphologie der aus einer einzelnen Zelle entstandenen Kolonie analysieren.

Zur Durchführung der Kolonienbildungstests wurden 500 bzw. 1.000 Zellen im 3-fach Ansatz in 6-Well Platten mit 2 ml Medium für 12-14 Tage inkubiert. Das Medium (im Falle stabiler Transfektanten mit Selektivum G418 bzw. Puromycin) wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach 10-14 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett-Lösung (0,25% Kristallviolett in 80 % Methanol, 10 % Formaldehyd und 10% Aqua bidest) fixiert und gefärbt. Nach 30 minütiger Inkubation wurden die Zellen viermal mit Aqua bidest gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Die Assays wurden fotografiert und mit der Software *Image Quant TL v2003.02* (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) densitometrisch ausgewertet.

Kolonienbildungstests wurden teilweise von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit und Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit jeweils unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.7.7.3 Wundheilungsassay (*Scratch Assay*)

Um das Migrationsverhalten von Zellen zu untersuchen wurde ein so genannter Wundheilungsassay (*Scratch Assay*) durchgeführt (Sahai, 2005). Für diese Untersuchungen wurden 400.000 Zellen pro Well einer 6-Well Schale ausgesät und für 36 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde bei einer Konfluenz von 100% mit einer sterilen Pipettenspitze ein Kratzer (*Scratch*) durch den Zellrasen gezogen. Alternativ zum Ziehen eines *Scratches* mit einer sterilen Pipettenspitze wurden je 12.500 Zellen pro Hälfte einer Kammer eines Silikon-Inserts inkubiert und diese nach 36 Stunden Inkubation entfernt. Abgelöste Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der *Scratch* im Zellrasen wurde bis zum Zuwachsen der Zellen in regelmäßigen Zeitabständen fotografiert und der Zeitpunkt des Zuwachsens für jeden Zellklon bestimmt. Alle Assays wurden im 3-fach Ansatz durchgeführt.

Wundheilungsassays wurden teilweise von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit und Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit jeweils unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt.

3.7.7.4 *Boyden Chamber* Invasionsassay

Das Invasionsverhalten der Zellen wurde mit einem *Boyden Chamber* Invasionsassay durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und 5×10^4 Zellen in die obere Kammer der *BD BioCoat Growth Factor Reduced MATRIGEL Invasion Chamber* (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) überführt. Die Zellen wurden in 500 μ l Serum freiem Medium für 72 Stunden inkubiert, während die untere Kammer der Boyden Chamber mit 750 μ l serumhaltigem Medium aufgefüllt wurde. Während der Inkubation diente das fötale Kälberserum (FCS) als Chemoattractance. Die Zellen invadieren daher durch die 8 μ m großen, mit Matrigel beschichteten Poren der Boyden Chamber hin zum FCS. Das Matrigel simulierte bei diesem Aufbau die Basalmembran, während die Poren die Hürde, die die Zellen bei der Intravasation überwinden mussten, simulierten. Durch Matrigel und Poren mussten die Zellen hindurch invadieren, bevor sie die als Chemoattractance dienende mit serum-haltigem Medium gefüllte untere Kammer der Boyden Chamber erreichten. Nach der Inkubation konnte die Anzahl der migrierten Zellen durch Fixierung und Färbung der in die untere Kammer gelangten Zellen bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit einer 1%igen Kristallviolettlösung (1% Kristallviolett in 80 % Methanol, 10 % Formaldehyd und 10% Aqua Bidest) fixiert und gefärbt. Vor Fixierung und Färbung der Zellen wurde das Matrigel mit einem sterilen Wattestäbchen entfernt.

Boyden Chamber Invasionsassays wurden teilweise von Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

3.8 Statistische und bioinformatische Methoden

3.8.1 Statistische Analysen mit SPSS

Statistische Analysen wurden mit dem Programm SPSS Version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Statistische Signifikanz war immer definiert ab einem p -Wert ≤ 0.05 . Die Unterschiede in der Proteinexpression von zwei Gruppen wurden mittels eines zweiseitigen, nicht-parametrischen Mann-Whitney U -Tests ermittelt. Univariate Überlebensanalysen von Patienten in Abhängigkeit von klinikopathologischen und immunohistochemischen Faktoren wurden nach der Methode von Kaplan-Meier berechnet, wobei die Signifikanz der Funktion mittels Log-Rank Statistik ermittelt wurde. Rezidiv-freies Überleben war definiert als Zeitintervall zwischen Prostatektomie und dem Auftreten eines PSA-Rezidivs. Sie wurde zensuriert für Patienten ohne PSA-Anstieg $> 0,2$ ng/ml beim letzten klinischen Kontakt. Korrelationskoeffizienten zwischen verschiedenen klinikopathologischen Parametern und immunhistochemischen Ergebnissen innerhalb der Patientenkollektive wurden nach Pearson berechnet und zweiseitig auf Signifikanz (definiert als $p < 0,05$) getestet.

3.8.2 Ingenuity Pathway Analysen (IPA)

Die Einordnung der mittels 2D-DIGE und Massenspektrometrie zwischen tumorfreiem Gewebe und Prostatakarzinomen sowie zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteinen in Netzwerke und mögliche Signalwege erfolgte mit der Software Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity, Redwood City, CA, USA). *Core Analysen* wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Referenzset war die „*Ingenuity Knowledge Base (Genes only)*“ für direkte und indirekte Beziehungen. Das Confidence Intervall wurde auf „experimentally observed“ gesetzt. Als Spezies wurden humanes Gewebe und Zelllinien zugelassen. Die Analysen der mittels LC-MS identifizierten deregulierten Proteine zwischen verschiedenen TTC38 Überexpressions- und Knockdown-Klonen sowie den dazugehörigen Kontrollen wurden analog wie beschrieben durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist eine sehr heterogene und multifokale Erkrankung, an der jedes Jahr alleine in Deutschland über 12.000 Patienten versterben. Zuverlässige Marker zum Screenen auf ein Prostatakarzinom sind zurzeit nicht vorhanden. Bei der Prostatakarzinom-Diagnosestellung an sich lautet eine der wichtigsten Fragen, ob der Patient ein Rezidiv entwickeln wird oder nicht. Zum heutigen Zeitpunkt lässt sich diese Frage bei der Diagnosestellung anhand verwendeter prä- und postoperativer Nomogramme mit Treffsicherheit einer von 70% – max. 85% nicht befriedigend beantworten (Hinev et al., 2011; Guazzoni et al., 2011). Daher werden dringend neue Biomarker benötigt, die bereits zum Diagnosezeitpunkt das Rezidivrisiko eines jeden Patienten angeben können. In dieser Studie sollten daher solche neuen potentiellen Biomarker für das (rezidivierende) Prostatakarzinom identifiziert werden.

4.1.1 Vorversuche an Prostatektomieproben von sechs Prostatakarzinompatienten zur Etablierung der 2D-DIGE

Vor der Durchführung der eigentlichen Hauptstudie galt es die Methode der 2-dimensionalen *Difference in Gel Electrophoresis* (2D-DIGE) am vorliegenden Prostatagewebe zu validieren. In den hierzu durchgeführten 12 Vorexperimenten wurde eine Menge von 2,5 µg für den internen Standard und eine Fläche von 4 mm² eines 14 µm kryokonserviertem Gewebeschnitts mit mindestens 80%igem Drüsenanteil als optimal identifiziert. Unter den zur Verfügung stehenden Zellaufschlussmethoden (Ultraschallbad, Ultraschallstab, Mörser und Disruption mittels Glaskügelchen), welche in acht weiteren Vorversuchen untersucht wurden, stellte sich der Aufschluss mit Glaskügelchen als die erfolgreichste Methode heraus, bei der die in anschließenden 2D-DIGE Analysen die meisten Spots detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Weiter wurde überprüft, ob die Methode für die bestehende Fragestellung geeignet ist. Hierzu wurden zunächst Prostatektomieproben von drei Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv und vier Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv mikrodisektiert. Zusätzlich wurden drei tumorfreie Prostatektomieproben mikrodisektiert. Die Proben wurden anschließend mittels 2D-DIGE analysiert. Nach dem Scannen der Gele erfolgte die Auswertung mit dem Programm Delta2D von Decodon. Eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal component analysis*, PCA) zeigte dabei, dass sich Prostatektomieproben von Patienten mit und ohne Rezidiv und tumorfreie Prostatektomieproben grundsätzlich voneinander unterscheiden lassen (Abbildung 4.1).

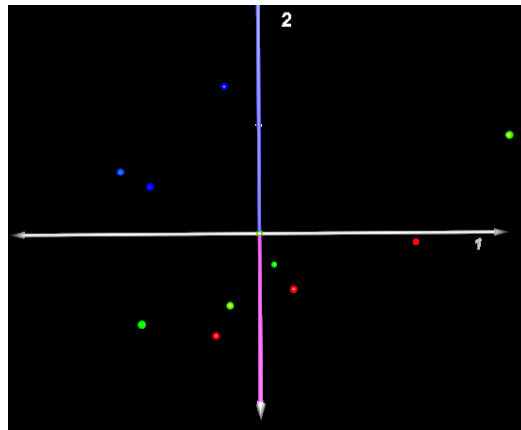


Abbildung 4.1: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der 2D-DIGE Analyse von drei Prostataktomieproben von Patienten mit Rezidiv (rot), vier Prostataktomieproben ohne Rezidiv (grün) und drei tumorfreien Prostataktomieproben (blau). Die verschiedenen Prostataktomieproben lassen sich mittels PCA voneinander unterscheiden.

Weiterhin konnten mit der 2D-DIGE 12 Proteinspots in Prostataktomieproben von Patienten mit Rezidiv als herauf- und 15 Proteinspots als herabreguliert gefunden werden, im Vergleich zu den Proben von Patienten ohne Rezidiv (Abbildung 4.2). Zwischen Tumoren mit Rezidiv und den tumorfreien Proben konnten 36 differentiell exprimierte Proteinspots detektiert werden. Hiervon waren 18 Spots in den Proben von Patienten mit Rezidiv herauf- und 18 Spots in den Proben von Patienten ohne Tumor herunterreguliert. Weiterhin waren sieben Proteinspots in Prostataktomieproben von Patienten ohne Rezidiv im Vergleich zu den tumorfreien Proben herauf- und 19 Spots herunterreguliert.

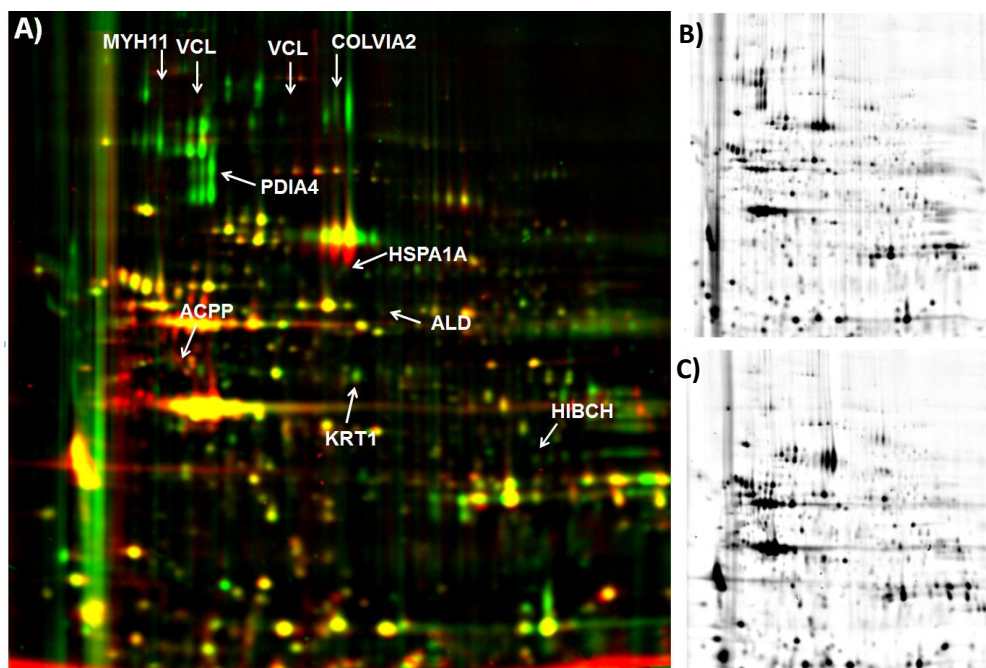


Abbildung 4.2: Vorversuche der 2D-DIGE Analysen von drei Prostataktomieproben von Patienten mit Rezidiv und drei Prostataktomieproben von Patienten ohne Rezidiv. **A)** Differentiell exprimierte Proteine dargestellt in einer Überlagerung von je einem repräsentativen Gel einer Prostataktomieprobe eines Patienten mit (grün) und eines Patienten ohne Rezidiv (rot) (generiert mit der Delta2D Software, Decodon). **B)** und **C)** 2D-DIGE Gele von Prostataktomieproben von Patienten mit **(B)** und ohne **(C)** Rezidiv.

Diese als differentiell exprimiert gefundenen Proteinspots zwischen Prostatektomieproben von Patienten mit und ohne Rezidiv wurden in einem nächsten Schritt aus einem Silber gefärbten präparativen Gel (500 µg Protein) ausgestochen, entfärbt, tryptisch verdaut und am Massenspektrometer "Ultraflexxtreme" (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) identifiziert (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der zwischen Prostatektomieproben mit und ohne Rezidiv differentiell regulierten Spots der Vorversuche der 2D-DIGE, identifiziert mittels MALDI-TOF-MS. Positive Ratios sind hochreguliert in Tumoren mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv. Zur statistischen Analyse wurde ein nicht-parametrischer Wilcoxon-Mann-Whitney Test durchgeführt.

Spotname	Protein	Ratio	p-Wert	pI	MW	Seq. Cov. [%]	Mascot Score
ALD	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	2,483	0,050	6,9	56,346	27	69
VCL	Vinculin	2,950	0,039	5,3	123,722	27	157
MYH11	Myosin-11	3,233	0,004	5,2	227,199	13	118
VCL	Vinculin	2,584	0,024	5,3	123,722	14	74
PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4	2,317	0,044	4,6	72,887	16	65
ACPP	Prostatic acid phosphatase	2,025	0,045	6,1	44,537	32	97
KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1	-3,959	0,020	8,5	65,999	21	79
COL6A2	Collagen alpha-1(VI) chain	-2,031	0,017	6,1	108,512	13	100
HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	-4,594	0,046	8,3	43,454	27	89
HSPA1	Heat shock protein 70 kDa 1A/1B	3,072	0,028	5,3	70,052	21	78

MW = Molekulargewicht, pI-Value = isoelektrischer Punkt der Proteine, Seq. Cov = Sequenzcoverage, Sequenzabdeckung der Proteine

Durch diese Vorversuche konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, neue potentielle Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom mittels 2D-DIGE und Massenspektrometrie zu identifizieren. Folglich wurde die Hauptanalyse von Prostatektomieproben angeschlossen.

4.1.2 Analyse von Prostatakarzinomproben mittels 2-dimensionalen Differences in Gel Electrophoresis (2D-DIGE)

Nachdem die Methode der 2D-DIGE in der Vorstudie etabliert wurde und gezeigt werden konnte, dass die Methode zur Identifikation neuer potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom geeignet ist, erfolgte die Durchführung der eigentlichen Hauptstudie. Auf der Suche nach neuen Biomarkern für das rezidivierende Prostatakarzinom wurden 12 Prostatektomieproben von Prostatakarzinomen ohne Rezidiv, 11 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und 14 tumorfreie Prostatektomieproben mittels 2D-DIGE analysiert. Hierbei wurden nur Proben von so weit möglich Alters, Gleason-Score, TNM-Stadium und R-Status angeglichenen Patienten verwendet. Patienten, die vor der Prostatektomie eine neoadjuvante Therapie erhalten hatten, wurden von dieser Studie ausgeschlossen. Die Prostatektomieproben wurden von den Urologen der Universitätskliniken

Aachen und Dresden zur Verfügung gestellt. Die kryokonservierten Proben wurden mikrodisektiert und das Protein aus 4 mm² eines 14 µm dicken Schnittes mit einem Drüsenanteil von mindestens 80% (korrespondierend zu 2,5 µg Standard) isoliert. Die Proteinexpression wurde mittels der *2D-Difference in Gel Electrophoresis* (2D-DIGE) Technik analysiert. Nach dem Scannen der Gele erfolgte eine softwaregestützte Auswertung mit der Software Delta 2D (Decodon). Hierbei konnten 1.000 Proteinspots detektiert werden. In einer Hauptkomponenten-Analyse ("Principal Component Analysis", PCA) ermöglichten die detektierten Spots eine Trennung der Prostatakarzinome von Patienten ohne Rezidiv und den Proben von Patienten mit Rezidiv. Auch eine Trennung von tumorfreien und tumorhaltigen Proben war mit Hilfe der PCA weitgehend möglich (Abbildung 4.3). Daher konnte im nächsten Schritt nach differentiell exprimierten Proteinspots gesucht werden.

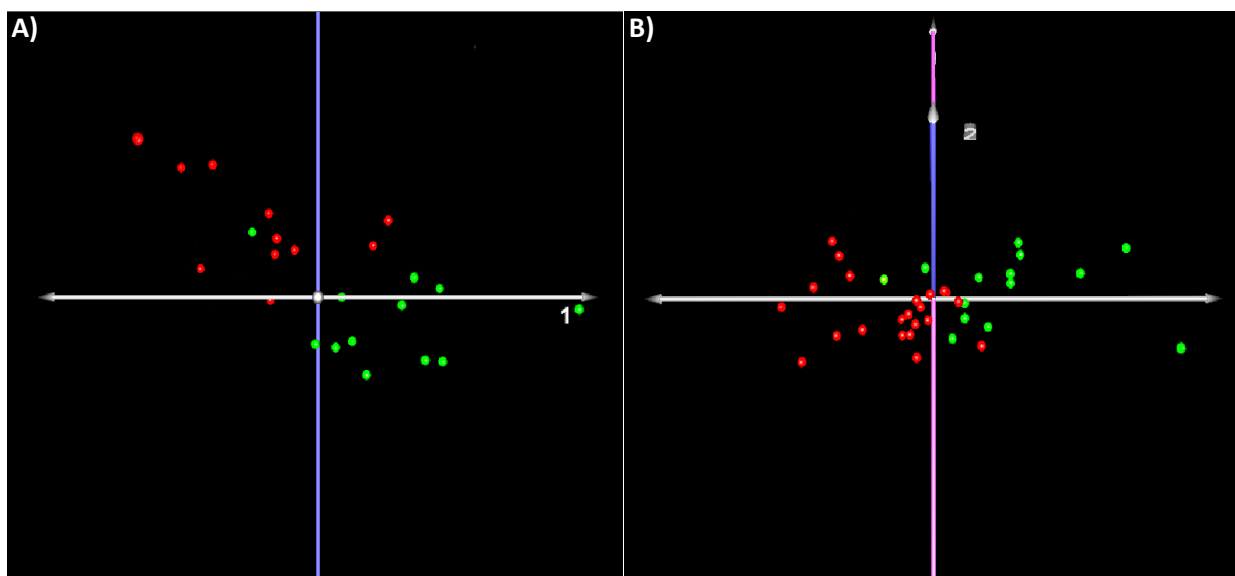


Abbildung 4.3: Hauptkomponentenanalyse der in der 2D-DIGE verwendeten Prostatakarzinomproben. **A)** Hauptkomponentenanalyse der Prostatakarzinomproben der rezidivierenden Prostatakarzinome (grün) gegen die Prostatakarzinomproben der nicht-rezidivierenden Prostatakarzinome (rot). **B)** Hauptkomponentenanalyse von Prostatakarzinomproben mit (rot) und ohne Karzinom (grün).

Von den 1.000 detektierten Proteinspots waren 37 Proteine in den tumorhaltigen Prostatakarzinomproben (Gesamtzahl der Prostatakarzinomproben mit und ohne Rezidiv) heraufreguliert. 27 Proteine waren im Tumorgewebe herunterreguliert, im Vergleich zu den tumorfreien Proben (Abbildung 4.4). In Prostatakarzinomen mit Rezidiv waren 23 Proteinspots herunterreguliert und 13 Proteinspots heraufreguliert im Vergleich zu den Prostatakarzinomproben von Patienten ohne Rezidiv. Die Tabelle 7.14 und Tabelle 7.15 im Anhang geben die Expressionsunterschiede und Signifikanzen der später mittels MS identifizierten Spots an.

Alle in der 2D-DIGE als differentiell exprimiert gefundenen Proteine wurden anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert (Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5).

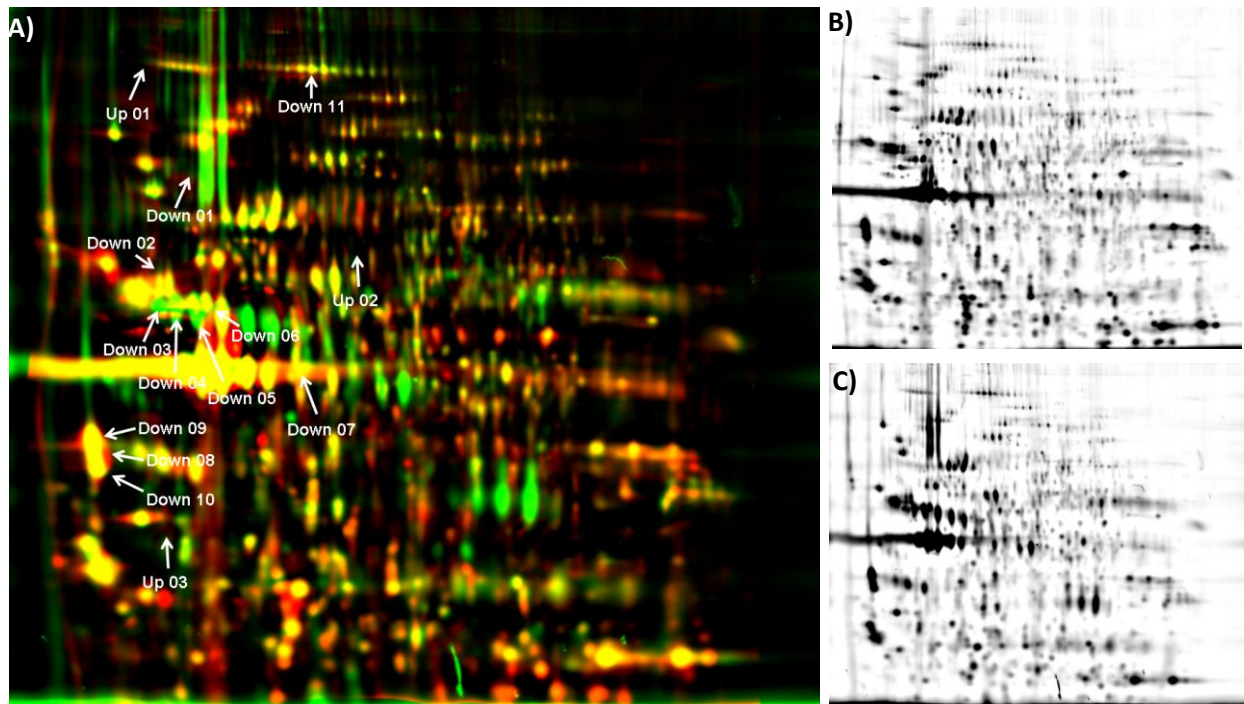


Abbildung 4.4: 2D-DIGE Analyse von 23 Prostataktomieproben von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv und ohne Rezidiv und 14 korrespondierenden tumorfreien Prostataktomieproben. **A)** Differenziell exprimierte Proteine dargestellt in einer Überlagerung eines Gels einer Prostatakarzinomprobe (rot) und tumorfreiem Gewebe (grün) (generiert mit der Delta2D Software, Decodon). **B)** und **C)** 2D-DIGE Gele einer Prostatakarzinomprobe (**B)** und einer tumorfreien Gewebeprobe (**C**).

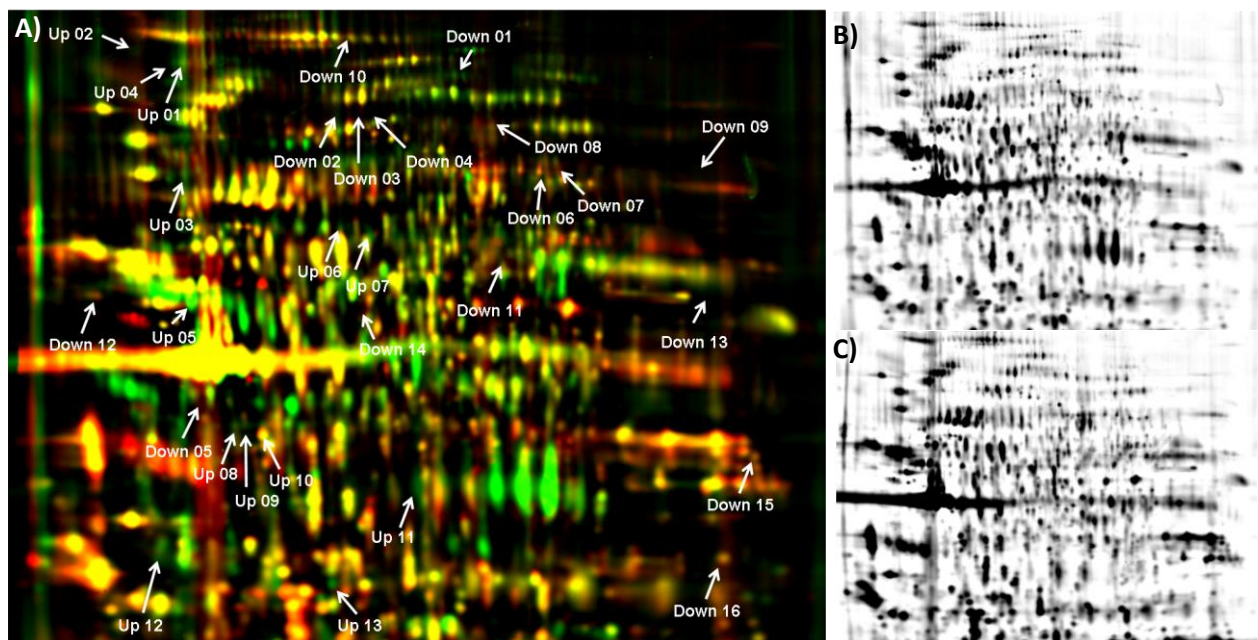


Abbildung 4.5: 2D-DIGE Analyse von elf Prostataktomieproben von Patienten mit Rezidiv und zwölf Prostataktomieproben von Patienten ohne Rezidiv. **A)** Differenziell exprimierte Proteine dargestellt in einer Überlagerung von einem Gel einer Prostataktomieprobe eines Patienten mit (grün) und eines Patienten ohne Rezidiv (rot) (generiert mit der Delta2D Software, Decodon). **B)** und **C)** 2D-DIGE Gele von Prostataktomieproben von Patienten mit (**B**) und ohne (**C**) Rezidiv.

4.1.3 Identifikation differentiell exprimierter Proteine mittels Massenspektrometrie (MS)

Proteinspots, die in der 2D-DIGE Analyse entweder zwischen tumorfreiem Gewebe und Tumoren oder zwischen Proben von rezidivierenden Prostatakarzinomen im Vergleich zu den nicht-rezidivierenden Proben differentiell exprimiert waren, wurden mittels MS identifiziert. Hierzu wurden die Proteinspots aus einem präparativen Silbergel mit 500 µg Protein ausgestochen, entfärbt und tryptisch verdaut. Die Identifikation der Proteine aus den ausgestochenen Proteinspots erfolgte zunächst mittels „*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*“ (MALDI-TOF) und Tandem Massenspektrometrie (MS/MS) auf dem Bruker Massenspektrometer „Ultraflex extreme“ am DWI in Aachen. Proteinspots, bei denen eine Identifikation mittels MALDI-TOF und MS/MS z.B. aufgrund einer zu geringen Proteinmenge nicht möglich war, wurden mittels *Liquid*-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) auf eine LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, San Jose, USA) bzw. einer LTQ Velos Pro (Thermo Scientific, San Jose, USA) oder einem MaXis 4G (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) am Medizinischen Proteom-Center in Bochum identifiziert (siehe Tabelle 7.16 und Tabelle 7.17 im Anhang).

Mit diesen Analysemethoden konnten 10 Proteine als potentielle Biomarker für das Prostatakarzinom identifiziert werden (Tabelle 4.2). Weiterhin konnten 31 potentielle Biomarker zur Stratifizierung der rezidivierenden Prostatakarzinome identifiziert werden (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.2: Identifikation potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom. Dargestellt sind alle zwischen Prostatakarzinomen und tumorfreiem Gewebe in der 2D-DIGE differentiell exprimierten und mittels MS identifizierten Proteine. Proteine mit einer positiven Ratio sind in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreien Proben heraufreguliert, Proteine mit einer negativen Ratio sind entsprechend herunterreguliert.

Spot	Acc. Nr	Protein Name	Ratio Tf vs Tu	p-Wert (T-Test) Tf vs Tu	p-Wert (U-Test) Tf vs Tu
down 01	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	-21,8	0,043	0,035
down 05	P17661	Desmin	-15,7	0,156	0,024
down 06	P17661	Desmin	-9,1	0,085	0,009
down 04	P17661	Desmin	-3,8	0,037	0,012
down 09	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	-2,9	0,035	0,042
down 10	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	-2,9	0,009	0,020
down 08	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	-2,8	0,010	0,019
down 07	P12277	Creatine kinase B-type	-2,7	0,045	0,009
down 11	Q05682	Caldesmon	-2,2	0,115	0,026
down 02	P08670	Vimentin	-1,7	0,053	0,024
down 03	P17661	Desmin	-1,6	0,039	0,110
up 01	COEA1	Collagen alpha-1(XIV) chain	2,4	0,104	0,042
up 03 *	ANXA5	Annexin A5	3,7	0,038	0,033
	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	3,7	0,038	0,033
	P04217	Alpha-1B-glycoprotein	3,7	0,038	0,033
up 02	TCPA	T-complex protein 1 subunit alpha	46,7	0,405	0,049

* = Mix; 2D-DIGE = two-dimensional differences in gel electrophoresis; MS = Massenspektrometrie; Acc. Nr = Accession Nummer; Tf = Tumor frei; Tu = Tumor; U-Test = 2-seitiger Mann-Whitney U-Test

Tabelle 4.3: Identifikation potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom. Dargestellt sind alle in Prostatakarzinomen mit Rezidiv und Prostatakarzinomen ohne Rezidiv in der 2D-DIGE differentiell exprimierten und mittels MS identifizierten Proteine. Proteine mit einer positiven Ratio sind in Prostatakarzinomen mit Rezidiv in Vergleich zu Karzinomen ohne Rezidiv heraufreguliert, Proteine mit einer negativen Ratio sind entsprechend herunterreguliert.

Spot	Acc. Nr	Protein Name	Ratio + vs - Rez	p-Wert (T-Test) + vs - Rez	p-Wert (U-Test) + vs - Rez
down 13	P01857	Ig gamma-1 chain C region	-274,3	0,334	0,041
down 01	FLNA	Filamin-A	-12,0	0,269	0,031
down 12	SCRN1	Secernin-1	-8,9	0,088	0,044
down 04	O95394	Phosphoacetylglucosamine mutase	-7,5	0,228	0,012
down 08	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form	-5,6	0,176	0,031
down 03	P06396	Gelsolin	-5,3	0,092	0,023
down 02	P06396	Gelsolin	-3,5	0,109	0,019
down 16	LEG3	Galectin-3	-3,4	0,272	0,033
down 05	PTGR2	Prostaglandin reductase 2	-3,2	0,047	1,169
down 06	LMNA	Lamin-A/C	-2,6	0,036	0,023
down 14	TTC38	Tetratricopeptide repeat protein 38	-2,4	0,087	0,036
down 15 *	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	-2,3	0,233	0,014
	P51911	Calponin-1	-2,3	0,233	0,014
down 09	P16870	Carboxypeptidase E precursor	-2,2	0,122	0,049
down 10	CO6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	-1,9	0,018	0,031
down 07	LMNA	Lamin-A/C	-1,7	0,133	0,036
down 11	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	-1,7	0,255	0,036
up 08 *	Q9UBR2	Cathepsin Z precursor	1,2	0,529	0,951
	P20774	Mimecan precursor	1,2	0,529	0,951
up 10	CAZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	1,5	0,209	0,042
up 05	PAPP	Prostatic acid phosphatase	1,8	0,048	0,056
up 01	VINC	Vinculin	2,2	0,027	0,031
up 03	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	2,5	0,025	0,036
up 02	COEA1	Collagen alpha-1(XIV) chain	2,5	0,075	0,049
up 09	KCD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	2,6	0,158	0,045
up 11	GLO2	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	3,2	0,047	0,042
up 12 *	ANXA5	Annexin A5	3,2	0,032	0,074
	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	3,2	0,032	0,074
up 04	SYNEM	Synemin	4,9	0,055	0,027
up 13	PRDX4	Peroxiredoxin-4	4,9	0,022	0,004
up 06	ANXA4	Annexin A4	6,4	0,288	0,042
up 07	TCPA	T-complex protein 1 subunit alpha	51,9	0,275	0,031

* = Mix; 2D-DIGE = two-dimensional differences in gel electrophoresis; MS = Massenspektrometrie; Acc. Nr = Accession Nummer; + Rez = Prostatakarzinom mit Rezidiv; - Rez = Prostatakarzinom ohne Rezidiv; U-Test 2-seitiger Mann-Whitney U-Test

4.2 "Ingenuity Pathway Analysen" (IPA) der identifizierten Proteine

Zur Auswahl der vielversprechendsten potentiellen Biomarker für die Validierung wurden neben der Literaturrecherche IPA Analysen herangezogen. Diese wurden mit den mittels MS identifizierten differentiell exprimierten Proteinen durchgeführt. Hierbei war es möglich, sowohl für die zwischen

tumorfremem Gewebe und Prostatakarzinomen als auch für die zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine ein Netzwerk aufzubauen, aus dem die Hauptverknüpfungspunkte hervorgingen und Zusammenhänge zwischen den identifizierten Molekülen deutlich wurden. Für die in tumorfremem Gewebe und Prostatakarzinomen deregulierten Proteine waren laut IPA Analysen Vimentin, Desmin, HNRNPA2B1 und TCP1alpha die Hauptknotenpunkte, welche über weitere Moleküle miteinander in Kontakt stehen (Abbildung 4.6). Aufgrund zusätzlicher erfolgter Literaturrecherchen und der Identifikation von TCP1alpha in beiden 2D-DIGE Analysen (Tumorfremes Gewebe vs. Tumorgewebe und Tumor mit Rezidiv vs. Tumor ohne Rezidiv) wurde TCP1alpha als Molekül für die weiteren Validierungen ausgewählt.

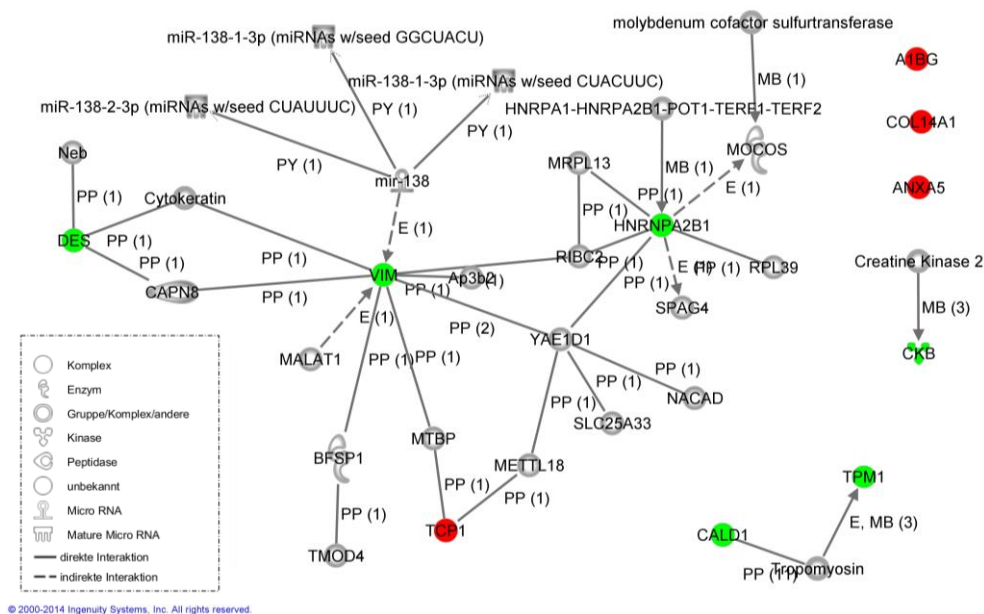


Abbildung 4.6: IPA Analysen der in tumorfremem Gewebe und Prostatakarzinomen deregulierten Proteine. Aufgebaut wurde ein Netzwerk mit allen deregulierten Proteinen unter Hinzunahme der zweimal 20 weiteren wichtigsten Moleküle. Desmin, Vimentin, HNRNPA2B1 und TCP1alpha (TCP1) nehmen Schlüsselrollen im Netzwerk ein. Rot dargestellte Proteine sind in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfremem Gewebe heraufreguliert. Grün dargestellte Proteine sind herabreguliert. Zur Erklärung der Proteinabkürzungen siehe Tabelle 4.4 oder Tabelle 7.18 im Anhang.

Im Netzwerk der zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine stellten sich HSPA5, Gelsolin, IGHG1, Filamin A, Lamin A, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und Galectin-3 als wichtige, zentrale Moleküle heraus (Abbildung 4.7). Aber auch Vinculin nahm eine zentrale Schlüsselposition in kleineren Netzwerken ein. Aufgrund dieser Analysen kombiniert mit der Literaturrecherche wurden für die folgenden Validierungen Vinculin und Gelsolin ausgewählt.

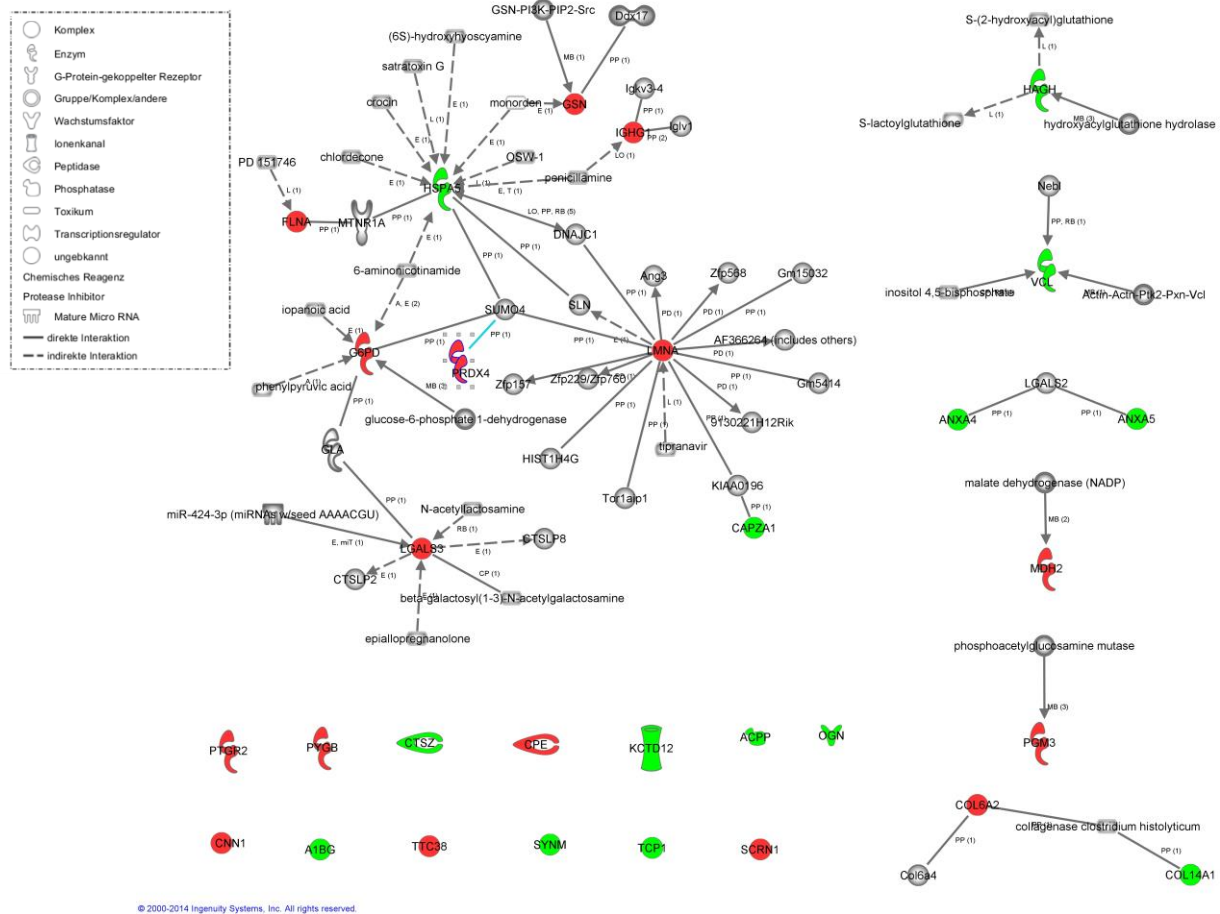
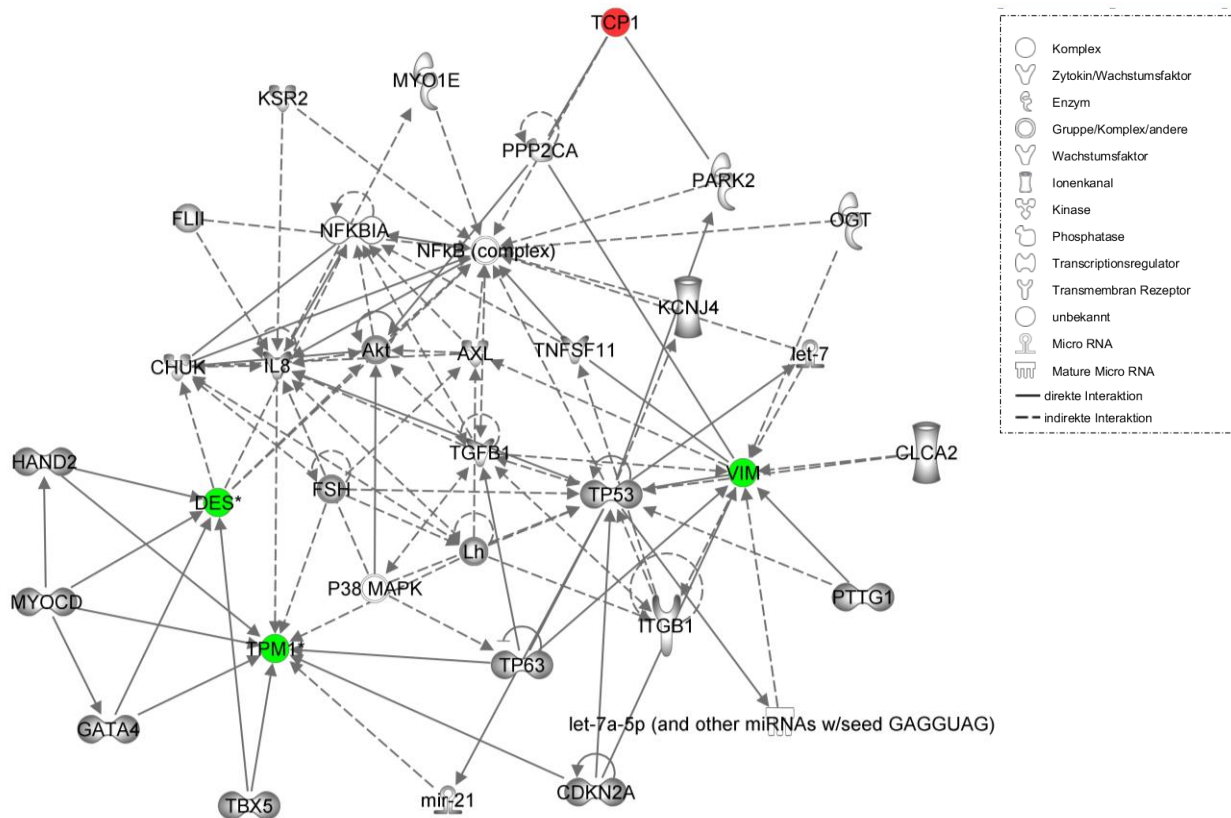


Abbildung 4.7: IPA Analysen der zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine. Aufgebaut wurde ein Netzwerk mit allen deregulierten Proteinen unter Hinzunahme der zweimal 20 wichtigsten Molekülen. Galectin-3 (LGALS3), Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PD), Lamin A (LMNA), Glucose-regulated Protein 78 (HSPA5), Gelsolin (GSN) und IGHG1 nehmen Schlüsselrollen im Netzwerk ein. Grün dargestellte Proteine sind in Tumoren mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv heraufreguliert. Rot dargestellte Proteine sind herabreguliert. Zur Erklärung der Proteinabkürzungen siehe Tabelle 4.4 oder Tabelle 7.19 im Anhang.

Neben der Zusammenfassung der deregulierten Proteine zu einem Netzwerk, welches Zusammenhänge zwischen den Proteinen darstellt, ist mit IPA auch eine Einordnung der identifizierten Proteine nach ihren Funktionen möglich.

Hierbei zeigte sich, dass sich vier von 14 zwischen tumorfreiem Gewebe und Prostatakarzinomen deregulierten Proteinen einem Netzwerk zuordnen ließen (Abbildung 4.8), das für Zelltod und Überleben, Krebs und zelluläre Entwicklung verantwortlich ist. Die Proteine Tropomyosin 1, Desmin, Vimentin und TCP1alpha haben demnach einen Einfluss auf die zelluläre Entwicklung, sowie das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Überleben von Zellen und die Entstehung von Krebs.



© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Abbildung 4.8: IPA Netzwerk, welches für Zelltod und Überleben, Krebs und zelluläre Entwicklung verantwortlich ist. Vier von 14 zwischen tumorfreiem Gewebe und Prostatakarzinomen deregulierten Proteinen (Tropomyosin 1 (TPM1), Desmin (DES), Vimentin (VIM) und TCP1alpha (TCP1)) ließen sich mittels IPA Analysen diesem Netzwerk zuordnen. Rot dargestellte Proteine sind in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe heraufreguliert. Grün dargestellte Proteine sind herabreguliert. Zur Erklärung der Proteinabkürzungen siehe Tabelle 4.4 oder Tabelle 7.20 im Anhang.

Die zwischen tumorfreiem Gewebe und Prostatakarzinomen deregulierten Proteine sind am stärksten mit den fünf molekularen und zellulären Funktionen Zellassembling und Organisation, Zellmorphologie, Kohlenhydratmetabolismus, *cellular compromise* sowie der zellulären Entwicklung assoziiert. Auf Ebene der physiologischen Entwicklung und Funktion sind diese Proteine am stärksten mit der Bindegewebsentwicklung, der Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems, der Organmorphologie und der Tumormorphologie assoziiert. Eine ausführliche Einordnung aller Proteine nach diesen Top 5 Funktionen findet sich in Tabelle 4.4.

Tabelle 4.4: „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der mittels 2D-DIGE und MS als dereguliert identifizierten Proteine. Dargestellt sind ID, Symbol, Lokalisation, Molekültyp und Funktion der im Prostatakarzinom im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe deregulierten Proteine. Es sind nur die Top 5 Funktionen des Bereichs molekulare und zelluläre Funktion sowie physiologische Systementwicklung und Funktion aufgeführt.

ID	Symbol	Entrez Gene Name	Lokalisation	Typ	Funktion*
P04217	A1BG	alpha-1-B glycoprotein	Extrazellulär Raum	andere	11
P08758	ANXA5	annexin A5	Plasma Membran	andere	1, 3, 4
Q05682	CALD1	caldesmon 1	Zytoplasma	andere	1, 2, 9
P12277	CKB	creatine kinase, brain	Zytoplasma	Kinase	11
Q05707	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	Extrazellulär Raum	andere	5, 9
P17661	DES	desmin	Zytoplasma	andere	1, 7, 8
P22626	HNRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	Nucleus	andere	5
P17987	TCP1	t-complex 1	Zytoplasma	andere	11
P09493	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	Zytoplasma	andere	1, 2, 5, 9, 7, 8
P08670	VIM	vimentin	Zytoplasma	andere	1, 2, 5, 9, 7, 10

* **Molekulare und zelluläre Funktion:** 1) zelluläres Assembling und Organisation, 2) Zellmorphologie, 3) Kohlenhydratmetabolismus, 4) *Cellular Compromise*, 5) zelluläre Entwicklung; **Entwicklung und Funktion des physiologischen Systems:** 6) Gewebeentwicklung, 7) Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems, 8) Organmorphologie, 9) Entwicklung und Funktion von Bindegewebe, 10) Tumormorphologie, 11) andere

Im Gegensatz zu den zwischen Prostatakarzinomen und tumor freiem Gewebe deregulierten Proteinen ließen sich zehn der zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine mittels IPA einem Netzwerk zuordnen, welches für Zellmorphologie, zelluläres Assembling und zelluläre Organisation, Funktion und Maintenance verantwortlich ist (Abbildung 4.9 A). Sechs weitere Proteine (CNN1, CTSZ, G6PD, LGALS3, LMNA, TCP1) konnten einem Netzwerk für Zell-Zell Signalling und Interaktion, Wachstum und Proliferation sowie der Entwicklung des hämatologischen Systems zugeordnet werden (Abbildung 4.9).

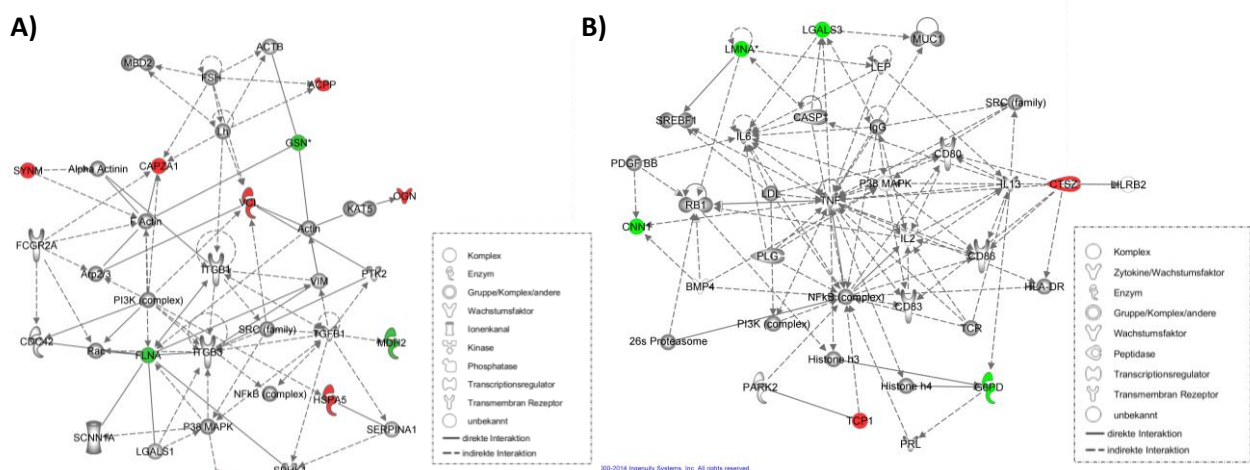


Abbildung 4.9: Einordnung der zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine in IPA Netzwerke, welche für Zellmorphologie, zelluläres *Assembling* und zelluläre Organisation, Funktion und Maintenance (A) bzw. Zell-Zell Signalling und Interaktion, Wachstum und Proliferation sowie der Entwicklung des hämatologischen Systems (B) verantwortlich sind. Zehn von 32 zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteinen konnten Netzwerk A zugeordnet werden (SYNM, CAPZA1, GSN, ACPP, VCL, OGN, FLNA, ANXA5, HSPA5, MDH2). Sechs weitere Proteine (LGALS3, LMNA, CNN, TCP1, G6PD, CTSZ) konnten Netzwerk B zugeordnet werden. Rot dargestellte Proteine sind in Tumoren mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv heraufreguliert. Grün dargestellte Proteine sind herabreguliert. Proteinabkürzungen siehe Tabelle 4.5 und Tabelle 7.21 im Anhang.

Die Gesamtheit der zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine sind am stärksten mit den fünf molekularen/zellulären Funktionen Zellwachstum und Proliferation, zelluläre Entwicklung, Zellmorphologie, Zellbewegung und Kohlenhydratmetabolismus assoziiert. Auf Ebene der physiologischen Entwicklung und Funktion ist die Gesamtheit der identifizierten Proteine am stärksten mit der Organentwicklung, der Entwicklung des hämatopoetischen Systems, der Bindegewebsentwicklung und der Entwicklung des kardiovaskulären Systems assoziiert (siehe Tabelle 4.4 und Abbildung 4.11). Abbildung 4.11 stellt die Top 5 Funktionen (molekular sowie zellulär), Lokalisationen, und Proteintypen der zwischen Prostatakarzinomen und tumorfreien Geweben sowie zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine einander gegenüber.

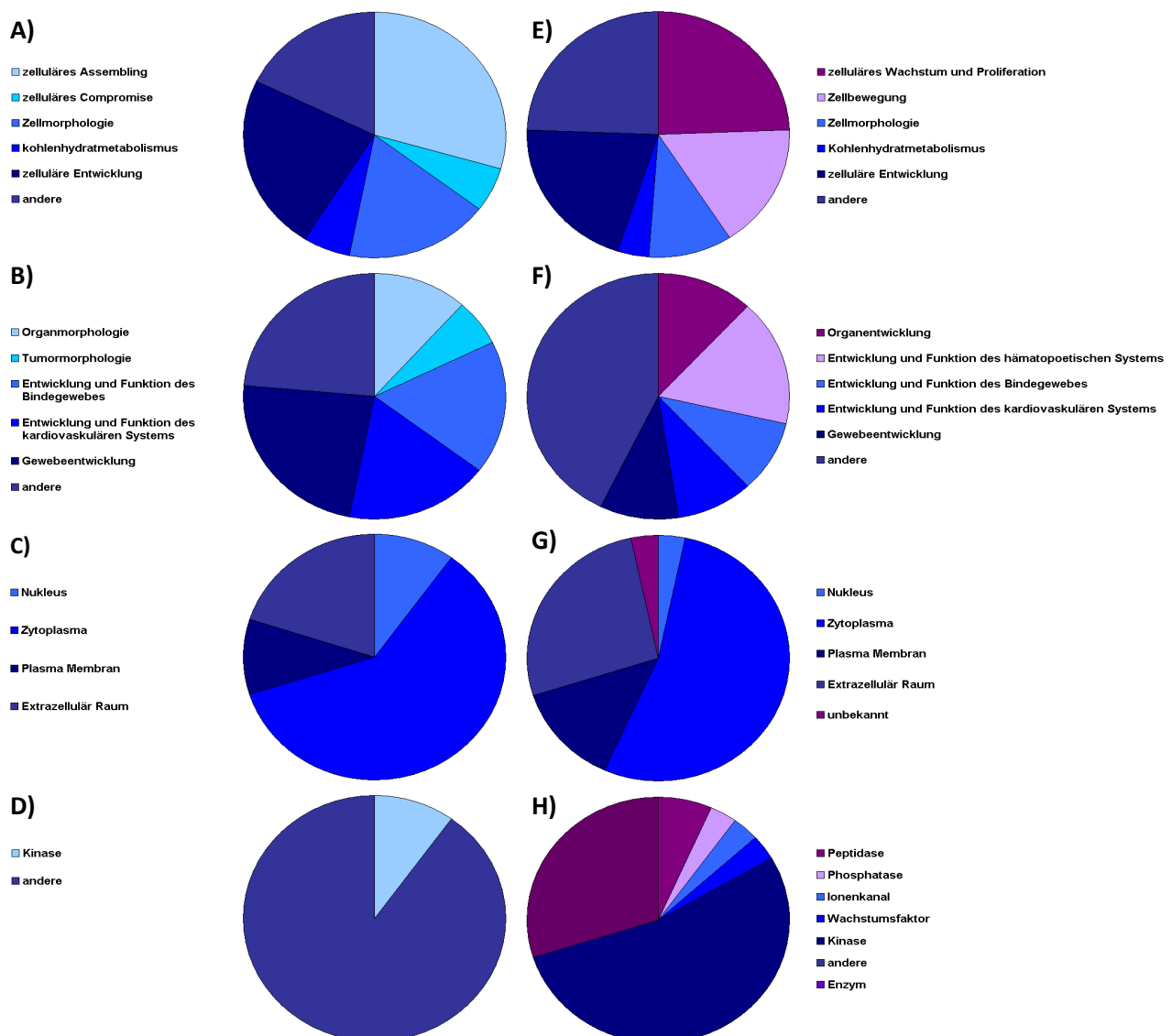


Abbildung 4.10: „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der mittels 2D-DIGE und MS als dereguliert identifizierten Proteine. Dargestellt sind molekulare und zelluläre Funktion (**A, E**), physiologische Systementwicklung und Funktion (**B, F**) Lokalisation (**C, G**) und Art der Proteine (**D, H**) der zwischen tumorfreiem Gewebe und Prostatakarzinomen (**A -D**) bzw. zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv (**E - H**) deregulierten Proteine.

Tabelle 4.5: „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der mittels 2D-DIGE und MS als dereguliert identifizierten Proteine. Dargestellt sind ID, Symbol, Lokalisation, Molekültyp und Funktion der im Prostatakarzinom ohne Rezidiv im Vergleich zu Karzinomen mit Rezidiv deregulierten Proteine. Es sind nur die Top 5 Funktionen des Bereichs molekulare und zelluläre Funktion sowie physiologische Systementwicklung und Funktion aufgeführt.

ID	Symbol	Entrez Gene Name	Lokalisation	Typ	Funktion
P04217	A1BG	alpha-1-B glycoprotein	Extrazellulär Raum	andere	11
P15309	ACPP	acid phosphatase, prostate	Extrazellulär Raum	Phosphatase	1,2, 7
P09525	ANXA4	annexin A4	Plasma Membran	andere	11
P08758	ANXA5	annexin A5	Plasma Membran	andere	5, 6, 7
P52907	CAPZA1	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	Zytoplasma	andere	1
P51911	CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle	Zytoplasma	andere	1, 2
Q05707	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	Extrazellulär Raum	andere	1, 2; 8
P12110	COL6A2	collagen, type VI, alpha 2	Extrazellulär Raum	andere	1
P16870	CPE	carboxypeptidase E	Zytoplasma	Peptidase	11
Q9UBR2	CTS2	cathepsin Z	Zytoplasma	Peptidase	1, 2, 3, 4A, 7
P21333	FLNA	filamin A, alpha	Zytoplasma	andere	3, 4A, 10
P11413	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	Zytoplasma	Enzym	2, 5, 6, 7
P06396	GSN	gelsolin	Extrazellulär Raum	andere	1, 4B, 6, 8,
Q16775	HAGH	hydroxyacylglutathione hydrolase	Zytoplasma	Enzym	6
P11021	HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	Zytoplasma	Enzym	1, 2, 4A, 7, 10
P01857	IGHG1	immunoglobulin heavy constant gamma 1	Extrazellulär Raum	andere	1, 2, 4A, 4B, 7, 10
Q96CX2	KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12	Plasma Membran	Ionenkanal	11
P17931	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	Extrazellulär Raum	andere	1, 2, 3, 4A, 4B, 4C, 6, 7, 8, 10
P02545	LMNA	lamin A/C	Nucleus	andere	3
P40926	MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD	Zytoplasma	Enzym	11
P20774	OGN	osteoglycin	Extrazellulär Raum	Wachstums	11
O95394	PGM3	phosphoglucomutase 3	Zytoplasma	Enzym	11
Q13162	PRDX4	peroxiredoxin 4	Zytoplasma	Enzym	1, 2, 8
Q8N8N7	PTGR2	prostaglandin reductase 2	Zytoplasma	Enzym	11
P11216	PYGB	phosphorylase, glycogen; brain	Zytoplasma	Enzym	11
Q12765	SCRN1	secernin 1	Zytoplasma	andere	11
O15061	SYNM	synemin, intermediate filament protein	Zytoplasma	andere	1, 2, 3, 4A
P17987	TCP1	t-complex 1	Zytoplasma	andere	11
Q5R3I4	TTC38	tetratricopeptide repeat domain 38	unbekannt	andere	11
P18206	VCL	vinculin	Plasma Membran	Enzym	4A, 8

***Molecular and Cellular Functions:** 1) Zellwachstum und Proliferation, 2) Zelluläre Entwicklung, 3) Zellmorphologie, 4) Zellbewegung, 4A) Migration, 4B) Invasion, 4C) Chemotaxis, 5) Kohlenhydratmetabolismus; **Physiological System Development and Function:** 6) Organentwicklung, 7) Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems, 8) Entwicklung und Funktion des Bindegewebes, 9) Gewebeentwicklung, 10) Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems; 11) andere

4.3 Validierung der mittels 2D-DIGE und MS identifizierten potentiellen Biomarker für die Diagnose des Prostatakarzinoms

Nach ausführlicher Literaturrecherche und IPA Analysen der mittels 2D-DIGE und MS als differentiell exprimiert identifizierten Proteine wurden ausgewählte Proteine im Western Blot validiert. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Validierung potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom. Im Folgenden wird allerdings zunächst die Validierung der zwischen tumorfreiem Gewebe und Tumorgewebe deregulierten potentiellen Biomarker dargestellt.

TCP1alpha wurde in den 2D-DIGE Analysen als differentiell reguliertes Protein für das Prostatakarzinom identifiziert. Weiterhin zeigten die 2D-DIGE Analysen, dass TCP1alpha im rezidivierenden Prostatakarzinom heraufreguliert ist im Vergleich zum nicht-rezidivierenden Karzinom. Annexin A5 (ANXA5) zeigte in den 2D-DIGE Vorversuchen ebenfalls eine Heraufregulation in Karzinomen im Vergleich zum tumorfreien Gewebe sowie in Karzinomen mit Rezidiv im Vergleich zu Karzinomen ohne Rezidiv. Diese Deregulation von TCP1alpha und ANXA5 sollte zunächst im Western Blot validiert werden. Hierbei zeigte sich, dass TCP1alpha im Prostatakarzinom im Vergleich zum tumorfreien Gewebe zwar leicht höher exprimiert war, eine signifikante Deregulation konnte im Western Blot aber nicht bestätigt werden ($p=0,237$) (Abbildung 4.12). Allerdings ist TCP1alpha im Tumorgewebe ohne Rezidiv signifikant heraufreguliert im Vergleich zum tumorfreien Gewebe ($p=0,016$). Eine signifikante Deregulation von TCP1alpha zwischen rezidivierendem und nicht-rezidivierendem Karzinom konnte nicht nachgewiesen werden ($p=0,171$).

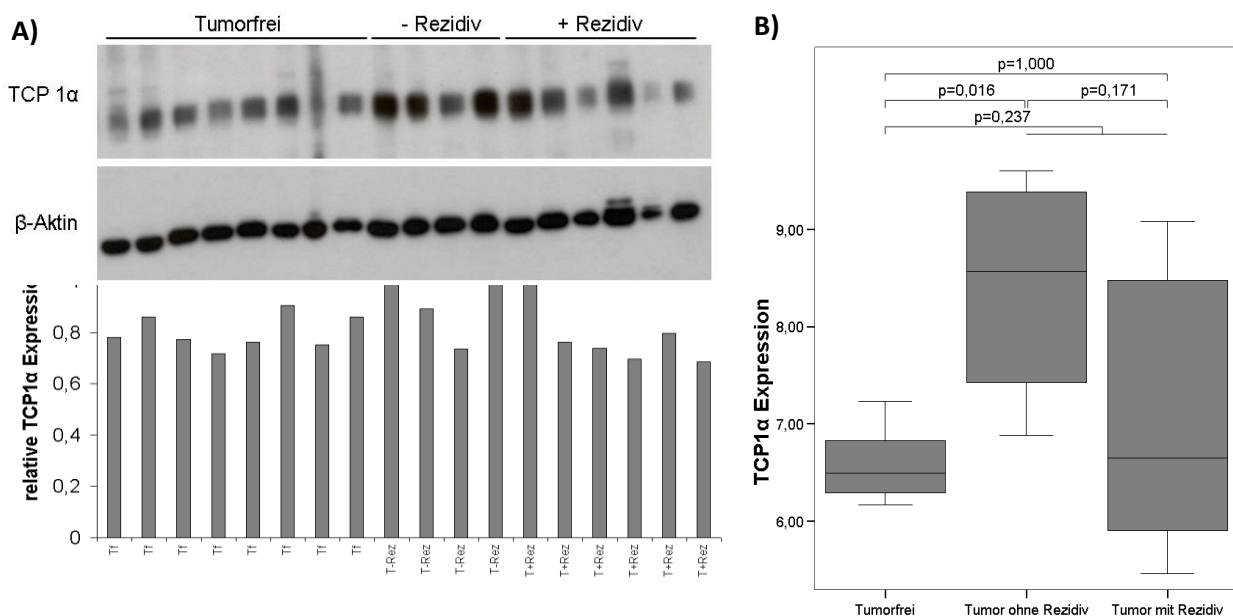


Abbildung 4.12: Validierung der 2D-DIGE Ergebnisse für TCP1alpha mittels Western Blot anhand von acht tumorfreien Geweben, vier Prostatakarzinomen ohne und sechs Prostatakarzinomen mit Rezidiv. **A)** Western Blot Ergebnisse und zugehörige densitometrische Auswertung dieser im Abgleich mit dem Housekeepingprotein β -Aktin. **B)** Boxplot der densitometrischen Auswertung. TCP1alpha ist im Tumorgewebe im Vergleich zum tumorfreien Gewebe nicht signifikant heraufreguliert ($p=0,237$). Auch eine Deregulation von TCP1alpha zwischen Patienten mit Rezidiv innerhalb eines 5-Jahres Follow-up (+Rezidiv) im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv (-Rezidiv) kann nicht bestätigt werden ($p=0,171$). Im Tumor ohne Rezidiv ist TCP1alpha allerdings signifikant heraufreguliert im Vergleich zum tumorfreien Gewebe ($p=0,016$).

Im Gegensatz zu TCP1alpha ließ sich die Deregulation von ANXA5 im Western Blot bestätigen. So ist ANXA5 in Prostatakarzinomen signifikant heraufreguliert im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe ($p=0,041$, Abbildung 4.13). Ein signifikanter Unterschied zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv konnte allerdings nicht nachgewiesen werden ($p=0,831$).

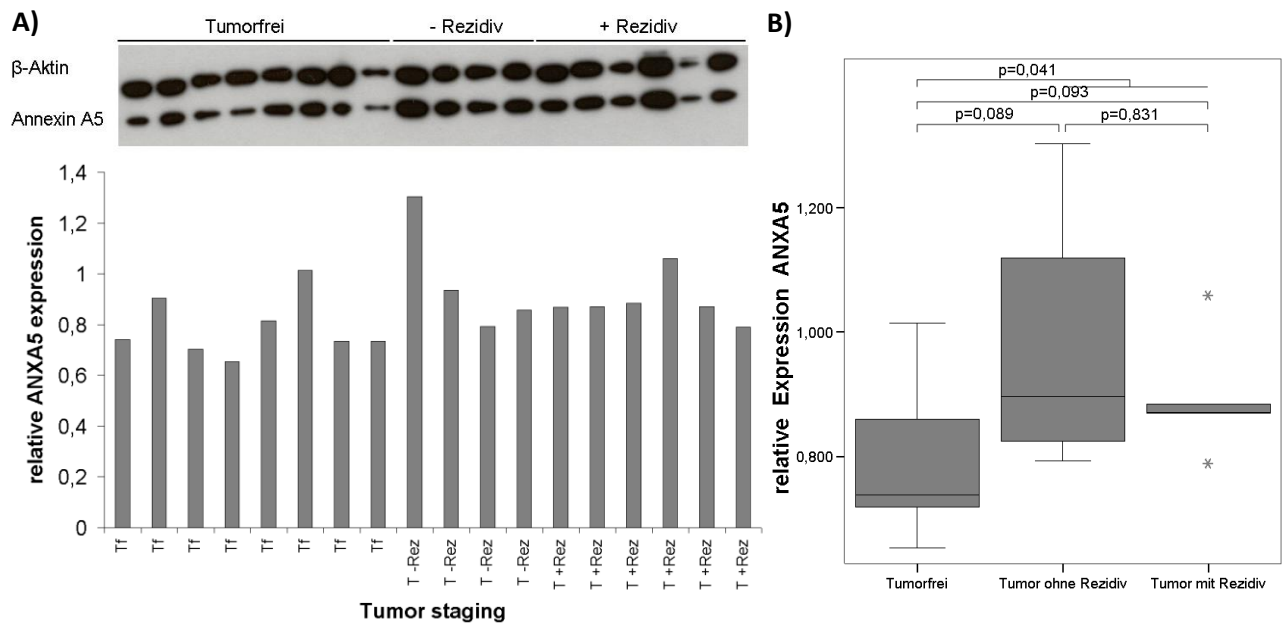


Abbildung 4.13: A) Western Blot und zugehörige densitometrische Auswertung von Annexin A5 (ANXA5) normiert auf β -Aktin in acht tumorfreien Geweben, vier Prostatakarzinomen ohne und sechs Prostatakarzinomen mit Rezidiv. **B)** Boxplot der densitometrischen Auswertung des ANXA5 Western Blots. * stellt Ausreißer da. ANXA ist in Tumoren signifikant heraufreguliert ($p=0,041$). Ein signifikanter Unterschied der ANXA5 Expression zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv besteht aber nicht ($p=0,831$).

4.4 Validierung der mittels 2D-DIGE und MS identifizierten potentiellen Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

Im folgenden Kapitel werden ausgewählte Validierungen der mittels 2D-DIGE und MS als differentiell für das rezidivierende Prostatakarzinom identifizierten Proteine dargestellt. Die zu validierenden Proteine wurden nach ausführlicher Literaturrecherche und IPA Analysen ausgewählt. Die Validierung der Proteine erfolgte zunächst mittels Western Blot an Prostatakarzinomgeweben und tumorfreien Geweben. Ggf. wurden immunhistochemische Analysen angeschlossen.

4.4.1 Western Blot Validierung von Gelsolin und Calponin-1

Die 2D-DIGE Ergebnisse für Calponin-1 und Gelsolin zeigten eine Herabregulation in Tumoren mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv. Die zur Validierung der 2D-DIGE Ergebnisse durchgeführten Western Blots konnten die differentiellen Regulationen nicht bestätigen. Weder für Gelsolin noch für Calponin-1 konnten differentielle Expression zwischen Tumoren mit Rezidiv und Tumoren ohne Rezidiv bzw. zwischen Tumorgewebe und tumorfreiem Gewebe nachgewiesen werden (Abbildung 4.14).

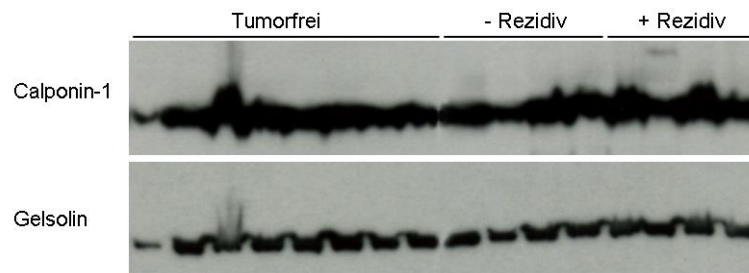


Abbildung 4.14: Validierung der 2D-DIGE Ergebnisse für Gelsolin und Calponin-1 mittels Western Blot. Eine differenzielle Expression von Gelsolin und Calponin-1 in den analysierten Gewebegruppen (Tumore mit Rezidiv, Tumore ohne Rezidiv und tumorfreies Gewebe) ist nicht gegeben.

4.4.2 Immunhistochemische Validierung von KCTD12

Für KCTD12 hat eine Validierung der differentiellen Expression im Western Blot an Tumorgewebe und tumorfreien Geweben nicht funktioniert (Daten nicht gezeigt). Daher wurden für KCTD12 immunhistochemische Färbungen zur Validierung der differentiellen Expression zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv durchgeführt. Hierbei zeigte KCTD12 keine differentielle Expression zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv (Daten nicht gezeigt). Allerdings zeigt KCTD12 eine auffallend ähnliche Expression in Prostatakarzinomen wie Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR) (Abbildung 4.15).

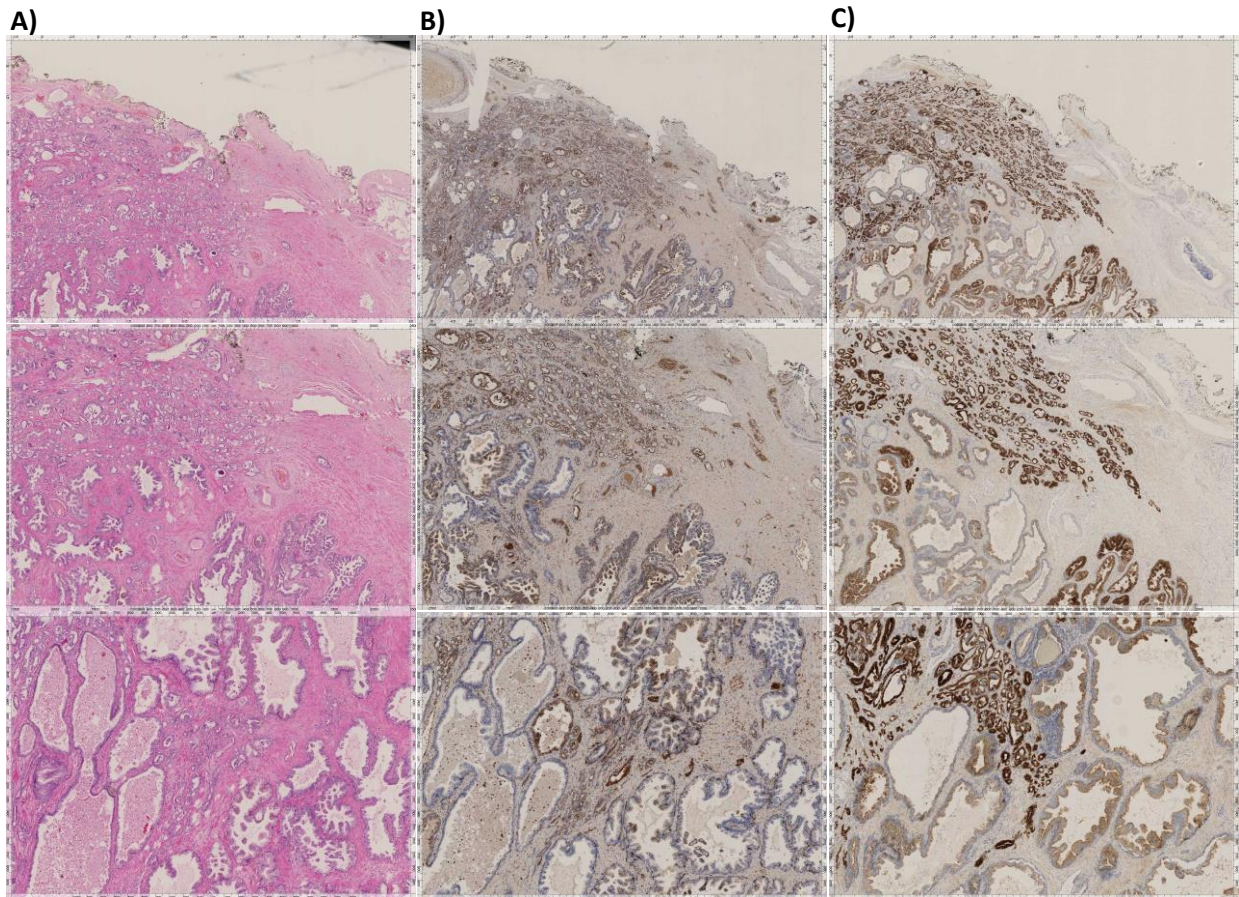


Abbildung 4.15: Immunhistochemische Analysen von KCTD12 und Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR). **A)** Dargestellt sind Hämalaun-Eosin (HE) Färbungen von drei Prostatakarzinomgeweben. Folgeschnitte dieser Gewebe wurden einmal mit KCTD12 immunhistochemisch gefärbt (**B**) und einmal mit AMACR immunhistochemisch angefärbt (**C**). KCTD12 und AMACR färbten Tumore, aber keine tumorfreien Drüsen. Beide Proteine zeigten in der Immunhistochemie ein ähnliches Verteilungsmuster im Gewebe.

4.4.3 Validierung von Secernin-1 als potentieller Biomarker für das (rezidivierende) Prostatakarzinom

4.4.3.1 Western Blot Validierung von Secernin-1 an Tumorgewebe von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv

Auch Secernin-1 (SCRN-1) gehörte zu den ausgewählten Proteinen, deren Deregulation mittels Western Blot Analysen bestätigt werden sollte. Secernin-1 war in den 2D-DIGE Analysen in Tumoren mit Rezidiv signifikant herunterreguliert im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv. Validierungen mittels Western Blot zeigten, dass Secernin-1 im Tumorgewebe im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe signifikant herunterreguliert ist ($p=0,001$; Abbildung 4.16). Eine Herabregulation von Secernin-1 in Tumoren von Patienten mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren von Patienten, die später kein Rezidiv entwickelt haben, ließ sich mit den Western Blot Analysen allerdings nicht bestätigen ($p=0,762$).

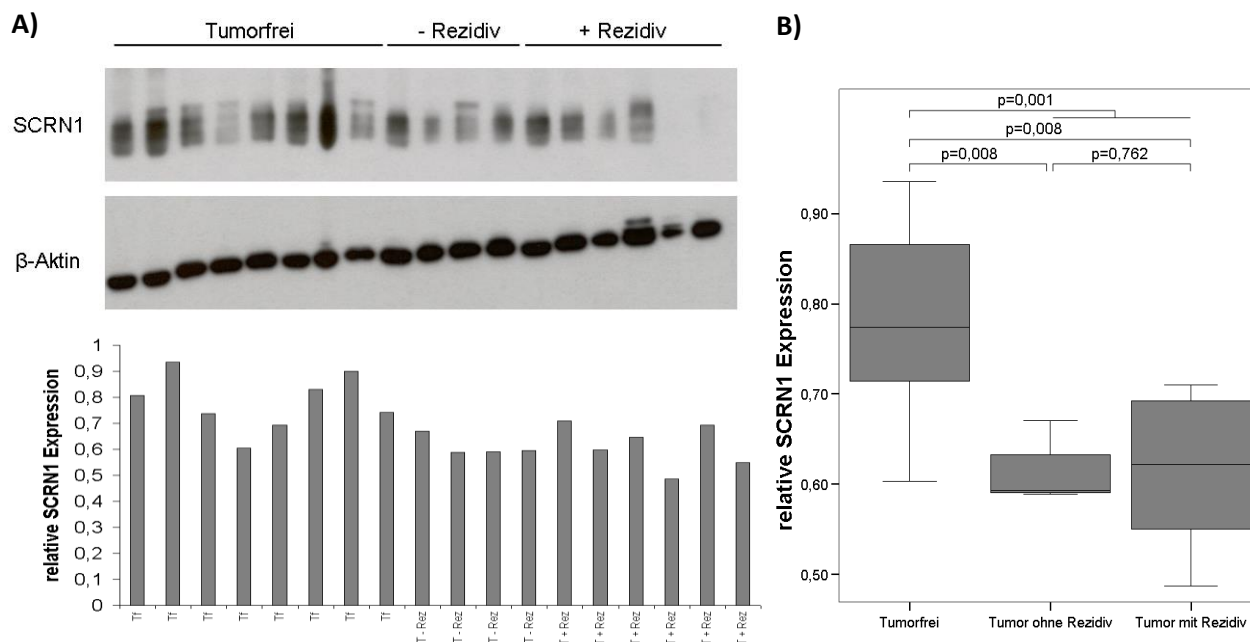


Abbildung 4.16: Validerung der 2D-DIGE Ergebnisse für Secernin-1 mittels Western Blot. **A)** Western Blot Ergebnisse und zugehörige densitometrische Auswertung dieser. Dargestellt ist die relative Secernin-1 Expression normiert auf die β -Aktin Expression. **B)** Boxplot der relativen Secernin-1 Expression. Secernin-1 ist im Tumorgewebe im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe herunterreguliert. Eine Deregulation von Secernin-1 zwischen Patienten mit Rezidiv (+Rezidiv) und Patienten ohne Rezidiv (-Rezidiv) kann nicht bestätigt werden ($p=0,762$). Secernin-1 ist aber im Tumorgewebe signifikant herunterreguliert im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe ($p=0,001$).

4.4.3.2 Immunhistochemische Validierung der Secernin-1 Expression in Prostatakarzinomgewebe

Eine differentielle Secernin-1 Expression zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv konnte im Western Blot nicht bestätigt werden. Allerdings zeigte sich eine differentielle Regulation von Secernin-1 zwischen Prostatakarzinomgewebe und tumorfreien Prostatageweben (siehe Kapitel 4.4.3.1 Western Blot Validierung von Secernin-1 an Tumorgewebe von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv auf Seite. 105). Da nicht nur dringend neue Marker für das rezidivierende Prostatakarzinom, sondern auch Marker für die Diagnose des Prostatakarzinoms benötigt werden (siehe Einleitung Kapitel 1.4 Potentielle Biomarker für das humane Prostatakarzinom und Kapitel 1.3.4 Diagnose des humanen Prostatakarzinoms), sollte die Fähigkeit von Secernin-1 als ein solcher diagnostischer Marker für das Prostatakarzinom zu fungieren, analysiert werden. Hierzu wurde die Secernin-1 Expression am Dresdener Patientenkollektiv immunhistochemisch analysiert. Die Immunhistochemie bietet dabei gegenüber dem Western Blot den Vorteil, dass hierbei auch eine Lokalisation der Proteinexpression möglich ist. Weiterhin gehört die Immunhistochemie zu den routinediagnostischen Standardmethoden der Pathologie, womit die Biomarkervalidierung mit einer Methode erfolgen kann, die routinediagnostisch später auch eingesetzt werden kann. Außerdem kann die Immunhistochemie zur Färbung und Expressionsanalyse von sogenannten „Tissue Micro Arrays“ (TMAs) eingesetzt werden, mit denen eine Hochdurchsatzmethode zur Biomarkervalidierung zur Verfügung steht. Für die Färbung des

Zielproteins wird dabei in jeder Probe ein sog. *Score* ermittelt, der die Expression widerspiegelt. Dieser Score kann zwischen „0“ (keine Expression) und „3“ (hohe Expression) liegen. Gleichzeitig kann bei Bedarf der Prozentsatz der Zellen ermittelt werden, die diesen immunhistochemischen Score zeigen. Aus dem Score und dem Prozentsatz der entsprechend gefärbten Zellen kann dann der Remmele Score bestimmt werden.

Repräsentative Färbungen der Secernin-1 Immunhistochemie an 13 Prostatektomieproben von Prostatakarzinomen ohne Rezidiv, 14 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und 43 tumorfreien Prostatektomieproben sind in Abbildung 4.17 dargestellt während Abbildung 4.18 die Ergebnisse aller analysierten Proben zusammenfasst. Secernin-1 wird im Normalgewebe in den Basalzellen, nicht aber in den Luminalzellen exprimiert und ist folglich in Tumoren nicht mehr vorhanden. 14,3 % der Tumore mit und 21,4 % der Tumore ohne Rezidiv wiesen allerdings eine schwache Secernin-1 Expression in den Drüsen auf. 28,6% der Tumore mit bzw. 21,4 % der Tumore ohne Rezidiv wiesen eine mittelstarke Secernin-1 Expression in den Drüsen auf. Eine starke Secernin-1 Expression in den Drüsen wiesen immerhin 21,4 % der Tumore mit Rezidiv, aber kein Tumor ohne Rezidiv auf.

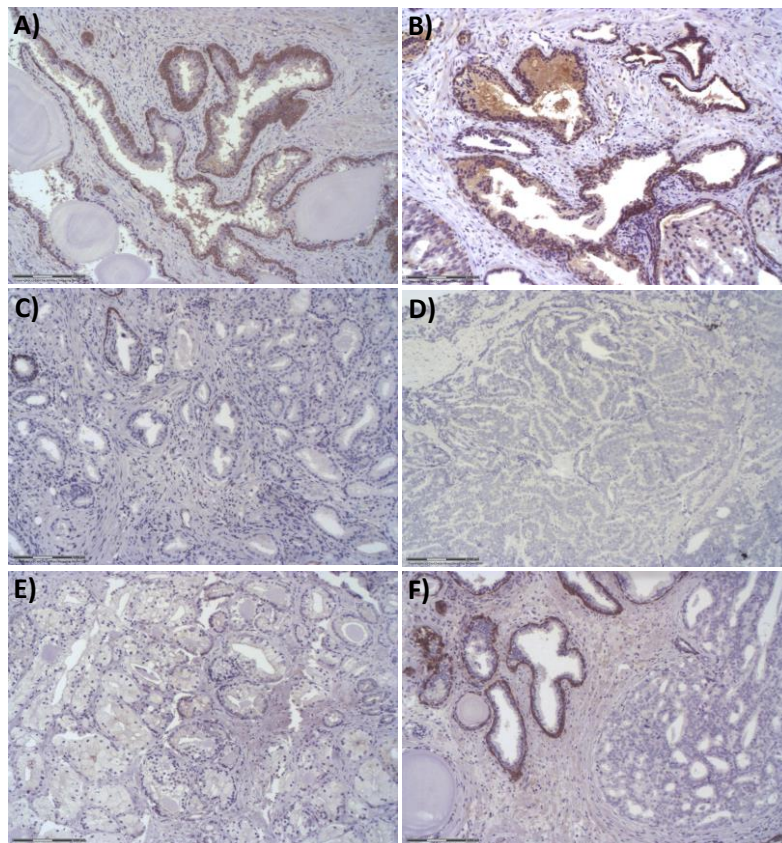


Abbildung 4.17: Repräsentative immunhistochemische Secernin-1 Färbungen. Dargestellt sind in **A)** und **B)** tumorfreie Gewebe, in **C)** und **D)** Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv und in **E)** und **F)** Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv im weiteren Verlauf der Erkrankung. **F)** zeigt zusätzlich tumorfreie Gewebeareale (oben links), welche Secernin-1 exprimieren. Secernin-1 wird im Prostatanormalgewebe in den Basalzellen, nicht aber in den Luminalzellen exprimiert und ist folglich in Tumoren nicht mehr vorhanden.

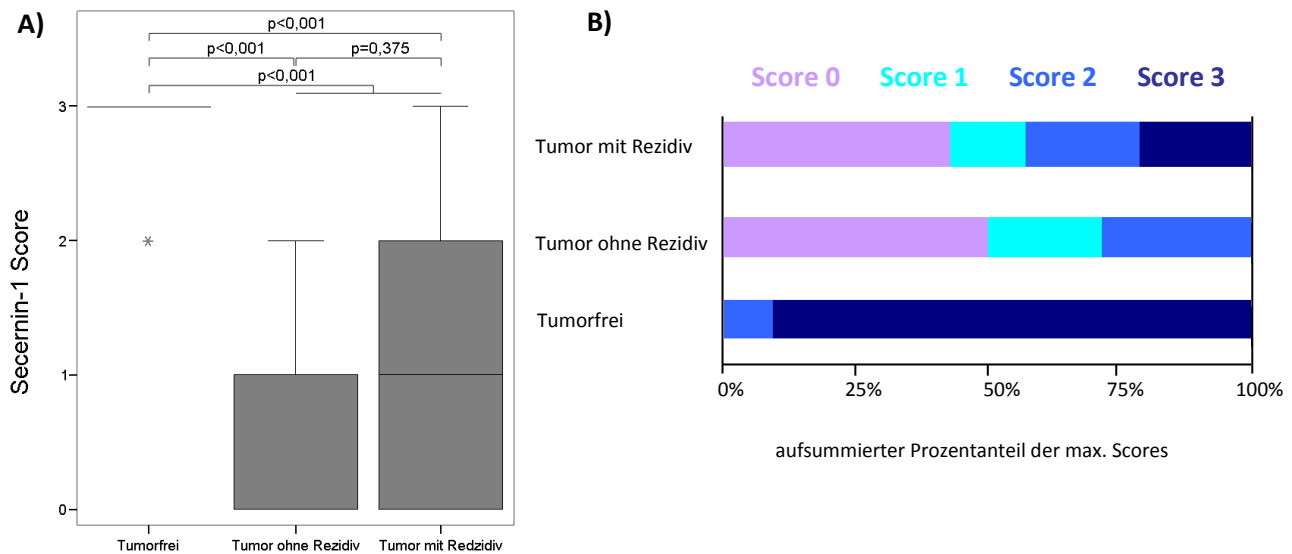


Abbildung 4.18: Zusammenfassung der Immunhistochemie von Secernin-1 an 13 Prostatektomieproben von Prostatakarzinomen ohne Rezidiv, 14 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und 43 tumorfreien Prostatektomieproben. **A)** Secernin-1 Expression in den einzelnen Gewebegruppen. Der Mittelwert der Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiventwicklung im weiteren Verlauf ihrer Erkrankung liegt bei 1,2. Der Mittelwert der Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv liegt bei 0,7. Tumorfreie Prostatektomieproben weisen einen mittleren Secernin-1 Expressionsscore von 2,93 auf. **B)** Prozentualer Anteil der Scores der Secernin-1 Expression in den einzelnen Gruppen. 90,5% der tumorfreien Gewebe weisen einen Secernin-1 Expressionsscore von 3 (starke Secernin-1 Expression auf). Diese starke Secernin-1 Expression ist aber nur in 21% der Tumore mit Rezidiv und in keinem Tumor ohne Rezidiv nachweisbar. Hingegen ist die Secernin-1 Expression in 42% der Tumore mit Rezidiv und 50% der Tumore ohne Rezidiv nicht mehr nachweisbar (Score 0).

4.4.3.3 Analyse der Secernin-1 Expression im Entzündungsgeschehen

Grundvoraussetzung für einen guten Biomarker zur Detektion des Prostatakarzinoms ist, dass mit diesem Biomarker nicht nur zwischen tumorfreiem Gewebe und einem Karzinom, sondern auch zwischen einer Entzündung und einem Karzinom unterschieden werden kann. Um weiter zu eruieren, ob Secernin-1 möglicherweise als potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom in Frage kommt, wurden im Folgenden fünf Prostataprobe mit einem Entzündungsherd auf ihre Secernin-1 Expression hin untersucht. Repräsentative Ausschnitte der durchgeführten Immunhistochemie sind in Abbildung 4.19 dargestellt. Alle fünf analysierten Prostatitisfälle wiesen eine Secernin-1 Expression in den Basalzellen, nicht aber in den Luminalzellen auf. Damit war kein Unterschied in der Secernin-1 Expression zwischen entzündetem Prostatagewebe und tumorfreiem Gewebe sowie entzündetem und entzündungsfreiem Prostatagewebe detektierbar. Secernin-1 könnte folglich einen Biomarker für das Prostatakarzinom darstellen. Um diese Möglichkeit weiter zu analysieren, wurde im Folgenden ein TMA für Secernin-1 gefärbt.

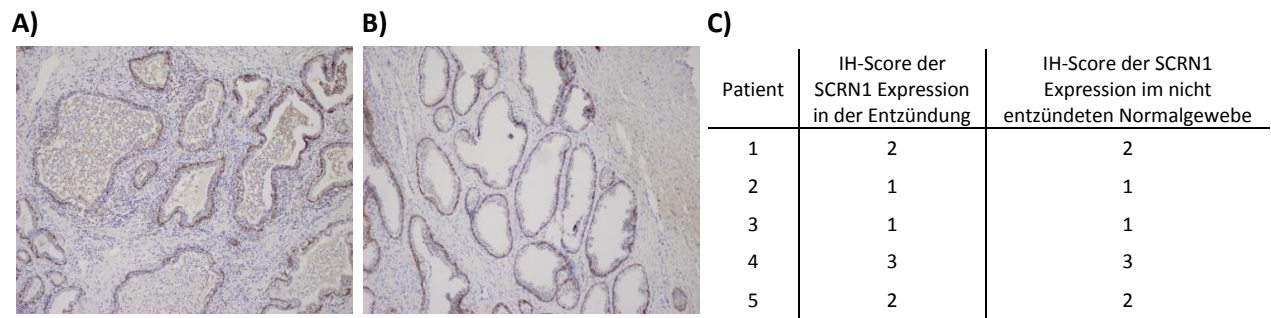


Abbildung 4.19: Secernin-1 Expression in entzündeter Prostata unterscheidet sich nicht von der Secernin-1 Expression in normalem Prostatagewebe. **A)** Repräsentative Immunhistochemie von Secernin-1 an einer Prostatitis und korrespondierendem Normalgewebe **(B).** **C)** Zusammenfassung der Immunhistochemie Scores (IH-Score) der Secernin-1 Expression in entzündetem und nicht entzündetem Prostatagewebe.

4.4.3.4 Validierung der differentiellen Secernin-1 Expression zwischen Tumoren und tumorfreiem Gewebe an einem unabhängigen Patientenkollektiv mittels TMA

Der Expressionsverlust von Secernin-1 in tumorhaltigem Gewebe sollte im Folgenden an einem unabhängigen Patientenkollektiv validiert werden. Hierzu wurde ein TMA von Prof. Dr. med. Glen Kristiansen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Es wurden 52 Patientenproben von Patienten ohne Rezidiv, 16 Patientenproben von Patienten mit Rezidiv und 124 korrespondierende tumorfreie Patientenproben immunhistochemisch auf ihre Secernin-1 Expression hin analysiert. Weiterhin waren von 49 Patienten Proben einer prostataspezifischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) vorhanden, die ebenfalls auf ihre Secernin-1 Expression hin untersucht wurden. Wie schon in den vorherigen immunhistochemischen Analysen am Dresdener Patientenkollektiv gezeigt wurde, bestätigte sich auch am Bonner TMA die Expression von Secernin-1 in den Basalzellen. Zwecks genauerer Secernin-1 Expressionanalyse wurde bei den folgenden Analysen der Remmele Score ermittelt. Dieser lag für Secernin-1 im tumorfreiem Gewebe im Mittel bei 3,69 (Tabelle 4.6). Die tumorfreien Luminalzellen wiesen keine Secernin-1 Expression auf. Auch die PIN Läsionen wiesen Secernin-1 Expression auf. Diese lag aber im Mittel nur noch bei einem Secernin-1 Expressionsscore von 2,24 (Remmele Score 2,71) und damit signifikant unter dem Score der tumorfreien Gewebe ($p < 0,001$). Die Prostatakarzinome mit Rezidiv wiesen im Mittel einen Secernin-1 Expressionsscore von 0,00 (Remmele Score 0,00) auf. Die Karzinomproben ohne Rezidiv wiesen einen mittleren Secernin-1 Expressionsscore von 0,04 (Remmele Score 0,15) auf ($p < 0,001$). Auffallend war, dass Secernin-1 nicht, wie in den Vorversuchen am Dresdener Patientenkollektiv, in einigen Drüsen der Tumore heraufreguliert war. In diesem Patientenkollektiv ging Secernin-1 im Tumor nahezu vollständig verloren. Die teilweise Heraufregulation von Secernin-1 in Tumordrüsen wie sie in den Vorversuchen zu beobachten war, war in diesem Patientenkollektiv nicht vorhanden.

Tabelle 4.6: Secernin-1 Expression im Gewebe von 52 Patienten ohne Rezidiv, 16 Patienten mit Rezidiv, 49 PIN Läsionen und 124 korrespondierenden tumorfreie Gewebe.

Gewebe	MW SCR1 Score	SA SCR1 Score	MW SCR1 [%] gefärbter Zellen	SA SCR1 [%] gefärbter Zellen	MW SCR1 Remmele Score*	SA SCR1 Remmele Score*
Tumorfrei	2,60	0,64	12,87	10,36	3,69	1,68
PIN	2,24	0,80	9,98	14,05	2,71	1,57
Tumor ohne Rezidiv	0,04	0,19	100,00	0,00	0,15	0,78
Tumor mit Rezidiv	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00

MW= Mittelwert, SA=Standardabweichung, Score = immunhistochemischer Score;

*Adaptierter Remmele Score (übertragen von der Kernfärbung auf die zytoplasmatische Färbung)

Die Secernin-1 Expression ist somit im Tumor deutlich herunterreguliert im Vergleich zum Normalgewebe. Diese Herabregulation der Secernin-1 Expression beginnt schon in der prä-malignen Vorstufe des PIN (Abbildung 4.20).

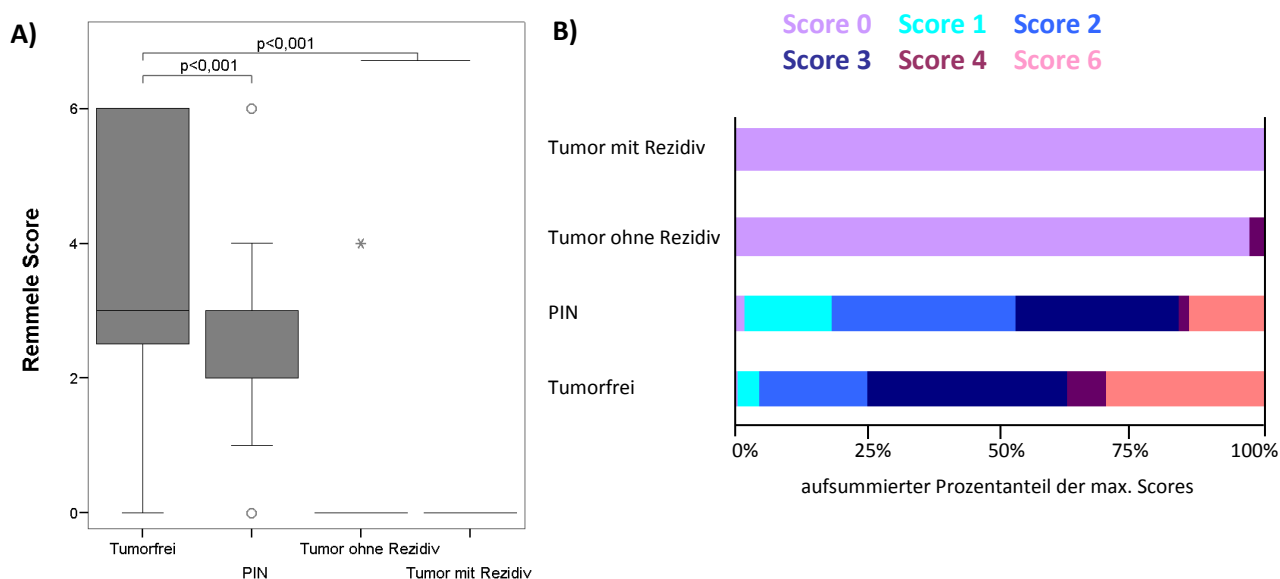


Abbildung 4.20: Immunhistochemische Analysen der Secernin-1 Expression in einem unabhängigen Patientenkollektiv. Mittels TMA wurden 52 Patientenproben von Patienten ohne Rezidiv, 16 Patientenproben von Patienten mit Rezidiv, 49 PIN Läsionen und 124 korrespondierende tumorfreie Patientenproben analysiert. Secernin-1 zeigte eine starke Herabregulation im Prostatakarzinom. **A)** Secernin-1 Expression in den einzelnen Gewebegruppen. Die mittlere Remmele Scores betragen im tumorfreien Gewebe (Normalgewebe) 3,69, in PIN Läsionen 2,71, in Prostatakarzinomen ohne Rezidiv 1,50 und in Prostatakarzinomen mit Rezidiv 0,00. Diese Expressionsunterschiede zwischen tumorfreiem Gewebe und PIN, Prostatakarzinomen mit Rezidiv und Prostatakarzinomen ohne Rezidiv sind jeweils signifikant ($p < 0,001$). **B)** Prozentualer Anteil der Scores der Secernin-1 Expression in den einzelnen Gruppen. 75,0% der tumorfreien Gewebe weisen eine mittlere bis starke Secernin-1 Expression auf (Remmele Score 3-6). Diese mittlere bis starke Secernin-1 Expression ist aber nur in 51,9% der PIN-Läsionen und sogar nur in 3,8% aller Tumore nachweisbar.

4.4.3.5 Der Einfluss der SCRN1-Expression im Prostatakarzinomgewebe auf das Überleben von Prostatakarzinompatienten

Da zu dem untersuchten TMA vollständige Follow-up Daten der Patienten zur Verfügung standen, war eine Kaplan-Meyer Überlebensanalyse zum Einfluss der Secernin-1 Expression auf das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinompatienten möglich. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Prostatakarzinompatienten, die eine leichte Secernin-1 Expression aufwiesen, kein PSA-Rezidiv innerhalb der Follow-up Zeit erlitten (Abbildung 4.21). Ein signifikanter Unterschied im rezidivfreien Überleben von Patienten mit Secernin-1 exprimierenden Tumoren bzw. mit Secernin-1 negativen Tumoren war aber nicht vorhanden ($p=0,451$).

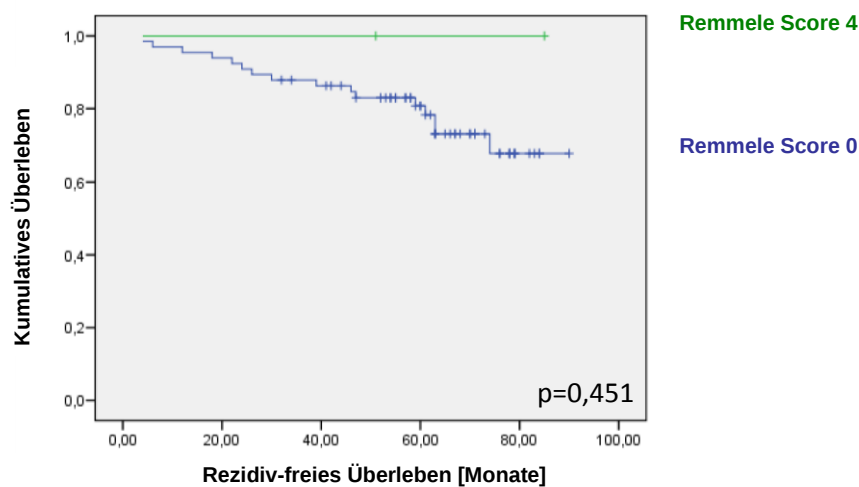


Abbildung 4.21: Kaplan-Meyer Überlebensanalysen des immunhistochemisch für Secernin-1 gefärbten TMAs zum Einfluss der Secernin-1 Expression auf das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinompatienten. Patienten, die im Tumor eine Secernin-1 Expression aufwiesen, überlebten bis zum Ende des Follow-up rezidivfrei. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit schwacher Secernin-1 Expression und den Patienten, die keine Secernin-1 Expression mehr aufweisen, ist aber nicht vorhanden ($p=0,451$)

4.4.3.6 Der Nachweis von Secernin-1 im Serum von Prostatakarzinompatienten

Biomarker zum Nachweis eines Prostatakarzinoms, die im Blut oder Urin nachweisbar sind, haben den Vorteil, dass eine günstige und nicht invasive Diagnostik möglich ist. Um zu analysieren, ob Secernin-1 im Serum oder Urin von Prostatakarzinompatienten nachweisbar ist, wurden in einem nächsten Schritt zehn Seren und Urinproben von Prostatakarzinompatienten mittels Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten vier Seren bzw. Urine von tumorfreien Patienten. Eine Analyse der Secernin-1 Expression im Urin war mittels Western Blot nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Im Serum von Kontrollpatienten ließ sich Secernin-1 nachweisen (Abbildung 4.22). Allerdings war Secernin-1 auch im Serum von Prostatakarzinompatienten nachweisbar. Follow-up Daten bzgl. der Rezidiventwicklung der Patienten standen bei diesem Kollektiv leider nicht zur Verfügung.

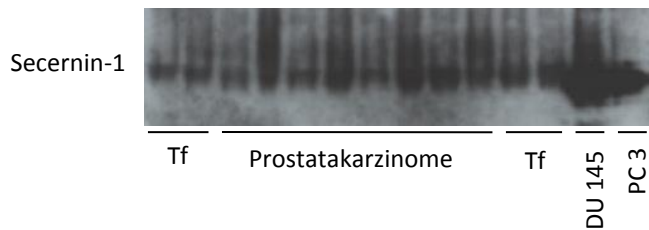


Abbildung 4.22: Secernin-1 Nachweis im Serum von Prostatakarzinomen mittels Western Blot. Als Kontrollen dienten Seren von vier tumorfreien Patienten und die Prostatakarzinomzelllinien PC3 und Du145. Secernin-1 ist im Serum der Patienten nachweisbar, ein Unterschied zwischen tumorfreien Patienten und Prostatakarzinompatienten ist nicht vorhanden. Informationen über das Follow-up der Patienten und eine mögliche Rezidiventwicklung standen bei diesem Kollektiv leider nicht zur Verfügung.

4.4.4 Validierung von Vinculin als potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

4.4.4.1 Immunhistochemische Validierung der differentiellen Vinculinexpression in rezidivierenden und nicht-rezidivierenden Prostatakarzinomen

Als weiteres Protein zur Validierung als potentieller Tumormarker für das rezidivierende Prostatakarzinom wurde Vinculin ausgewählt. Vorangegangene 2D-DIGE Analysen zeigten, dass Vinculin in Tumoren mit Rezidiv heraufreguliert ist im Vergleich zu Prostatakarzinomen ohne Rezidiv. Im Folgenden sollte die in der 2D-DIGE detektierte differentielle Vinculinexpression zunächst mittels Western Blot Analysen von Gewebe bestätigt werden. Da diese Western Blot Analysen allerdings nicht möglich waren (Daten nicht gezeigt), wurde auf die Immunhistochemie zur Validierung der 2D-DIGE Ergebnisse zurückgegriffen. Hier konnte unmittelbar die Färbung des TMAs von Prof. Dr. med. Glen Kristiansen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt werden. Nach der Färbung konnten 116 tumorfreie Gewebe, 54 PIN-Läsionen, 55 Prostatakarzinome ohne Rezidiv und 16 Prostatakarzinome mit Rezidiv analysiert werden. Hierbei zeigte Vinculin keine bis schwache Expression in den Drüsen von Prostanormalgewebe (Mittelwert des Remmele Scores 2,95). Im Drüsengewebe von Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv sowie in PIN-Läsionen war Vinculin heraufreguliert. Repräsentative Färbungen sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Die Mittelwerte der Remmele Scores aller analysierten Proben sind in Tabelle 4.7 aufgeführt. Abbildung 4.24 stellt die Vinculinexpression im Boxplot sowie die Verteilung der einzelnen Scores in den verschiedenen Gewebetypen dar. 43,1% der tumorfreien Gewebe wiesen eine schwache (Remmele Score ≤ 2) und nur 2,7% eine starke Vinculinexpression (Remmele Score ≥ 8) auf. Im Gegensatz dazu betrug der Anteil der schwachen Vinculinexpression in den PIN-Läsionen 13,0%, den Prostatakarzinomen ohne Rezidiv 21,9% und den Prostatakarzinomen mit Rezidiv 18,8%. Dafür lag der Anteil der starken Vinculinexpression in den PIN-Läsionen bzw. Prostatakarzinome ohne und mit Rezidiv bei 20,4%, 20,0% bzw. 18,0%. Die Expressionsunterschiede zwischen dem tumorfreien Gewebe und den PIN-Läsionen, sowie dem tumorfreien Gewebe und den Prostatakarzinomen ohne bzw. mit Rezidiv waren signifikant ($p < 0,001$ für tumorfreies Gewebe vs. PIN-Läsion sowie tumorfreies Gewebe vs. Tumore ohne Rezidiv; $p = 0,013$ für

tumorfreie Gewebe vs. Tumore mit Rezidiv). Ein signifikanter Unterschied zwischen Karzinomen mit und ohne Rezidiv war nicht detektierbar.

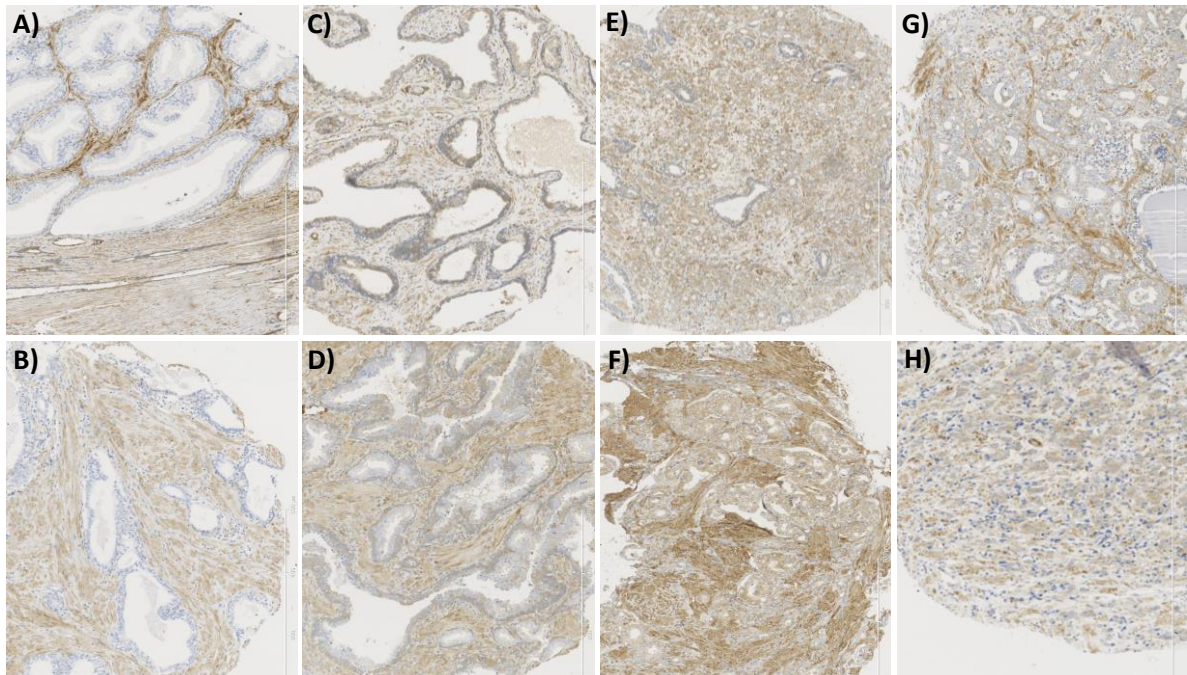


Abbildung 4.23: Repräsentative immunhistochemische Färbungen der Vinculinexpression im Gewebe von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv im Vergleich zu tumorfreien Geweben. Dargestellt sind in **A)** und **B)** tumorfrei Prostatektomieproben, in **C)** und **D)** PIN Läsionen, in **E)** und **F)** Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv sowie in **G)** und **H)** Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv. Vinculin ist in PIN Läsionen und Prostatakarzinomen heraufreguliert im Vergleich zu den tumorfreien Gewebeproben.

Tabelle 4.7: Vinculinexpression in 116 tumorfreien Geweben, 54 PIN-Läsionen, 55 Prostatakarzinomen ohne Rezidiv und 16 Prostatakarzinomen mit Rezidiv.

Gewebe	MW Vinculin Score	SA Vinculin Score	MW Vinculin [%] gefärbter Zellen	SA Vinculin [%] gefärbter Zellen	MW Vinculin Remmele score*	SA Vinculin Remmele score*
tumorfrei	1,47	0,94	50,10	39,40	2,95	2,08
PIN	1,39	0,74	86,24	22,97	4,76	2,56
Tumor ohne Rezidiv	1,22	0,76	84,98	23,44	4,16	2,56
Tumor mit Rezidiv	1,44	0,81	74,88	35,42	4,31	2,47

MW= Mittelwert, SA=Standardabweichung, Score = immunhistochemischer Score;

*Adaptierter Remmele Score (übertragen von der Kernfärbung auf die zytoplasmatische Färbung)

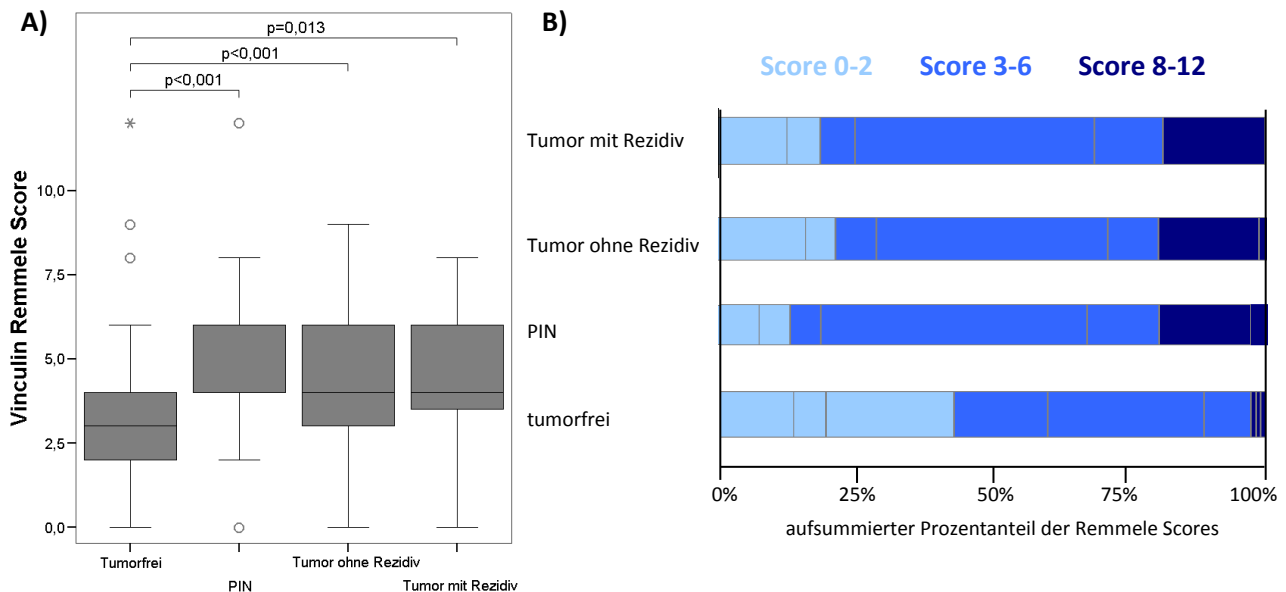


Abbildung 4.24: Validierung von Vinculin als potentieller Tumormarker für das humane Prostatakarzinom. Dargestellt sind die Ergebnisse eines immunhistochemisch gefärbten TMAs **A)** Die Vinculinexpression ist im tumorfreien Gewebe („Normalgewebe“) niedriger als in der PIN-Läsionen und den Tumoren. Die Expressionsunterschiede zwischen dem tumorfreien Gewebe und den PIN-Läsionen sowie dem tumorfreien Gewebe und den Prostatakarzinomen sind signifikant. Ein signifikanter Unterschied zwischen Karzinomen mit und ohne Rezidiv ist nicht detektierbar. **B)** Prozentualer Anteil der Remmele Scores der Vinculinexpression in den einzelnen Gruppen. 43,1% der tumorfreien Gewebe weisen eine schwache und nur 2,7% eine starke Vinculinexpression auf. Im Gegensatz dazu beträgt der Anteil der schwachen Vinculinexpression in den PIN-Läsionen 13,0%, den Prostatakarzinomen ohne Rezidiv 21,9% und den Prostatakarzinomen mit Rezidiv 18,8%. Dafür liegt der Anteil der starken Vinculinexpression in den PIN-Läsionen bzw. Prostatakarzinomen ohne und mit Rezidiv bei 20,4%, 20,0% bzw. 18,0%.

In einer Kaplan-Meyer Überlebensanalyse zeigten Prostatakarzinompatienten mit mittlerer und starker Vinculinexpression (Remmele Score 3-12) keinen signifikanten Unterschied im Überleben im Vergleich zu Prostatakarzinompatienten mit einer schwachen Vinculinexpression (Remmele Score 0-2) (Abbildung 4.25).

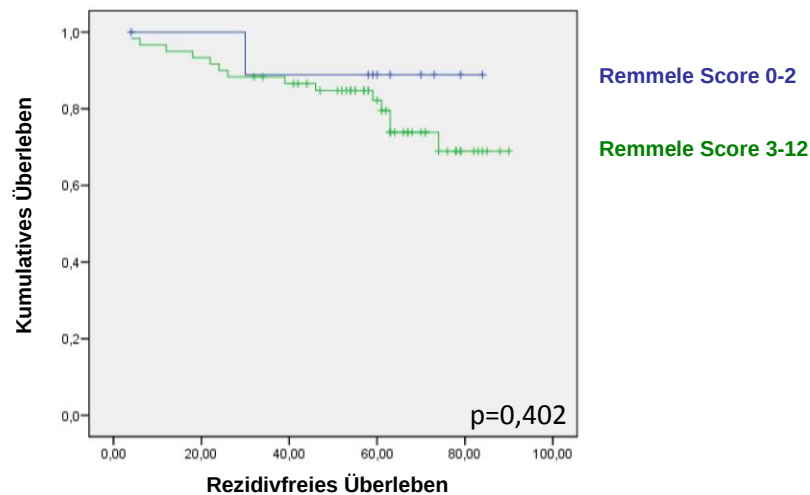


Abbildung 4.25: Kaplan-Meier Kurven zum Einfluss der Vinculinexpression auf das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinompatienten. Patienten mit einer starken Vinculinexpression zeigen ein nicht-signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben als Patienten mit einer schwachen Vinculinexpression ($p=0,402$).

4.4.4.2 Analyse der Vinculinexpression im Urin von Prostatakarzinompatienten

Die Vinculinexpression zeigte sich bisher im Prostatakarzinom heraufreguliert im Vergleich zum tumorfreien Gewebe. Um auch die Eignung von Vinculin als potentiellen nicht-invasiven Tumormarker zu analysieren, wurde die Expression von Vinculin im Urin analysiert. Hierzu wurde ein in der Arbeitsgruppe „Proteomics“ am Institut für Pathologie bereits vorliegenden Western Blots, die die Vinculin Expression im Urin darstellten, neu ausgewertet. Die Western Blots enthielten Proben von 14 Kontrollpatienten ohne Prostatakarzinom, 33 Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv und 15 Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv. Abbildung 4.26 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt des Western Blots zur Analyse der Vinculin Expression. Vinculin war im Urin von Prostatakarzinompatienten signifikant heraufreguliert im Vergleich zum Kontrollurin ($p=0,006$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Urinen von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv bestand nicht ($p=0,229$). Allerdings wiesen in der Gruppe der Patienten ohne Rezidiv 62,5% der Patienten niedrige Vinculinwerte (WB 0-1) und nur 37,5% der Patienten hohe Vinculinwerte >1 auf. In der Gruppe der Patienten mit Rezidiv wiesen hingegen nur 40% der Patienten niedrige Vinculinwerte (0-1) auf, während 60% der Patienten hohe Vinculinwerte >1 aufwiesen.

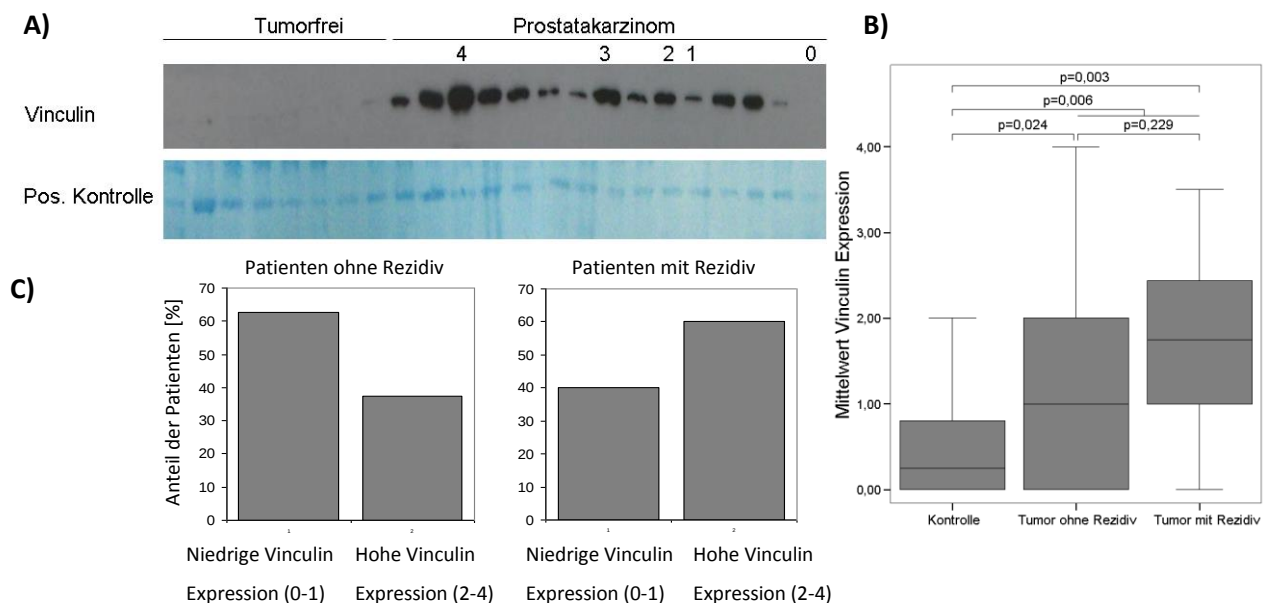


Abbildung 4.26: Analyse der Vinculin Expression im Urin von 14 Kontrollpatienten ohne Prostatakarzinom, 33 Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv und 15 Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv. **A)** Repräsentativer Western Blot der Vinculin Expression mit Coomassie gefärbtem Gel als Ladekontrolle. Die Zahlen 0-4 geben die Einteilung der Expressionstärke von Vinculin beispielhaft wieder. **B)** Boxplot der Vinculin Expression im Kontrollurin, Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv und Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv. Vinculin ist im Urin von Prostatakarzinompatienten signifikant heraufreguliert im Vergleich zum Kontrollurin ($p=0,006$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Urinen von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv besteht nicht ($p=0,229$). **C)** Prozentualer Anteil der Patienten mit hoher bzw. niedriger Vinculinexpression innerhalb der Gruppen von Patienten ohne bzw. mit Rezidiv. In der Gruppe der Patienten ohne Rezidiv weisen 62,5% der Patienten niedrige Vinculinwerte (WB 0-1) und nur 37,5% der Patienten hohe Vinculinwerte >1 auf. In der Gruppe der Patienten mit Rezidiv weisen hingegen nur 40% der Patienten niedrige Vinculinwerte (0-1) auf, während 60% der Patienten hohe Vinculinwerte >1 aufweisen.

4.4.5 Validierung der differentiellen TTC38 Expression in Prostatakarzinomgeweben

4.4.5.1 Western Blot Validierung von TTC38 als potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

Tetratricopeptide Repeat Domain Protein 38 (TTC38) wurde in der 2D-DIGE als im Rezidiv herunterreguliert im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv gefunden. Über TTC38 ist in der Literatur bisher kaum etwas bekannt. Dennoch bzw. gerade deshalb wurde auch dieses Protein für die Validierung als potentieller Tumormarker für das Prostatakarzinom mittels Western Blot ausgewählt. Der Western Blot konnte die in der 2D-DIGE detektierte differentielle Regulation zwischen Prostatektomieproben von Patienten mit und ohne Rezidiv bestätigen (Abbildung 4.27). TTC38 war in Prostatakarzinomen von Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, herunterreguliert im Vergleich zu Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv ($p=0,029$). Allerdings zeigte der Western Blot auch, dass TTC38 in Tumoren generell heraufreguliert ist im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe ($p=0,021$). Tumore ohne Rezidiv zeigten demnach eine Heraufregulation von TTC38 im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe ($p=0,004$).

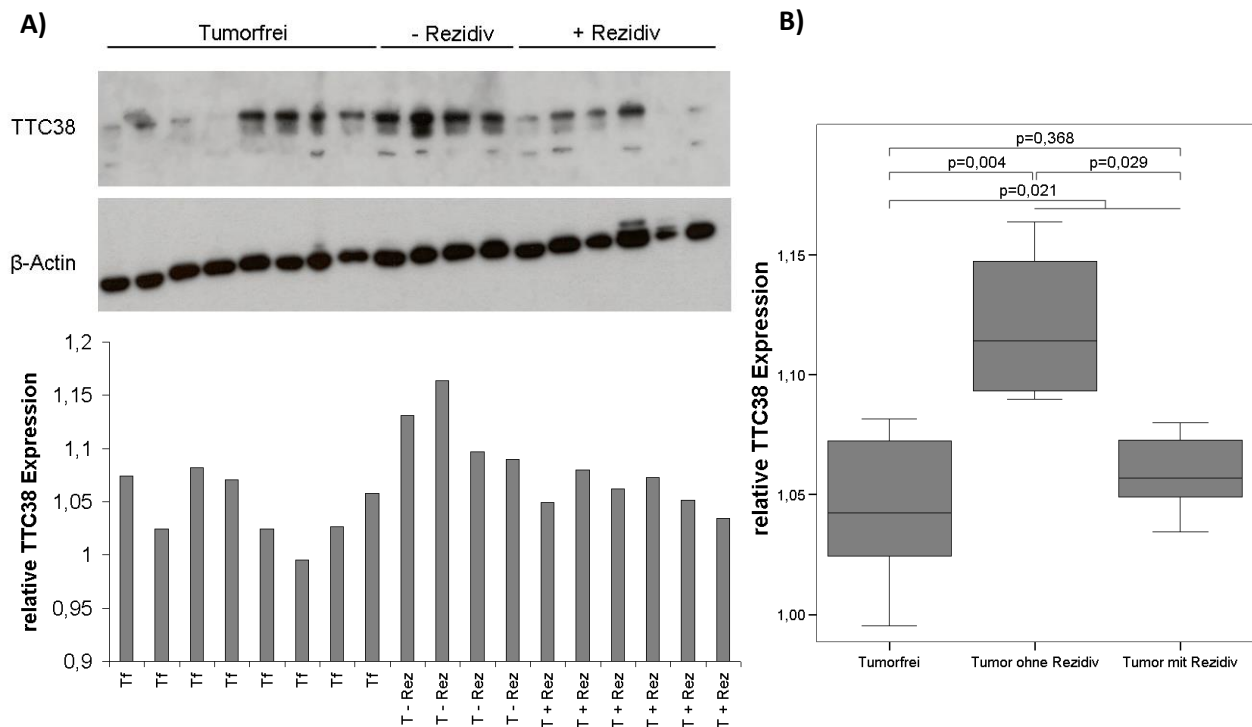


Abbildung 4.27: Validerung der DIGE Ergebnisse für TTC38 mittels Western Blot. **A)** Western Blot Ergebnisse und zugehörige densitometrische Auswertung dieser. Dargestellt ist die relative TTC38 Expression normiert auf die β -Aktin Expression. TTC38 ist in Tumorgewebe von Patienten mit (+Rezidiv) im Vergleich zu Patienten ohne Rezidiv (-Rezidiv) signifikant herunterreguliert ($p=0,029$). **B)** Mittlere TTC38 Expression der einzelnen analysierten Gewebegruppen (Tumore mit Rezidiv, Tumore ohne Rezidiv und tumorfreie Gewebe). Der Unterschied der TTC38 Expression zwischen der Gruppe der Tumore mit und ohne Rezidiv ist signifikant ($p=0,029$), ebenso wie der Unterschied der TTC38 Expression zwischen der Gruppe der Tumore ohne Rezidiv und den tumorfreien Geweben ($p=0,004$). Die TTC38 Expression der Gesamtheit aller Tumore unterscheidet sich signifikant von der TTC38 Expression in tumorfreien Geweben ($p=0,021$).

4.4.5.2 Validierung der differentiellen TTC38 Expression mittels Real-time PCR

Um eine größere Anzahl an Proben vergleichbarer Analysieren zu können und zusätzlich eine Information auf mRNA Ebene zu erhalten, erfolgte im nächsten Schritt die Validierung der Herabregulation von TTC38 in Tumoren mit Rezidiv mittels Real-time PCR. Hierbei war es möglich, die Expression von TTC38 an einer größeren Anzahl von Proben zu messen. Allerdings erfolgt bei der Real-time PCR die Messung der Expression nicht mehr auf Protein-, sondern auf mRNA-Ebene. Mit dem Vergleich der TTC38 Expression auf mRNA- und Proteinebene ist schon eine erste Aussage zu einem möglichen Mechanismus der Expressionsregulation von TTC38 möglich. Für die Real-time PCR Analysen standen neun Prostatektomieproben von Prostatakarzinomen ohne Rezidiv, 13 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und 11 tumorfreie Prostatektomieproben zur Verfügung. Wie bereits der Western Blot bestätigte auch die Real-time PCR die signifikante Herabregulation von TTC38 im Tumorgewebe von Patienten, die im späteren Verlauf ihrer Erkrankung ein Rezidiv entwickelt haben, im Vergleich zu Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv ($p=0,030$; Abbildung 4.28). Somit war TTC38 in Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv im Vergleich zu Patienten mit Rezidiv und

tumorfreen Geweben signifikant heraufreguliert ($p=0,030$ bzw. $p=0,004$). Ein signifikanter Unterschied zwischen tumorfreiem Gewebe und der Gesamtheit aller Tumore bestand allerdings ebenso wenig ($p=0,232$) wie zwischen tumorfreiem Gewebe und Tumoren mit Rezidiv ($p=0,156$).

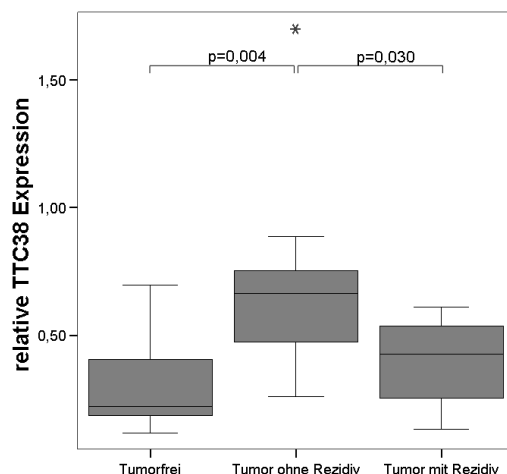


Abbildung 4.28: Real-time PCR Expressionsanalysen von TTC38 an neun Prostatektomieproben von Prostatakarzinomen ohne Rezidiv, 13 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und 11 tumorfreien Proben. TTC38 ist in Tumoren ohne Rezidiv signifikant heraufreguliert im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe ($p=0,004$) und Tumoren mit Rezidiv ($p=0,030$). Ein signifikanter Unterschied zwischen tumorfreiem Gewebe und der Gesamtheit aller Tumore besteht ebenso wenig ($p=0,232$) wie zwischen tumorfreiem Gewebe und Tumoren mit Rezidiv ($p=0,156$).

4.4.5.3 Immunhistochemische Validierung von TTC38

Zur weiteren Validierung der Herabregulation von TTC38 in Tumoren mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv wurde die TTC38 Expression im Gewebe immunhistochemisch analysiert. Es wurden 13 Prostatektomieproben von Prostatakarzinomen ohne Rezidiv, 14 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und 42 tumorfreie Prostatektomieproben analysiert. Ausgewählte immunhistochemische Färbungen für TTC38 von Prostatektomieproben von jeweils zwei Patienten mit und ohne Rezidiv sind in Abbildung 4.29 dargestellt. Deutlich ist hierbei zu erkennen, dass TTC38 im Drüsengewebe, nicht aber im Stroma der Prostata exprimiert wird.

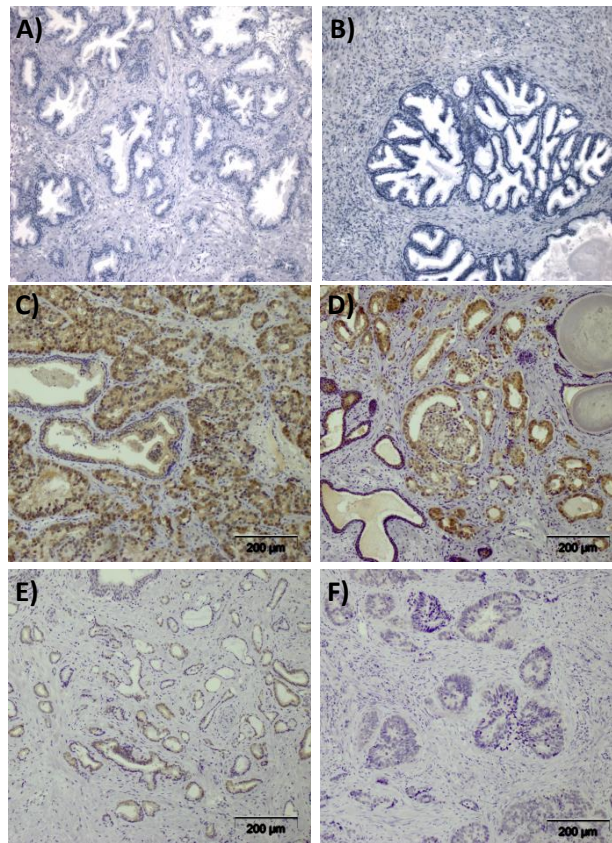


Abbildung 4.29: Immunhistochemie von TTC38. **A)** und **B)** Repräsentative tumorfreie Prostatektomieproben, **C)** und **D)** repräsentative Prostatektomieproben von zwei Patienten ohne Rezidiv, **E)** und **F)** repräsentative Prostatektomieproben von zwei Patienten mit Rezidiv. Die TTC38 Expression ist in den Prostatakarzinomen heraufreguliert im Vergleich zum tumorfreien Gewebe. Weiterhin ist TTC38 in den Proben des nicht-rezidivierenden Prostatakarzinoms deutlich heraufreguliert im Vergleich zum rezidivierenden Prostatakarzinom.

Die zusammenfassende Auswertung aller analysierten Proben ist in Abbildung 4.30 dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass der Remmele Score der TTC38 Proteinexpression der Tumore mit Rezidiv im Mittel bei 5,07 liegt. Der mittlere Reemmescore der Tumore ohne Rezidiv hingegen liegt bei 5,64, während er im tumorfreien Gewebe bei 3,40 liegt. Der Expressionsunterschied von TTC38 zwischen tumorfreiem Gewebe und der Gesamtheit aller Tumore ist signifikant ($p=0,009$). Auch der Expressionsunterschied zwischen tumorfreiem Gewebe und Tumoren mit Rezidiv ist signifikant ($p=0,019$), während der Expressionsunterschied von TTC38 zwischen tumorfreiem Gewebe und Tumoren ohne Rezidiv knapp nicht signifikant ($p=0,079$) war aber einen eindeutigen Trend zeigte. Damit bestätigt die Immunhistochemie die Heraufregulation von TTC38 in der Gesamtheit aller Prostatakarzinome und die leichte Herunterregulation von TTC38 in Tumoren mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv. Aufgeschlüsselt nach dem prozentualen Anteil der einzelnen maximalen Immunhistochemiescores wiesen 35% der Tumore mit Rezidiv einen TTC38 immunhistochemischen Score von 3 auf (Daten nicht gezeigt). In der Gruppe der Tumore ohne Rezidiv wiesen 50% der Tumore einen immunhistochemischen Score von 3 auf. In der Gruppe der tumorfreien Gewebe ist der Anteil der Patienten, die einen Score von 3 aufweisen mit 4,8 % sehr gering (Daten nicht gezeigt).

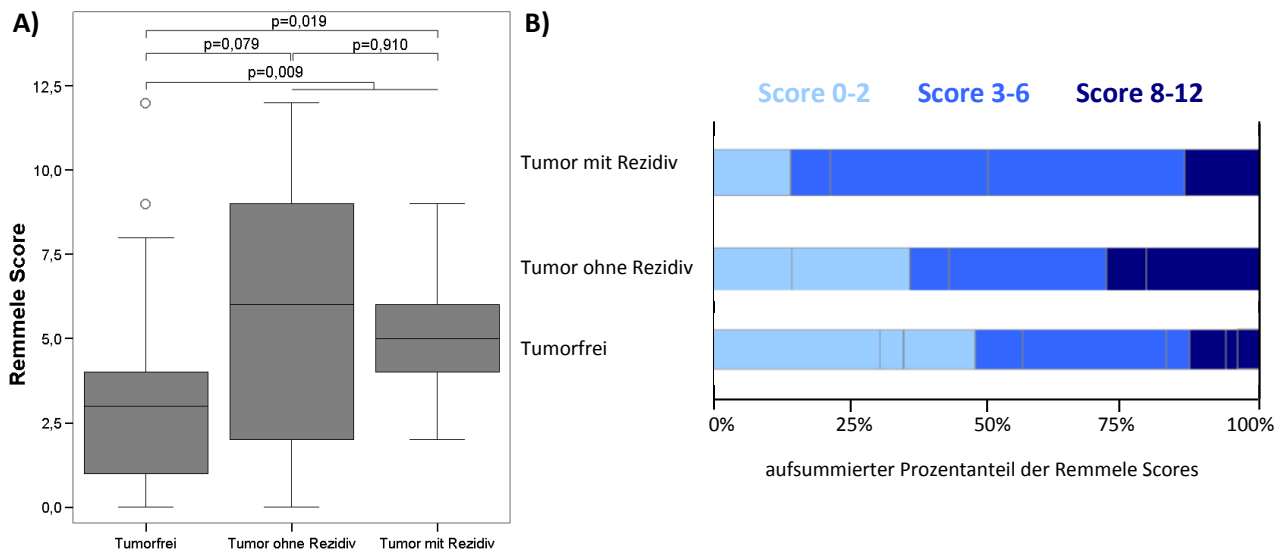


Abbildung 4.30: Zusammenfassung der Immunhistochemie von TTC38 an 13 Prostataktomieproben von Prostatakarzinomen ohne Rezidiv, 14 Prostataktomieproben von Patienten mit Rezidiv und 42 tumorfreie Prostataktomieproben. **A)** Mittlerer Score der TTC38 Expression in den einzelnen Gewebegruppen. **B)** Prozentualer Anteil der Scores der TTC38 Expression in den einzelnen Gruppen.

4.4.5.4 Validierung der differentiellen TTC38 Expression an einem unabhängigen Patientenkollektiv mittels TMA

TTC38 zeigte in der DIGE, in Western Blots und den immunhistochemischen Analysen bisher vielversprechende Ergebnisse. So war TTC38 im Prostatakarzinom heraufreguliert, wobei es in Karzinomen mit Rezidiv etwas niedriger exprimiert wurde als in Karzinomen ohne Rezidiv. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte TTC38 im Folgenden mittels immunhistochemischer Färbung eines TMA an einem großen, unabhängigen Patientenkollektiv validiert werden. Hierzu wurde fand der TMA von Prof. Dr. med. Glen Kristiansen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) erneut Anwendung. Damit konnten 63 Proben von Patienten ohne Rezidiv, 18 Proben von Patienten mit Rezidiv und 125 tumorfreie Patientenproben immunhistochemisch auf ihre TTC38 Expression hin analysiert werden. Weiterhin waren von 53 Patientenproben einer prostataspezifischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) vorhanden. Die PIN gilt als eine prä-maligne Vorstufe des Prostatakarzinoms (Ashida et al., 2004; McNeal und Bostwick, 1986; Montironi et al., 2011). Damit ermöglichte die Analyse der PIN einen Rückschluss auf den Zeitpunkt der TTC38 Expressionsänderung im Verlauf der Prostatakarzinomentstehung. Zwecks genauerer TTC38 Expressionanalyse wurde bei den TMA Analysen der Remmele Score ermittelt. Wie in Tabelle 4.8 und Abbildung 4.31 dargestellt, wiesen die tumorfreien Gewebe im Mittel einen TTC38 Expressionsscore von 1,34 auf (Remmele Score 4,74). In PIN-Läsionen liegt der mittlere TTC38 Score bei 2,40 (Remmele Score 9,19), während Prostatakarzinome ohne Rezidiv einen mittleren TTC38 Score von 2,46 (Remmele Score 9,29) und Prostatakarzinome mit Rezidiv einen mittleren TTC38 Score von 2,39 (Remmele Score 9,28) aufwiesen. Die TTC38 Expression war somit schon in der prä-malignen Vorstufe

des PIN im Vergleich zum Normalgewebe heraufreguliert. Der Unterschied in der TTC38 Expression zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv war in diesem Patientenkollektiv nicht signifikant ($p=0,609$). TTC38 wies aber im tumorfreien Gewebe eine signifikant niedrigere Expression auf als in allen anderen analysierten Geweben (für PIN, Tumor ohne Rezidiv und Tumor mit Rezidiv im Vergleich zum tumorfreien Gewebe jeweils $p<0,001$).

Tabelle 4.8: TTC38 Expression in 125 tumorfreien Geweben, 53 PIN-Läsionen, 63 Prostatakarzinomen ohne Rezidiv und 18 Prostatakarzinomen mit Rezidiv.

Gewebe	MW TTC38 Score	SA TTC38 Score	MW TTC38 [%] gefärbter Zellen	SA TTC38 [%] gefärbter Zellen	MW TTC38 Remmele Score*	SA TTC38 Remmele Score*
tumorfrei	1,34	0,53	87,88	23,13	4,74	1,81
PIN	2,40	0,60	96,42	9,73	9,19	2,67
Tumor ohne Rezidiv	2,46	0,62	90,81	15,18	9,29	2,64
Tumor mit Rezidiv	2,39	0,61	93,89	12,90	9,28	2,47

MW= Mittelwert, SA=Standardabweichung, Score = immunhistochemischer Score;

*Adaptierter Remmele Score (übertragen von der Kernfärbung auf die zytoplasmatische Färbung)

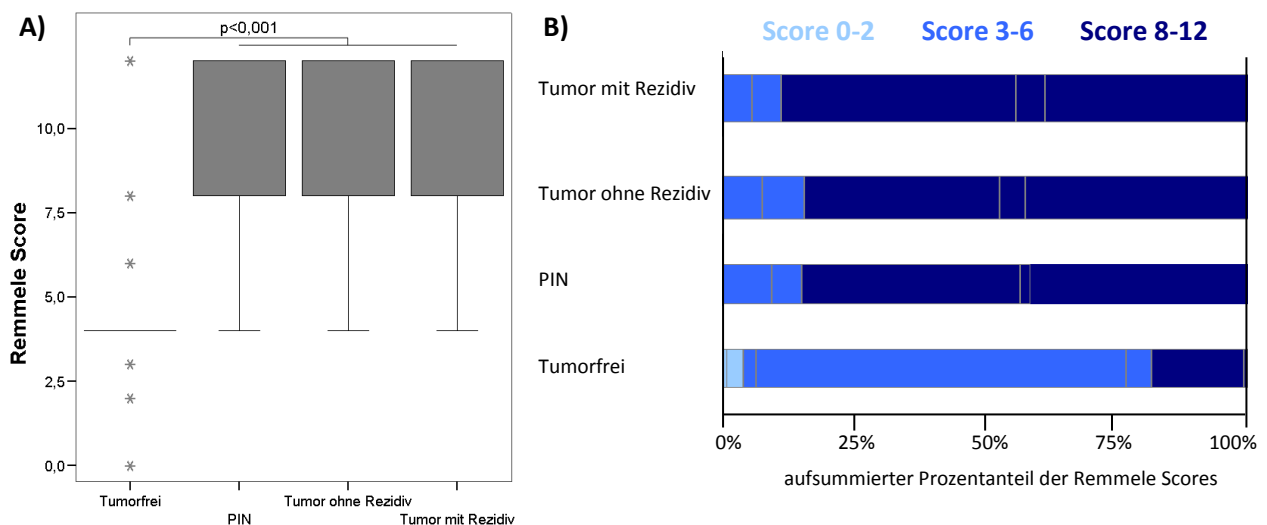


Abbildung 4.31: Immunhistochemische Analyse der TTC38 Expression in Prostata(karzinom)gewebe. **A)** mittlerer Remmele Score der TTC38 Expression in den einzelnen Gewebegruppen dargestellt als Boxplot. TTC38 ist in Prostatakarzinomen und der PIN im Vergleich zum Normalgewebe signifikant heraufreguliert ($p<0,001$). Ein Unterschied in der TTC38 Expression zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv ist nicht detektierbar ($p=0,961$). **B)** Prozentualer Anteil der Remmele Scores der TTC38 Expression in den einzelnen Gruppen. Nur 18,4% der tumorfreien Gewebe weisen eine hohe TTC38 Expression auf (Remmele Score 8-12) während 84,9% der PIN-Läsionen, 84,2% der Prostatakarzinome ohne Rezidiv und 88,9% der Prostatakarzinome mit Rezidiv eine hohe TTC38 Expression (Remmele Score 8-12) aufweisen.

In einer Kaplan-Meyer Überlebensanalyse des untersuchten TMAs zeigten Prostatakarzinompatienten mit niedriger TTC38 Expression (Remmele Score 0-6) keinen signifikanten Unterschied im rezidivfreien Überleben im Vergleich zu Prostatakarzinompatienten mit einer starken TTC38 Expression (Remmele Score 8-12) ($p=0,303$ im log-Rank Test)(Abbildung 4.32).

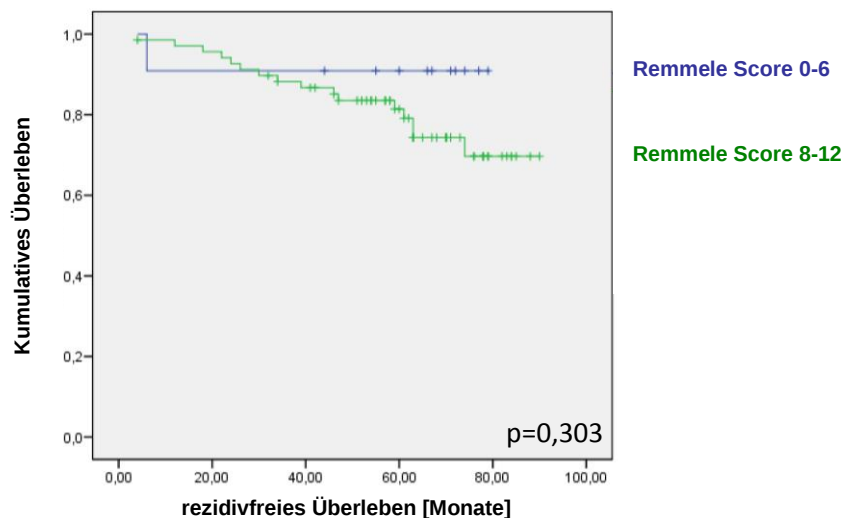


Abbildung 4.32: Kaplan-Meyer Kurven zum Einfluss der TTC38 Expression auf das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinompatienten. Ein Unterschied im rezidivfreien Überleben der Prostatakarzinompatienten mit schwacher TTC38 (Remmele Score 0-6) und starker TTC38 Expression (Remmele Score 8-12) kann nicht detektiert werden ($p=0,303$).

4.5 *Multiple Reaction Monitoring* als Hochdurchsatz Methode für die Validierung potentieller neuer Biomarker für das (rezidivierende) Prostatakarzinom

Flüssigchromatographie-*Multiple Reaction Monitoring*-MS (LC-MRM-MS) stellt eine neue, vielversprechende massenspektrometrische Methode mit dem Potential zur Validierung potentieller Biomarker dar. Die Vorteile der LC-MRM-MS gegenüber antikörperbasierten Nachweismethoden (Western Blot, ELISA ...) liegen in der Möglichkeit des Multiplexings und der damit verbundenen kostengünstigen Quantifizierung von zurzeit bis zu 67 Proteinen (Domanski et al., 2012) gleichzeitig aus einer Probe. Weiterhin sind nur geringe Mengen Probenmaterial und eine kurze Entwicklungszeit für die Assays nötig. Bei entsprechender Weiterentwicklung werden der Methode Chancen in der klinischen Anwendung eingeräumt (Picotti und Aebersold, 2012). In den im Folgenden dargestellten Versuchen sollten die mittels 2D-DIGE und MS identifizierten und bereits im Western Blot analysierten Proteine TTC38, Secernin-1 und Vinculin als Marker für das (rezidivierende) Prostatakarzinom validiert werden. Da Prostatspezifische saure Phosphatase (PAP) und Galectin-3 sowohl in den initialen 2D-DIGE und MS Analysen als dereguliert identifiziert wurden, als auch in der Literatur schon als Marker für das rezidivierende Prostatakarzinom diskutiert werden, wurden weiterhin diese beiden Protein Abundanzen in Serum und Urin mittels LC-MRM-MS untersucht. Da für die Proteine Gelsolin, 78 kDa Glucose-

regulated Protein (GRP78), Annexin A5 und Alpha-1B-Glycoprotein am Genome BC Proteomics Center der *University of Victoria* bereits Methoden und SIS-Peptide für LC-MRM-MS-Messungen zur Verfügung standen und die genannten Proteine auch in der 2D-DIGE differentiell reguliert waren, wurden diese Proteine zusätzlich mit in die LC-MRM-MS-Messungen einbezogen. Alle LC-MRM-MS-Messungen dieser Arbeit wurden am Genome BC Proteomics Centre in der Gruppe von Prof. Dr. rer. nat. Christoph Borchers unter Anleitung von Angela Jackson durchgeführt (University of Victoria, Victoria BC, Kanada). Die Methode der LC-MRM-MS ist am Genome BC Proteomics Center für Serum sehr gut etabliert. Für Urinproben musste die Probenaufarbeitung allerdings vor der Durchführung der eigentlichen LC-MRM-MS Versuche zunächst etabliert werden. Hierzu standen die Methoden der Trichloressigsäurefällung (TCA) und des *Molecular Weight Cut-offs* (MWCO) zur Verfügung. Außerdem standen zwei mögliche Protokolle für den Trypsinverdau zur Verfügung. Nach eingehender Literaturrecherche wurde das am Genome BC Proteomics Center von Frau Angela Jackson zum tryptischen Verdau von Serumproben verwendete Protokoll mit einem leicht variierten Protokoll nach Selevsek et al. (Selevsek et al., 2011) verglichen. Die Ergebnisse (Abbildung 4.33) zeigen, dass die Messungen mit der Kombination aus *Molecular weight cut off* (MWCO)-Aufarbeitung der Urinproben und dem leicht modifizierten Protokoll für den tryptischen Verdau der Proteine nach Selevsek et al. (Selevsek et al., 2011) die höchste Summe der Proteinabundanzen und gleichzeitig die niedrigste Summe der relativen Standardabweichungen aufweist. Dieses Protokoll wurde daher als Standardprotokoll für die Aufarbeitung der Proben für die nachfolgenden LC-MRM-MS Analysen ausgewählt.

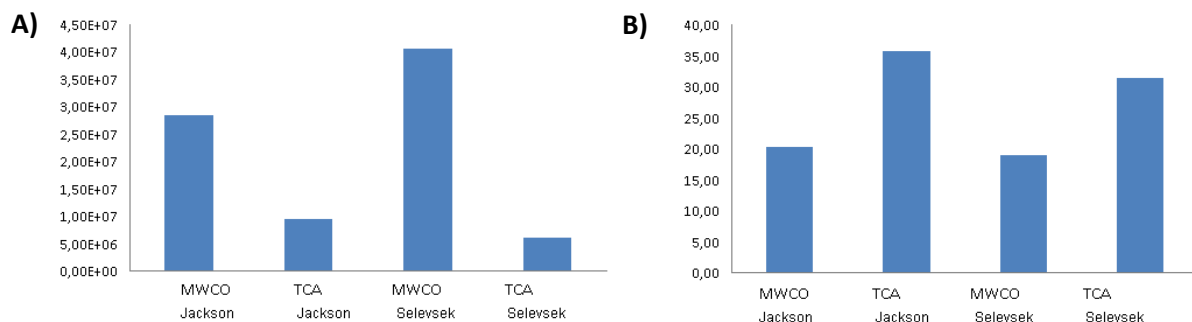


Abbildung 4.33: Etablierung von Proteinisolation und -verdau aus Urin durch Vergleich von vier verschiedenen Aufarbeitungsprotokollen und Messung eines etablierten 72-SIS-Peptide Mix. Folgende Protokolle wurden miteinander verglichen: Urinaufarbeitung mittels *Molecular weight cut off* (MWCO) kombiniert mit einem tryptischen verdau nach Selevsek et al. bzw. kombiniert mit einem tryptischen Verdau nach dem Protokoll von Frau Angela Jackson vom Genome BC Proteomics Centre (Angela) sowie die Proteinaufarbeitung mittels Trichloressigsäurefällung (TCA) jeweils kombiniert mit den beiden möglichen Protokollen für den Trypsinverdau. Dargestellt ist **A)** die Summe aller Abundanzen der gemessenen Peptide [-] und **B)** die Summe aller relativen Standardabweichungen aller pro Protokoll gemessenen Proben im 4-fach Ansatz. Das Protokoll mit der Kombination aus MWCO-Aufarbeitung der Urinproben kombiniert mit dem leicht modifizierten Protokoll für den tryptischen Verdau der Proteine nach Selevsek et al. (Selevsek et al., 2011) zeigt die höchste Summe der Proteinabundanzen und gleichzeitig die niedrigste Summe der relativen Standardabweichungen.

Im Anschluss an die Etablierung konnten die LC-MRM-MS Messungen durchgeführt und statistisch ausgewertet werden. Für die absolut quantifizierten Proteine wurden statistische Analysen der verschiedenen Tumor- und Kontrollgruppen durchgeführt. In den Abbildungen 4.34 bis 4.38 sind die Ergebnisse der statistischen Analysen für die LC-MRM-MS Messungen von PAP, Galectin-3, TTC38, Annexin A5, Vinculin, GRP78, Alpha-1B-Glycoprotein und Gelsolin dargestellt. Während PAP, Galectin-3, TTC38 und Annexin A5 nur im Urin nachgewiesen werden konnten, waren Vinculin, GRP78, Alpha-1B-Glycoprotein und Gelsolin sowohl im Urin als auch im Serum von Patienten nachweisbar. Secernin-1 konnte mittels LC-MRM-MS weder im Urin noch im Serum von Kontroll- oder Prostatakarzinompatienten detektiert werden.

In den Vorversuchen wurden PAP und Annexin A5 identifiziert als Proteine, welche in Prostatakarzinomen mit Rezidiv heraufreguliert sind im Vergleich zu den Prostatakarzinomen ohne Rezidiv. Außerdem war Annexin A5 in Tumoren im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe heraufreguliert. Im Urin zeigte Annexin A5 eine Tendenz zur höheren Expression im Urin von Prostatakarzinompatienten im Vergleich zu den Kontrollurinen, ein signifikanter Unterschied der Annexin A5 Konzentrationen in den einzelnen Uringruppen bestand aber nicht. Die LC-MRM-MS Messungen von PAP zeigten eine signifikante Heraufregulation der Urine von Prostatakarzinompatienten im Vergleich zu den Kontrollpatienten ($p=0,012$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollurinen und den Urinen von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv war allerdings nicht detektierbar.

Für Galectin-3 und TTC38 konnte in den 2D-DIGE Versuchen gezeigt werden, dass es in Prostatakarzinomen mit Rezidiv im Vergleich zu Prostatakarzinomen ohne Rezidiv herabreguliert ist. Auch im Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv ist Galectin-3 signifikant herabreguliert im Vergleich zu den Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv ($p=0,017$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollurinen und den Urinen von Prostatakarzinompatienten war allerdings nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten die LC-MRM-MS Messungen von TTC38 die Heraufregulation dieses Proteins im Urin von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv im Vergleich zum Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv bestätigen (Abbildung 4.34).

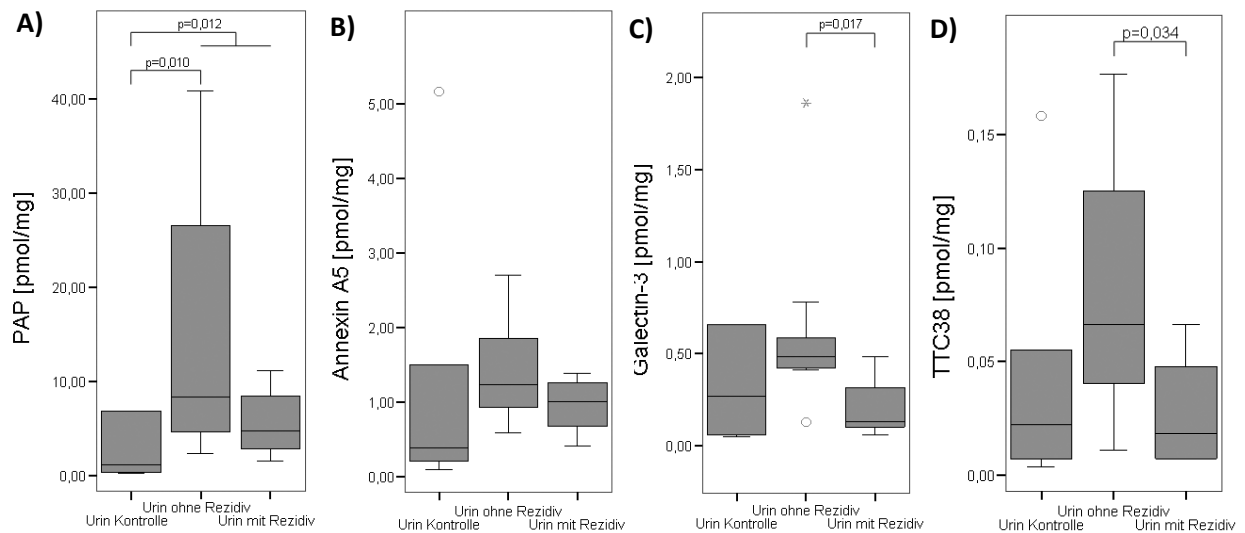


Abbildung 4.34: Ergebnisse der LC-MRM-MS Messungen für prostataspezifische saure Phosphatase (PAP), Peptid FQLESETLK (A), Galectin-3 Peptid IALDFQR (B), Annexin A5 Peptid GTVTDFPGFDER (C) und Tetratricopeptid Protein 38 (TTC38) Peptid IVQLGGSNAQR (D) im Urin. PAP ist im Urin von Prostatakarzinompatienten signifikant hochreguliert ($p=0,012$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Urinen von Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv konnte allerdings nicht nachgewiesen werden ($p=0,223$). Für Annexin A5 konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression zwischen Kontrollpatienten und Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv detektiert werden. Auch für Galectin-3 konnten keine signifikanten Unterschiede der Expression zwischen Prostatakarzinompatienten und Kontrollpatienten nachgewiesen werden ($p=0,658$). Allerdings war die Galectin-3 Expression in Urinen von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv signifikant herunterreguliert im Vergleich zu Urinen von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv ($p=0,017$). TTC38 ist im Urin von Prostatakarzinompatienten nicht signifikant heraufreguliert. Allerdings war TTC38 in Karzinomen ohne Rezidiv signifikant heraufreguliert im Vergleich zu Karzinomen mit Rezidiv ($p=0,034$).

Die LC-MRM-MS Ergebnisse der Gelsolinmessungen waren in Urin- und Serumproben widersprüchlich. Zeigten die 2D-DIGE Analysen eine signifikante Herabregulation von Gelsolin in Prostatakarzinomen mit Rezidiv im Vergleich zu Prostatakarzinomen ohne Rezidiv, so spiegelte sich dies auch in den LC-MRM-MS Messungen von Gelsolin im Urin wider. Gelsolin ist im Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv im Vergleich zum Urin von Patienten ohne Rezidiv signifikant herunterreguliert ($p=0,039$). Eine signifikant veränderte Expression von Gelsolin in den verschiedenen Tumorgruppen im Vergleich zum Kontrollurin lag allerdings nicht vor. Weiterhin drehte sich die Regulation zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv im Serum um: Im Serum des Gesamtkollektives zeigten Patienten mit Rezidiv eine signifikant höhere Gelsolinexpression als Patienten ohne Rezidiv ($p=0,019$). In einer Subgruppenanalyse war dieser Unterschied allerdings weder im Bonner noch im Aachener Kollektiv signifikant. Gleiches galt für die signifikante Herabregulation von Gelsolin in den Karzinomseren im Vergleich zu den Kontrollseren ($p=0,002$).

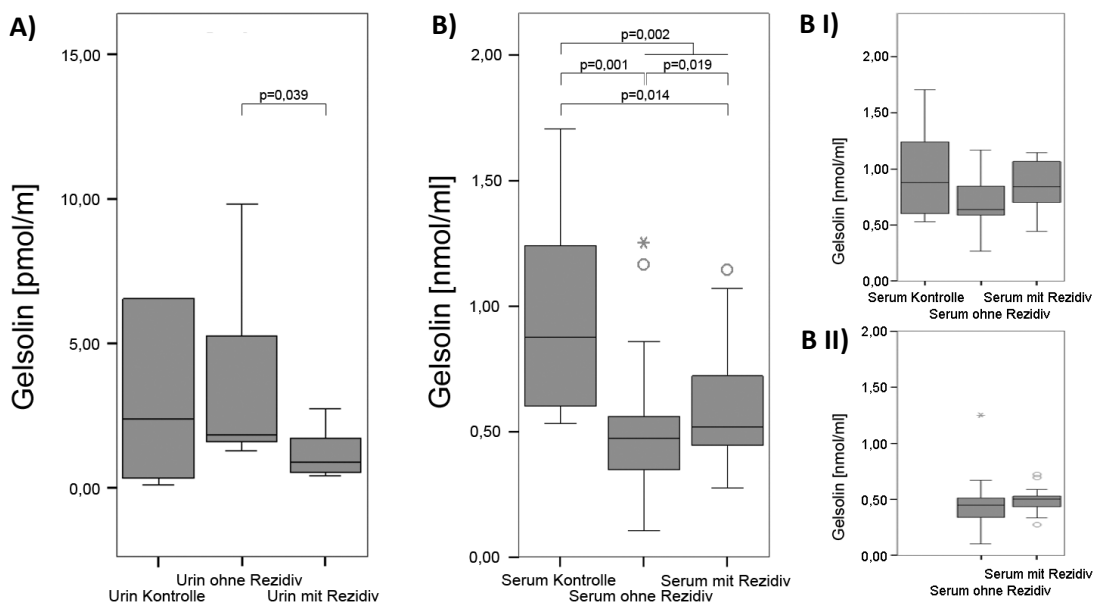


Abbildung 4.35: Ergebnisse der LC-MRMMS Messungen für Gelsolin Peptid HVVONEVVVQR in Urin (A) und Serum (B-D) von Prostatakarzinompatienten. B) Gelsolinkonzentrationen im gesamten Serumkollektiv. C) und D) zeigen die Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen aufgeschlüsselt nach den Serum-Subkollektiven „Aachen“ (C) und „Bonn“ (D). Gelsolin ist im Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv im Vergleich zu Urin von Patienten ohne Rezidiv signifikant herunterreguliert ($p=0,039$). Eine signifikant veränderte Expression von Gelsolin in den verschiedenen Tumorguppen im Vergleich zum Kontrollurin liegt allerdings nicht vor. Weiterhin dreht sich die Regulation zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv im Serum um: Im Serum des Gesamtkollektivs zeigen Patienten mit Rezidiv eine signifikant höhere Gelsolinexpression als Patienten ohne Rezidiv ($p=0,019$). In einer Subgruppenanalyse ist dieser Unterschied allerdings weder im Bonner noch im Aachener Kollektiv signifikant. Gleiches gilt für die signifikante Herabregulation von Gelsolin in den Karzinomseren im Vergleich zu den Kontrollseren ($p=0,002$).

Als weiterer potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom wurde in den kombinierten 2D-DIGE und MS Analysen GRP78 identifiziert. Die 2D-DIGE Analysen zeigten eine signifikante Heraufregulation von GRP78 in Prostatakarzinomen mit Rezidiv im Vergleich zu Prostatakarzinomen ohne Rezidiv. Daher wurde auch GRP78 mittels LC-MRM-MS im Serum und Urin von Prostatakarzinompatienten analysiert. Allerdings war GRP78 im Serum von Prostatakarzinompatienten signifikant herabreguliert (Abbildung 4.36). Ein Unterschied zwischen Seren von Patienten mit und ohne Rezidiv bestand nicht. Im Gegensatz dazu war GRP78 im Urin von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv signifikant heraufreguliert im Vergleich zum Kontrollurin und den Urinen von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv.

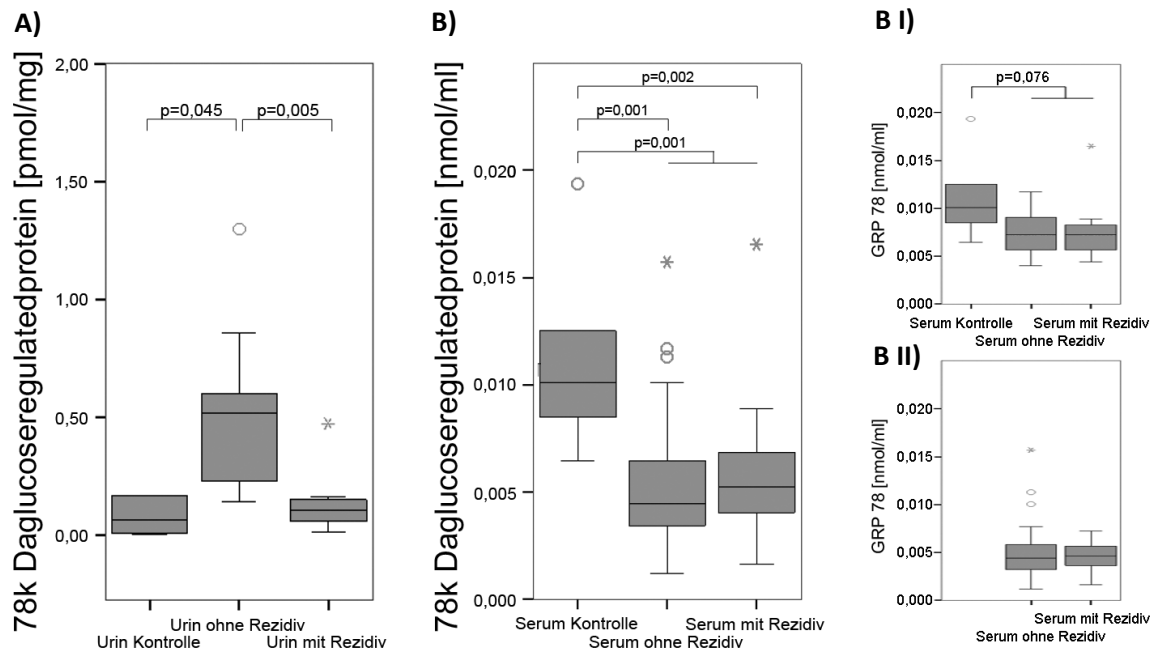


Abbildung 4.36: Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen für 78 kDa *Glucose-regulated Protein* (GRP78) Peptid ITPSYVAFTPEGER im Urin (**A**) und Serum (**B-D**) von Prostatakarzinompatienten. **B)** GRP78-Konzentrationen im gesamten Serumkollektiv. **C**) und **D**) zeigen die Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen aufgeschlüsselt nach den Serum-Subkollektiven „Aachen“ (**C**) und „Bonn“ (**D**). GRP78 ist im Serum von Karzinompatienten mit Rezidiv im Vergleich zu Karzinompatienten ohne Rezidiv nicht signifikant heraufreguliert ($p=0,487$). GRP78 ist im Urin von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv heraufreguliert im Vergleich zu Karzinomen mit Rezidiv ($p=0,005$). Prostatakarzinome ohne Rezidiv wiesen zusätzlich eine signifikant höhere Expression von GRP78 im Urin auf als die Kontrollurine ($p=0,045$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Urinen von Karzinompatienten insgesamt und den Kontrollurinen war nicht nachweisbar ($p=0,122$). Im Serum von Prostatakarzinompatienten ist GRP78 signifikant herabreguliert im Vergleich zu den Kontrollseren ($p=0,001$).

Die letzten beiden mittels LC-MRM-MS im Urin von Prostatakarzinompatienten analysierten Proteine waren Alpha-1B-Glycoprotein und Vinculin. Beide Proteine wurden in den 2D-DIGE-Ergebnissen als in Prostatakarzinomen mit Rezidiv signifikant heraufreguliert im Vergleich zu Prostatakarzinomen ohne Rezidiv gefunden. Alpha-1B-Glycoprotein zeigte außerdem eine signifikante Heraufregulation in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe. Im Urin konnte diese Heraufregulation von Alpha-1B-Glycoprotein in Prostatakarzinomen im Vergleich zu Kontrollurinen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.37). Mehr noch war Alpha-1B-Glycoprotein in Urinen von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv signifikant herabreguliert im Vergleich zum Urin von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv. Im Serum von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv war allerdings ein eindeutiger Trend zur Heraufregulation von Alpha-1B-Glycoprotein im Vergleich zu Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv zu beobachten. Gleichzeitig war Alpha-1B-Glycoprotein im Serum von Prostatakarzinompatienten signifikant herabreguliert im Vergleich zu Serum von Kontrollpatienten.

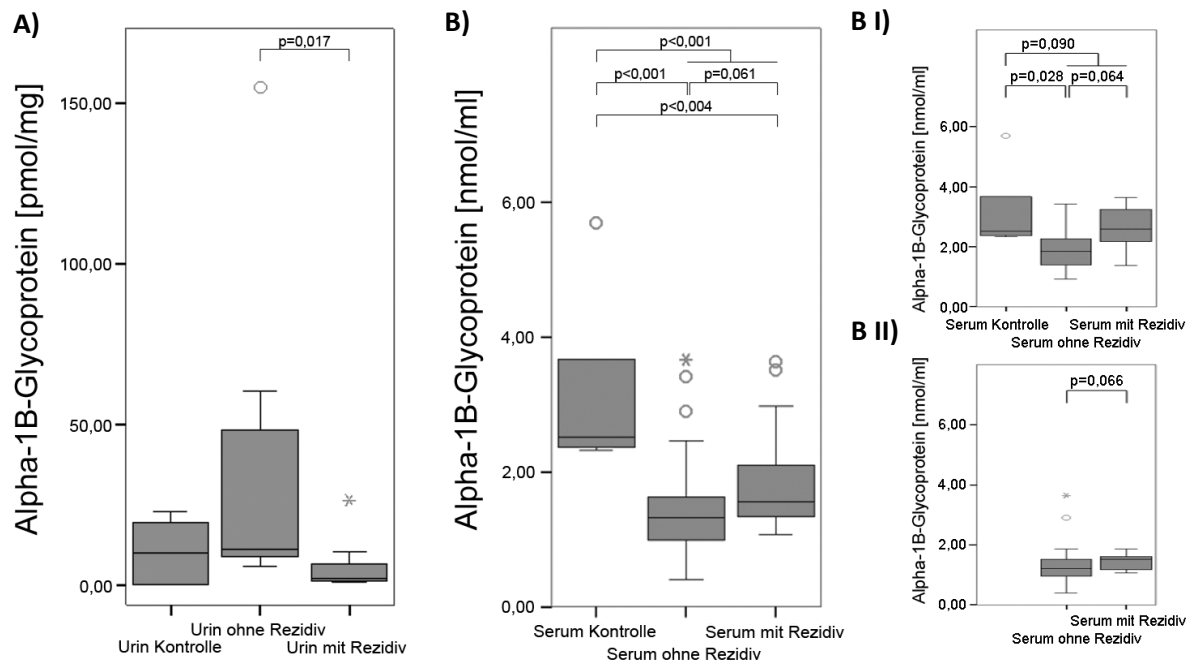


Abbildung 4.37: Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen für Alpha-1B-Glycoprotein Peptid GVTFLLR im Urin (**A**) und Serum (**B-D**) von Prostatakarzinompatienten. **B)** Alpha-1B-Glycoprotein-Konzentrationen im gesamten Serumkollektiv. **C)** und **D)** zeigen die Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen aufgeschlüsselt nach den Serum-Subkollektiven „Aachen“ (**C**) und „Bonn“ (**D**). Für Alpha-1B-Glycoprotein ist ein Trend zur Heraufregulation im Serum von Patienten mit Rezidiv im Vergleich zu Seren von Patienten ohne Rezidive zu erkennen ($p=0,046$). Gleichzeitig ist Alpha-1B-Glycoprotein in Prostatakarzinompatienten signifikant herunterreguliert im Vergleich zur Gruppe der Kontrollpatienten ($p<0,001$). Im Gegensatz hierzu ist im Urin keine signifikante Herabregulation von Alpha-1B-Glycoprotein in Prostatakarzinompatienten im Vergleich zum Urin der Kontrollgruppe vorhanden ($p=0,376$). Die Urine von Patienten ohne Rezidiv weisen eine signifikant höher Alpha-1B-Glycoproteinexpression im Vergleich zu Urin von Patienten mit Rezidiventwicklung im Laufe ihrer Erkrankung auf ($p=0,017$). Weder der Unterschied in der Alpha-1B-Glycoproteinexpression von Patienten mit noch der von Patienten ohne Rezidiv unterscheidet sich allerdings signifikant von der Alpha-1B-Glycoproteinkonzentration der Kontrollpatienten.

Im Gegensatz dazu zeigte Vinculin sowohl im Serum als auch im Urin die Tendenz, in Karzinompatienten heraufreguliert zu sein im Vergleich zu Kontrollpatienten (Abbildung 4.38). Im Serum war dieser Unterschied zwischen Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv signifikant ($p=0,007$).

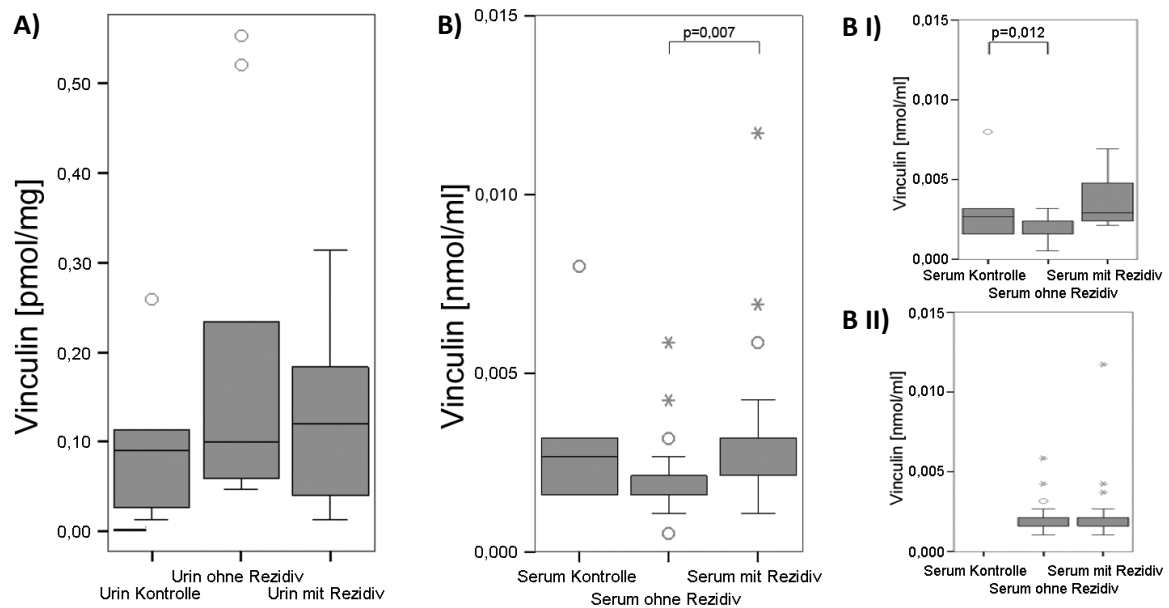


Abbildung 4.38: Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen für das Vinculin Peptid SLGEISALTSK in Urin **(A)** und Serum **(B-D)** von Prostatakarzinompatienten. **B)** Vinculinkonzentrationen im gesamten Serumkollektiv. **C)** und **D)** zeigen die Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen aufgeschlüsselt nach den Serum-Subkollektiven „Aachen“ **(C)** und „Bonn“ **(D)**. Vinculin zeigt im Urin von Prostatakarzinompatienten einen leicht höheren Mittelwert als im Kontrollurin. Dieser Unterschied ist allerdings genauso wenig signifikant, wie der Vinculin-Expressionsunterschied im Urin von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv ($p=0,462$). Im Gegensatz dazu ist diese Heraufregulation von Vinculin im Serum von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv im Vergleich zum Serum von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv signifikant im Gesamtkollektiv ($p=0,007$). Ein signifikanter Unterschied zwischen Prostatakarzinomen und den Kontrollen ist allerdings weder im Urin noch im Serum nachweisbar.

Tabelle 4.9 gibt einen zusammenfassenden Überblick über alle LC-MRM-MS Ergebnisse. Eine detaillierte Auflistung aller Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte aller durchgeführten LC-MRM-MS-Messungen – auch von den Peptiden, deren Abbildungen hier nicht gezeigt sind – findet sich im Anhang in Tabelle 7.22.

Tabelle 4.9: Zusammenfassender Überblick über alle LC-MRM-MS Ergebnisse

Protein	LC-MRM-MS Serum			LC-MRM-MS Urin		
	Tu – Rez zu Tf ¹⁾	Tu + Rez zu Tf ²⁾	Tu + Rez zu Tu – Rez ³⁾	Tu – Rez zu Tf ⁴⁾	Tu + Rez zu Tf ⁵⁾	Tu + Rez zu Tu – Rez ⁶⁾
PAP	–	–	–	↑*	↑	→
Annexin A5	–	–	–	↑	↑	→
Galectin-3	–	–	–	Keine Wertung	→	↓*
TTC38	–	–	–	↑	→	↓*
Gelsolin	↓*	↓*	↑*	→	Keine Wertung	↓*
GRP78	↓*	↓*	↑	↑*	→	↓*
A1BG	↓*	↓*	↑#	↑	→	↓*
Vinculin	Keine Wertung	→	↑*	↑	↑	↑

1) gibt das Verhältnis im Serum von Patienten mit Tumoren ohne Rezidiv (Tu – Rez) zu Serum von tumorfreien Kontrollpatienten (Tf) an

2) gibt das Verhältnis im Serum von Patienten mit Tumoren mit Rezidiv (Tu + Rez) zu Serum von tumorfreien Kontrollpatienten (Tf) an

3) gibt das Verhältnis im Serum von Patienten mit Tumoren mit Rezidiv (Tu + Rez) zu Serum von Patienten mit Tumoren ohne Rezidiv (Tu – Rez) an

4) gibt das Verhältnis im Urin von Patienten mit Tumoren ohne Rezidiv (Tu – Rez) zu Urin von tumorfreien Kontrollpatienten (Tf) an

5) gibt das Verhältnis im Urin von Patienten mit Tumoren mit Rezidiv (Tu + Rez) zu Urin von tumorfreien Kontrollpatienten (Tf) an

6) gibt das Verhältnis im Urin von Patienten mit Tumoren mit Rezidiv (Tu + Rez) zu Urin von Patienten mit Tumoren ohne Rezidiv (Tu – Rez) an;
 LC-MRM-MS = Flüssigchromatographie-Multiple Reaction Monitoring-MS (LC-MRM-MS) ; PAP= Prostata-spezifische saure Phosphatase, TTC38 = *Tetratricopeptid repeat domain* Protein 38; GRP78 = 78 kDa *Glucose-regulated* Protein; A1BG = Alpha-1B-Glycoprotein; – = Ergebnisse liegen nicht vor; ↑ heraufreguliert; ↓ herabreguliert; → keine Deregulation; * = signifikant; # = Trend (0,1>p>0,05); keine Wertung = aufgrund der vorhandenen Datenlage keine genaue Aussage ob es hoch oder herunterreguliert vorliegt möglich.

4.6 Funktionelle Charakterisierung von TTC38 als potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

Die vielversprechenden Ergebnisse der 2D-DIGE, der Western Blots sowie der immunhistochemischen Validierung von TTC38 warfen die Frage auf, welche funktionelle Rolle dieses noch weitgehend unbekannte Protein im Prostatakarzinom hat. Daher sollte im weiteren Verlauf der Arbeit ein Zellkulturmodell zur funktionellen Charakterisierung von TTC38 geschaffen werden. Hierzu standen die beiden Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 zur Verfügung. Zunächst wurden in beiden Zelllinien Expressionsanalysen durchgeführt, um eine für die geplanten Versuche geeignete Zelllinie zu finden. In dieser Zelllinie sollte TTC38 dann entweder mittels shRNA ausgeknockt oder mittels stabilem Überexpressionsvektor überexprimiert werden. Diese so erzeugten stabilen TTC38 knockdown Transfektanden wurden dann auf ihre TTC38 Expression hin analysiert und TTC38 anschließend in Zellkulturversuchen charakterisiert. Da hier vielversprechende Ergebnisse erzielt wurden, wurden im späteren Verlauf der Arbeit auch noch TTC38 überexprimierende PC-3 Transfektanden hergestellt und charakterisiert. Die Expressionsanalysen, die Herstellung und Charakterisierung stabile TTC38 knockdown Klone sowie ein Teil der Zellkulturversuche zur Charakterisierung von TTC38 wurden von Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt. Die Charakterisierung der stabilen TTC38 Überexpressionsklone sowie ein Großteil der folgenden Zellkulturversuche mit diesen Zellen wurden von Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit

sind in den folgenden Kapiteln in jedem Bild stets zunächst die Ergebnisse der Zellen mit der niedrigeren TTC38 Expression dargestellt. Anschließend folgen die Ergebnisse der Zellen mit den hohen TTC38 Expressionen.

4.6.1 Expressionsanalysen von TTC38 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145

Die Expressionsanalyse von TTC38 wurde sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene für die beiden vorhandenen Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 durchgeführt. Als Referenz wurde die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 verwendet, für die eine starke TTC38 Expression bekannt war. Sowohl PC-3 als auch Du145 zeigten in der real-time PCR auf der mRNA Ebene eine deutliche TTC38 Expression (Abbildung 4.39), womit zunächst eine stabile TTC38 shRNA Transfektion die Methode der Wahl zur Charakterisierung von TTC38 war. Allerdings musste hierfür noch die TTC38 Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Zum Nachweis dieser wurden Western Blots angefertigt. Hierbei konnte die TTC38 Expression in der Zelllinie PC-3, nicht aber in der Zelllinie Du145 nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Zelllinie PC-3 für einen stabilen TTC38 knockdown ausgewählt.

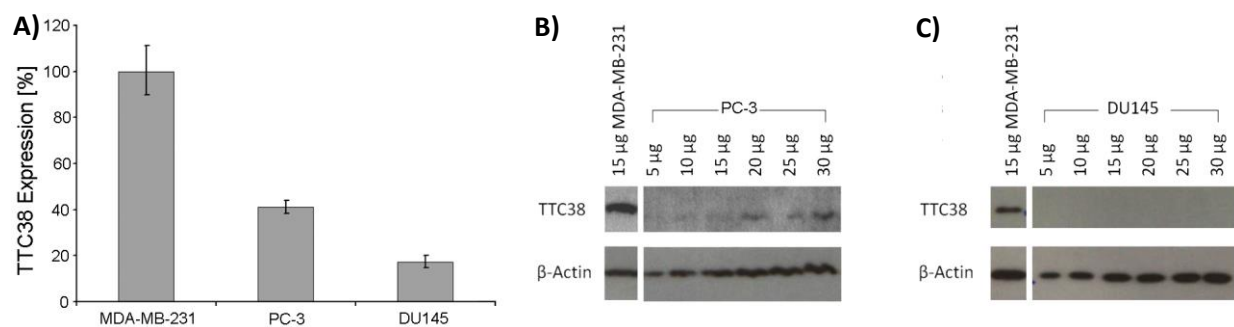


Abbildung 4.39: Expressionsanalysen von TTC38 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145. Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 dient als Referenz. **A)** mRNA Expression von TTC38 gemessen mittels real-time PCR. Sowohl die Zelllinie PC-3 als auch die Zelllinie Du145 weisen eine TTC38 mRNA-Expression auf. **B)** Western Blot Analysen der TTC38 Expression in der Zelllinie PC-3. Die Verdünnungsreihen der Gesamtproteinmengen dienen der besseren Vergleichbarkeit der TTC38 Expression. TTC38 ist in der Zelllinie PC-3 ab einer Gesamtproteinmenge von 10 µg nachweisbar. β-Actin gilt als Referenzprotein. **C)** TTC38 Western Blot Analysen in der Prostatakarzinomzelllinie Du145. TTC38 Proteinexpression ist in den aufgetragenen Gesamtproteinmengen nicht nachweisbar. Das Haushaltsprotein β-Actin dient wiederum als Referenzprotein. Verändert nach Moll (Moll, 2012).

4.6.2 Herstellung und Charakterisierung stabiler TTC38 knockdown Transfektanten der Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen von TTC38 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 legten die Herstellung stabiler knockdown Klone in der Zelllinie PC-3 als Modell zur Charakterisierung von TTC38 nahe. Nach der Amplifikation der shRNA Plasmide (SureSilencing shRNA Plasmid for Human TTC38, Qiagen, Hilden, Deutschland) in *E.coli* erfolgte die Sequenzierung dieser Plasmide. Mutationen,

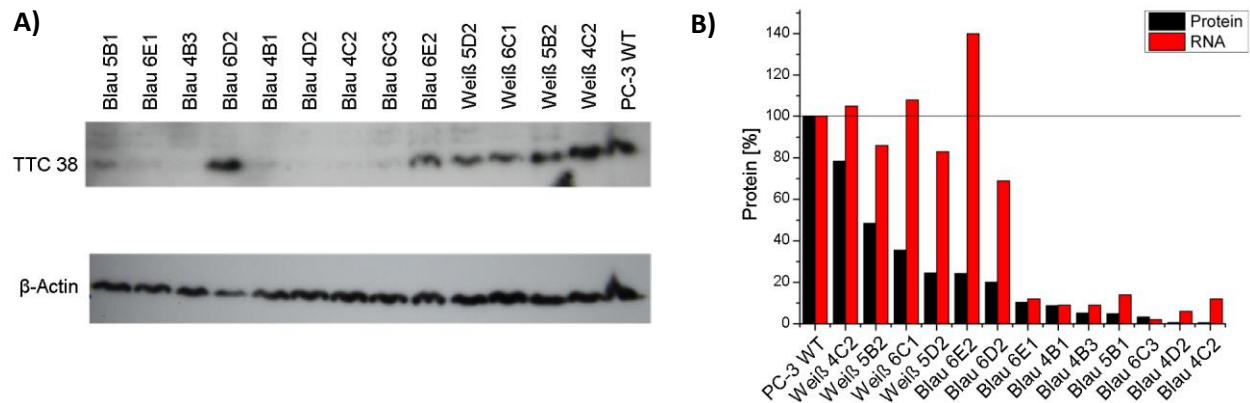


Abbildung 4.41: Western Blot Analysen ausgewählter stabiler TTC38 knockdown Transfektanten der Zelllinie PC-3. **A)** Mit Ausnahme der PC-3 Klone Blau 6D2 und Blau 6E2 weisen die dargestellten blauen Klone eine deutlich verminderte TTC38 Expression im Vergleich zu den mit einem Plasmid für scrambled shRNA transfizierten weißen Kontrollklonen auf. Das Haushaltsprotein β -Actin dient als Ladekontrolle zur Normierung der TTC38 Expression. **B)** Die Proteinexpression der ausgewählten TTC38 knockdown Klone korreliert signifikant mit der RNA-Expression von TTC38 ($p=0,005$; Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,707). Teil A verändert nach Moll (Moll, 2012).

4.6.3 Herstellung und Charakterisierung stabiler TTC38 Überexpressionstransfektanten der Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Aufgrund vielversprechender Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung der PC-3-TTC38 knockdown Klone wurden im späteren Verlauf der Arbeit noch TTC38 Überexpressionsklone der Zelllinie PC-3 hergestellt. Nach der Amplifikation der Plasmide (pCMV6-AC, OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) in *E.coli* erfolgte die Sequenzierung dieser Plasmide. Mutationen, Deletionen und Insertionen im codierenden Bereich wurden hierbei ausgeschlossen (Abbildung 7.2 im Anhang), so dass die Transfektion durchgeführt wurde. Die Charakterisierung der hergestellten Klone und die funktionellen Analysen hierzu wurden von Herrn Benedikt George im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt. Zunächst wurden die PC-3 TTC38 Transfektanten auf mRNA Ebene mittels real-time PCR charakterisiert. Wie in Abbildung 4.42 A) dargestellt, zeigten die Überexpressionsklone voll D1, voll D5, voll D6, voll D7, voll E1 und voll F1, sowie voll D eine deutliche TTC38-Überexpression. Die Kontrollklone zeigten im Vergleich zu den TTC38 Überexpressionsklonen eine deutlich geringere TTC38 mRNA Expression. Mit Expressionsleveln von 86% und 88% hatten die beiden Klone leer E9 und leer E1 die niedrigste TTC38-Expression. Auch die Western Blot Analysen bestätigen diese Ergebnisse. So ist auf Proteinebene im Western Blot eine deutliche TTC38 Überexpression in den Vollklonen detektierbar im Vergleich zu den Kontrollklonen (Abbildung 4.42).

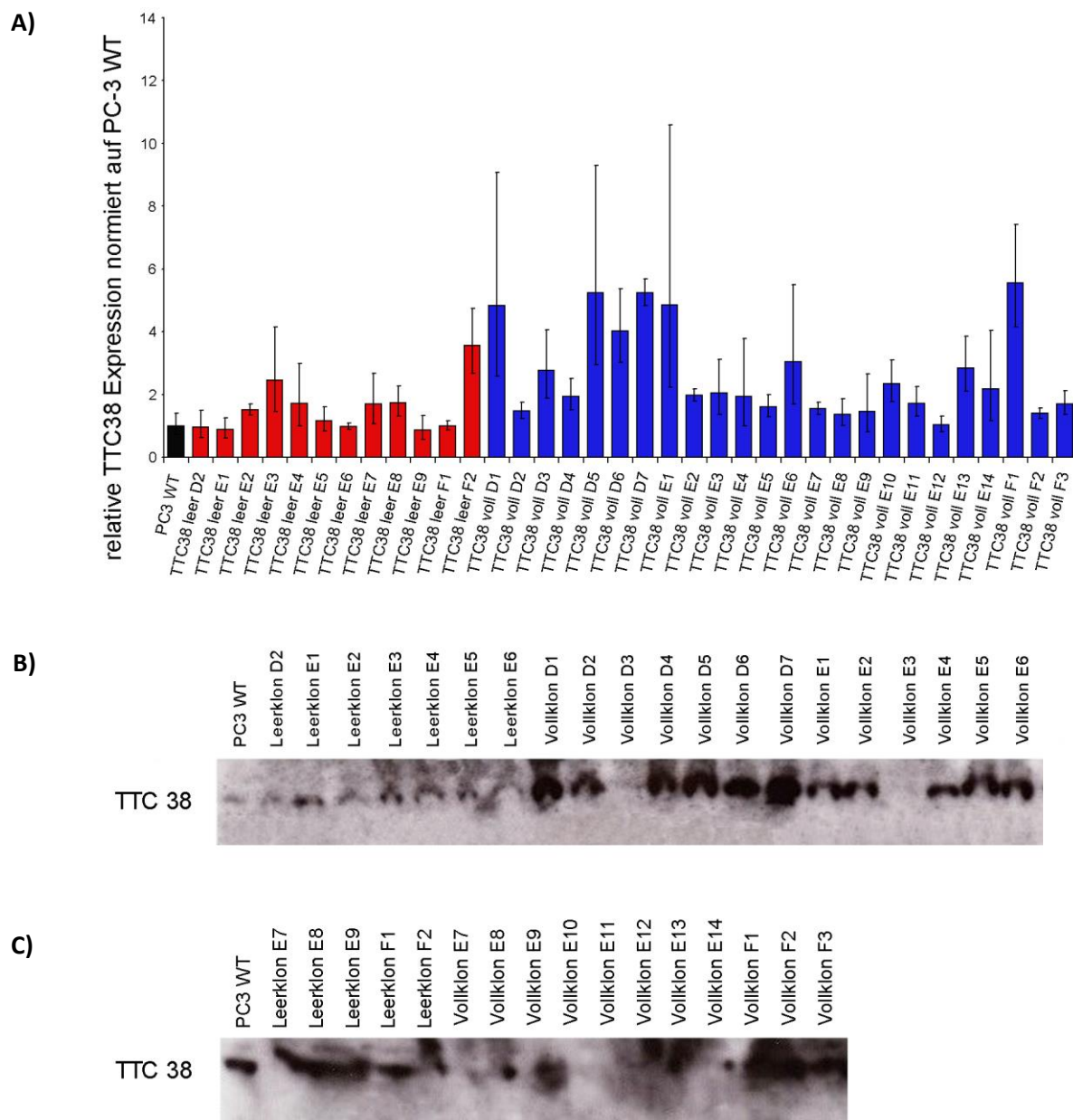


Abbildung 4.42: Charakterisierung der stabilen TTC38 Überexpressionsklone. **A)** Real-time PCR Analysen der stabilen TTC38 Überexpressionsklone. Dargestellt ist die relative TTC38 Expression als prozentuales Expressionslevel bezogen auf den PC-3 Wildtyp (entspricht 1). GAPDH fungierte als interner Standard zur Normierung der Expression (relatives Expressionslevel). 15 PC-3 TTC38-Überexpressionsklone zeigen im Bezug zum Wildtyp eine deutlich erhöhte TTC38 Expression. **B)** und **C)** Western Blot Analysen der stabilen TTC38 Überexpressionsklone. Die Überexpressionsklone ("Voll") D1, D2, D4 – D7, E1, E2, E3-E6 und F1, F2 und F3 zeigen im Western Blot auf Proteinebene eine deutliche TTC38 Überexpression im Vergleich zu den Kontrollklonen ("leer"). Verändert nach George (George, 2013).

4.6.3.1 Funktionelle *in vitro* Charakterisierung der TTC38 Transfektanten

Mit der funktionellen *in vitro* Charakterisierung von TTC38 sollte die biologische Relevanz dieses noch weitgehend unbekannten Proteins analysiert werden. Hierzu wurden an den PC-3 knockdown Klonen mit der schwächsten TTC38 Expression funktionelle *in vitro* Zellkulturassays im Vergleich zu den

Kontrollklonen durchgeführt. Anhand eines XTT-Proliferationsassays sollte der Einfluss von TTC38 auf die Proliferation der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht werden. Ein Kolonienbildungsassay (Colony formation Assay, CFA) sollte den Einfluss von TTC38 auf Wachstum und Kolonienbildungsvermögen von TTC38 klären. Weiter wurde mit einem Wundheilungs-Assay der Einfluss von TTC38 auf die Migration der Zellen analysiert, während ein Matrigel Boyden Chamber Assay den Einfluss auf die Invasionsfähigkeit der Zellen klären sollte.

4.6.3.2 Der Einfluss von TTC38 auf die Proliferationsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Eine erhöhte Proliferationsrate ist eine grundlegende Eigenschaft von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg, 2011). Um erste Anhaltspunkte zu bekommen, bei welchen zellbiologischen Prozessen TTC38 möglicherweise eine Rolle spielt, wurde zunächst ein Proliferationsassay mit den stabilen TTC38 knockdown Transfektanten durchgeführt. Später wurde dieser Assay auch für die TTC38 Überexpressionstransfektanten durchgeführt. Als Proliferationsassay kam über die Dauer von 7 Tagen ein XTT-Proliferationsassay zum Einsatz. Gemessen wurde hierbei die Extinktion des zu einem orangenen Farbstoff umgesetzten XTT-Salzes. Die gemessene Extinktion spiegelt damit die Zellzahl wieder. Die am Tag 0 ausgesäte Zellzahl wurde zur Normierung genutzt und gleich „null“ gesetzt.

Die in Abbildung 4.43 dargestellten Ergebnisse für die TTC38 knockdown Klone zeigen, dass TTC38 keinen Einfluss auf die Proliferation der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 hat. Mit einem p-Wert $p=1$ ist kein signifikanter Unterschied zwischen den TTC38 knockdown Klonen und den Kontrollklonen im XTT Proliferationsassay detektierbar.

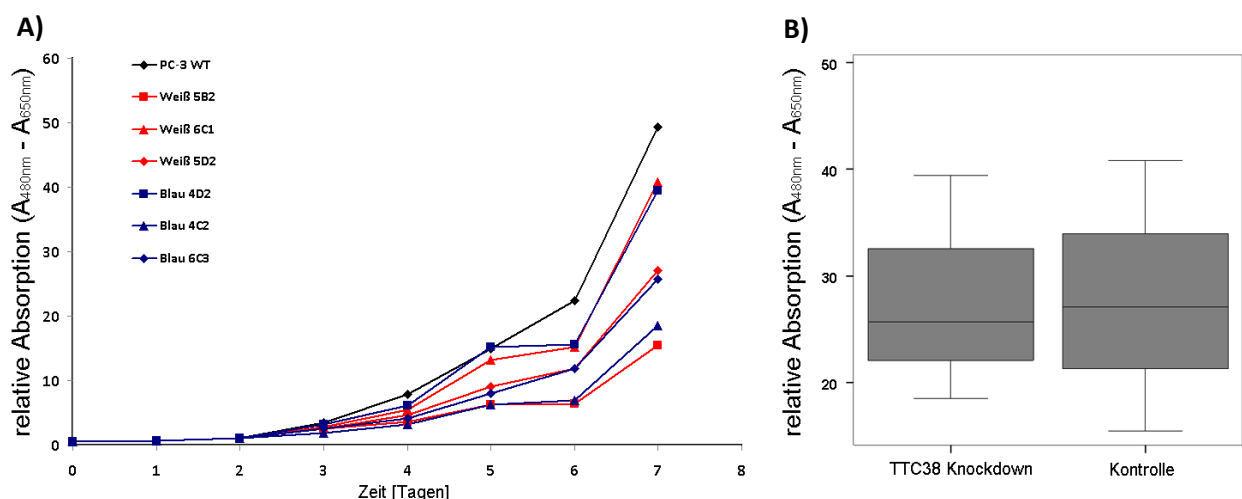


Abbildung 4.43: Repräsentative Ergebnisse des XTT-Proliferationsassays zum Vergleich der Proliferation von TTC38 knockdown Klonen und Kontrollklonen. **A)** Verlauf des XTT-Proliferationsassays über acht Tage. Dargestellt ist der Mittelwert der sechsfach Bestimmung für jeden einzelnen Klon. Ein Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen TTC38 knockdown und Kontrollklonen ist nicht erkennbar. **B)** Boxplot der an Tag sieben gemessenen normierten Extinktionswerte des XTT-Proliferationsassays. Der Boxplot bestätigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen TTC38 knockdown Klonen und Kontrollklonen vorhanden ist ($p=1$). Verändert nach Moll (Moll, 2012).

Auch zwei weitere, unabhängige Wiederholungsversuche des XTT-Proliferationsassay bestätigten dieses Ergebnis (Daten nicht gezeigt). In den Wiederholungsversuchen kamen zusätzlich zu den blauen TTC38 knockdown Klonen Klone zum Einsatz, die mit dem grünen shRNA Plasmid transfiziert wurden. Auch hier ist ein Einfluss von TTC38 auf die Proliferation der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Auch bei den TTC38 Überexpressionsklonen ist im XTT-Proliferationsassay kein Unterschied in der Proliferation der Überexpressionsklone im Vergleich zur Proliferation der Kontrollklone detektierbar (Abbildung 4.44).

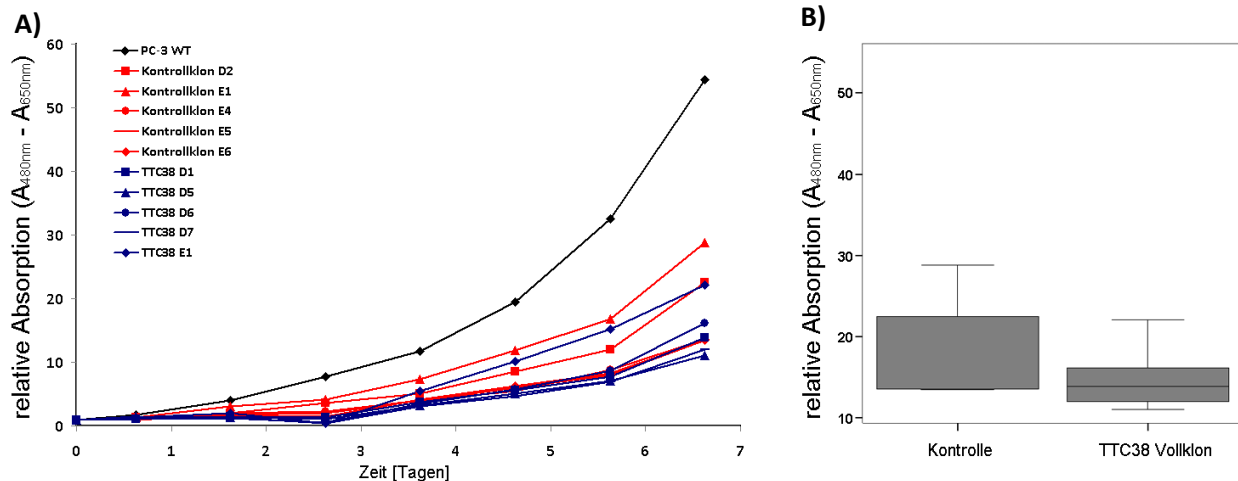


Abbildung 4.44: Repräsentative Ergebnisse des XTT-Proliferationsassays zum Vergleich der Proliferation von TTC38 Überexpressionsklonen und PC-3 Kontrollklonen. **A)** Verlauf des XTT-Proliferationsassays über acht Tage. Dargestellt ist der Mittelwert der sechsfach Bestimmung für jeden einzelnen Klon (fünf Kontrollklone leer D2, leer E1, leer E4, leer E5 und leer E6 und fünf Überexpressionsklone voll D1, voll D5, voll D6, voll D7 und voll E1). Ein Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen TTC38 Überexpressionsklonen und Kontrollklonen ist nicht erkennbar. **B)** Boxplot der am Tag acht gemessenen normierten Extinktionswerte des XTT-Proliferationsassays. Der Boxplot bestätigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen TTC38 Überexpressionsklonen und Kontrollklonen vorhanden ist ($p=1$). Es wurden jeweils Sechsfachbestimmungen durchgeführt. Verändert nach George (George, 2013).

4.6.3.3 Der Einfluss von TTC38 auf das Kolonienbildungsvermögen der Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Um neben dem Proliferationsverhalten Aufschluss über den Einfluss von TTC38 auf das Kolonienbildungsvermögen und die Morphologie der gebildeten Kolonien zu erhalten, wurde ein Kolonienbildungsassay (Colony Formation Assay, CFA) durchgeführt. Bei diesem Assay spielt zusätzlich zur Proliferation auch die Interaktion der Zellen untereinander eine Rolle sowie die Fähigkeit einer einzelnen Zelle eine neue Kolonie zu bilden. Im Vergleich zum XTT-Proliferationsassay wird die Proliferation beim CFA über einen längeren Zeitraum als beim XTT-Assay beobachtet.

Bei diesem Assay wurden 500 bzw. 1.000 Zellen der PC-3 TTC38 knockdown Klone sowie der Kontrollklone in sechs-Well Schalen ausgesät und für 12 bzw. 14 Tage inkubiert. Auch von den TTC38 Überexpressionsklonen und den entsprechenden Kontrollklonen wurden 500 bzw. 1.000 Zellen in 6-well Schalen ausgesät und für 12 bzw. 14 Tage inkubiert. Nach einer Fixierung und Färbung der Zellen mit einer kristallviolettenthaltigen Färbelösung erfolgte die densitometrische Auswertung. Die TTC38

knockdown Klone zeigten keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten im Vergleich zu den Kontrollklonen ($p=0,2510$ bei 500 Zellen/Well und $p=0,2893$ bei 1.000 Zellen/Well). Allerdings zeigten die TTC38 knockdown Klone eine Tendenz zum langsameren Wachstum im Vergleich zu den Kontrollklonen (Abbildung 4.45). Wiederholungsversuche mit den blauen TTC38 knockdown Klonen wurden ebenso durchgeführt wie Wiederholungsversuche mit den grünen TTC38 knockdown Klonen. Alle Wiederholungen bestätigen das hier dargestellte Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

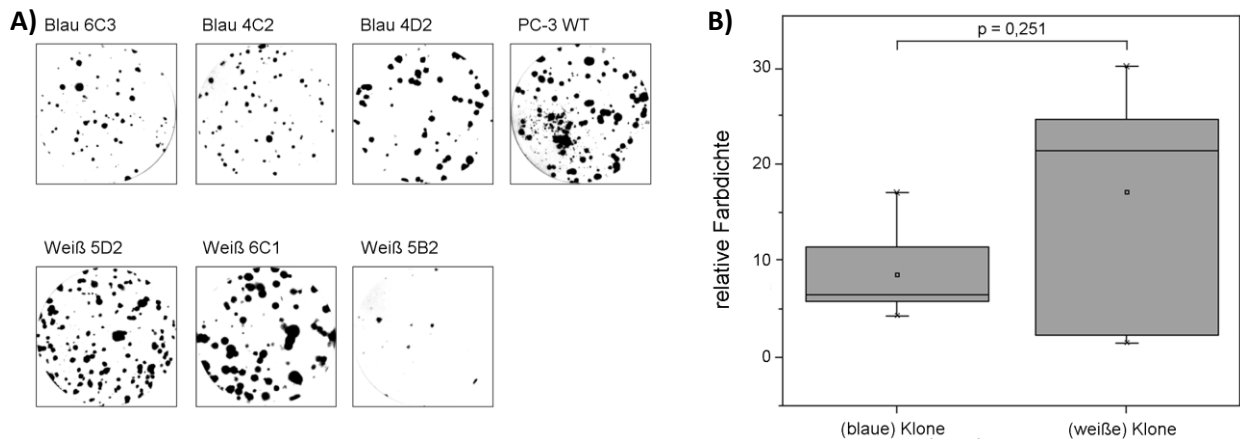


Abbildung 4.45: Repräsentative Ergebnisse des Kolonienbildungsassays (CFA) zum Vergleich des Kolonienbildungsvermögens und der Proliferation von TTC38 knockdown Klonen und Kontrollklonen. **A)** Dargestellt ist je ein Well des Dreifachansatzes jedes Klon des 500 Zellen/Well Ansatzes nach 14-tägiger Inkubation und Färbung mit Kristallviolett. **B)** Boxplot der densitometrischen Auswertung des CFA nach 14-tägiger Inkubation und anschließender Färbung mit Kristallviolett. Pro Plot sind die Werte von drei Klonen von jeweils dreifachen Ansätzen eingeflossen. Die TTC38 Knockdownklone zeigen eine Tendenz zum langsameren Wachstum im Vergleich zu den Kontrollklonen ($p=0,2510$). Verändert nach Moll (Moll, 2012).

Im CFA der TTC38 Überexpressionsklone zeigten diese einen Trend zur stärkeren Proliferation im Vergleich zu den Kontrollklonen ($p=0,073$, Abbildung 4.46).

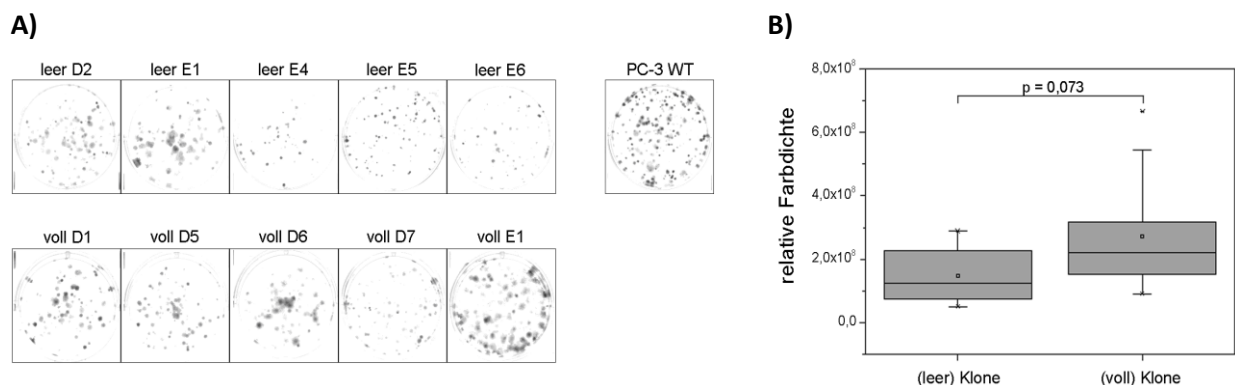


Abbildung 4.46: Repräsentative Ergebnisse des Kolonienbildungsassays (CFA) zum Vergleich des Kolonienbildungsvermögens und der Proliferation von TTC38 Überexpressionsklonen und Kontrollklonen. **A)** Dargestellt ist je ein Well des Dreifachansatzes jedes Klon des 500 Zellen/Well Ansatzes nach 14-tägiger Inkubation und Färbung mit Kristallviolett. **B)** Boxplot der densitometrischen Auswertung des CFA nach 14-tägiger Inkubation und anschließender Färbung mit Kristallviolett. Pro Plot sind die Werte von jeweils dreifach Ansätzen von jedem Klon eingeflossen. Der Boxplot bestätigt, dass die Überexpressionsklone einen Trend zum schnelleren Wachstum zeigen als die Kontrollklone ($p=0,073$). Verändert nach George (George, 2013).

4.6.3.4 Der Einfluss von TTC38 auf die Migrationsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Mit einem sogenannten Wundheilungsassay (*Wound Healing Assay* oder *Scratch Assay*) sollte der Einfluss von TTC38 auf das Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 analysiert werden. Hierzu wurden knockdown und Kontrollklone bzw. im späteren Verlauf der Arbeit auch TTC38 Überexpressionsklone und zugehörige Kontrollklone jeweils im dreifach Ansatz ausgesät. Bei einer Konfluenz von 100% wurde durch den Zellrasen eine „Wunde“ („*Scratch*“) gezogen, dessen Zuwachsen beobachtet und alle drei Stunden fotografisch festgehalten wurde. Die TTC38 Überexpressionsklone wurden in Silikoninsert ausgesät. Diese wurden bei einer Konfluenz von 100% entfernt, wodurch sich ebenfalls eine „Wunde“ im Zellrasen ergab. Das Zuwachsen dieser „Wunde“ wurde alle sechs Stunden fotografisch festgehalten. Der Zeitpunkt des vollständigen Verschlusses der Wunde spiegelte dabei die Migrationsfähigkeit der Zellen wider.

Hierbei waren die TTC38 knockdown Klone im Durchschnitt zum Zeitpunkt $t=30\text{h}$ zugewachsen. Die zugehörigen Kontrollklone hingegen benötigten im Mittel 38 Stunden zum Verschließen der Wunde. Die Zeitpunkte, zu denen die „Wunde“ der einzelnen Klone zugewachsen waren, sind in Tabelle 4.10 dargestellt.

Tabelle 4.10: Zeitpunkte des Zuwachsens der TTC38 knockdown und Kontrollklone im Wundheilungsassay. Dargestellt sind die Zeiten des vollständigen Verschlusses der Wunde für jeden Klon in allen drei Replikaten.

TTC38 knockdown Klon	t1 [h]	t2 [h]	t3 [h]	Kontrollklon	t1 [h]	t2 [h]	t3 [h]
Blau 4C2	21	24	27	Weiß 5B2	39	42	42
Blau 4D2	30	33	27	Weiß 5D2	33	36	36
Blau 6C3	36	39	33	Weiß 6C2	36	42	36

Klar erkennbar zeigten die TTC38 knockdown Klone damit eine signifikant höhere Fähigkeit zur Migration als die Kontrollklone ($p=0,004$; Abbildung 4.48). Repräsentative Fotos des Zuwachsens der Wunden für die einzelnen Klone sind in Abbildung 4.47 dargestellt. Weitere Wiederholungsversuche (auch mit grünen TTC38 knockdown Klonen (Daten nicht gezeigt)) bestätigten den Trend, dass die TTC38 knockdown Klone schneller zuwachsen als die Kontrollklone. Ein signifikanter Unterschied war hier aber nicht mehr nachweisbar (MW blaue TTC38 knockdown Klone=32,5h MW Kontrollklone=37,25h; $p=0,178$ bzw. MW grüne TTC38 knockdown Klone=41h, MW Kontrollklone=47,7h; $p=0,244$ (Daten nicht gezeigt)).

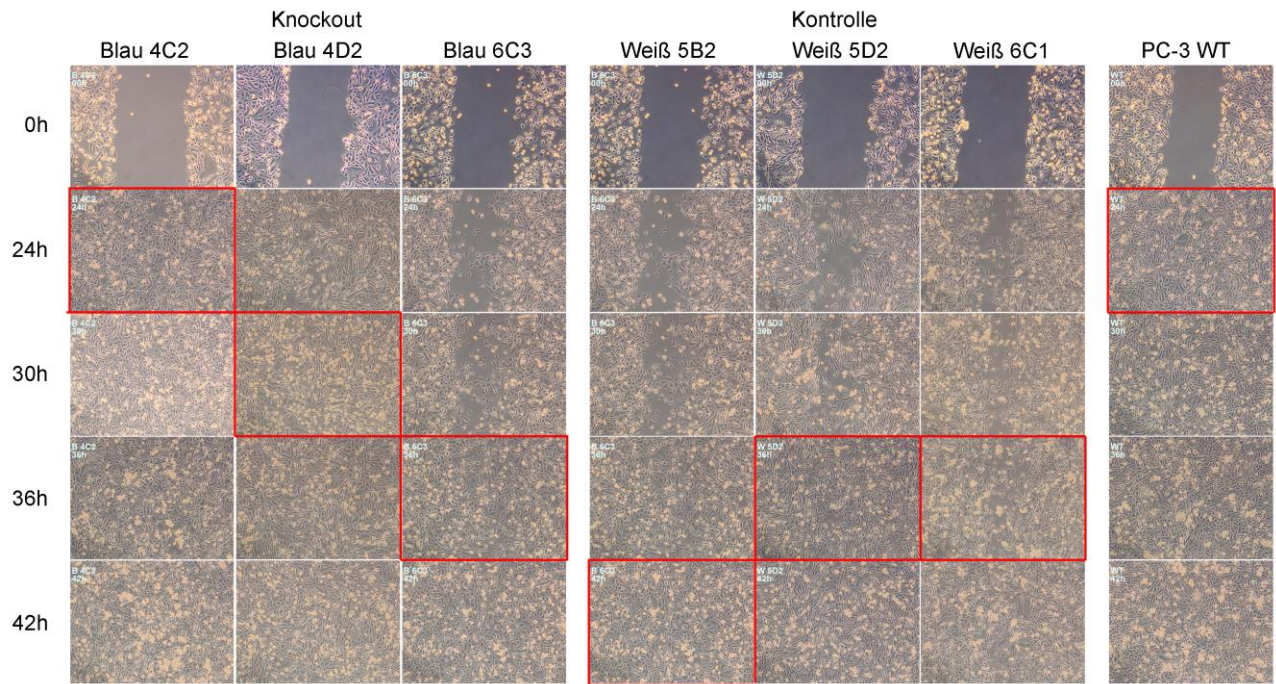


Abbildung 4.47: Repräsentative Aufnahmen des Scratch-Assays zur Analyse des Einflusses von TTC38 auf das Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzelllinie PC-3. Dargestellt ist jeweils ein beispielhafter Ansatz eines Klon. Mit roter Umrandung ist der Zeitpunkt des Zuwachsens eines Klon gekennzeichnet. Die TTC38 knockdown Klone (blau) sind zu einem früheren Zeitpunkt zugewachsen als die Kontrollklone (Weiß). Die TTC38 knockdown Klone zeigen damit eine größere Migrationsfähigkeit als die Kontrollklone (Weiß). Verändert nach Moll (Moll, 2012).

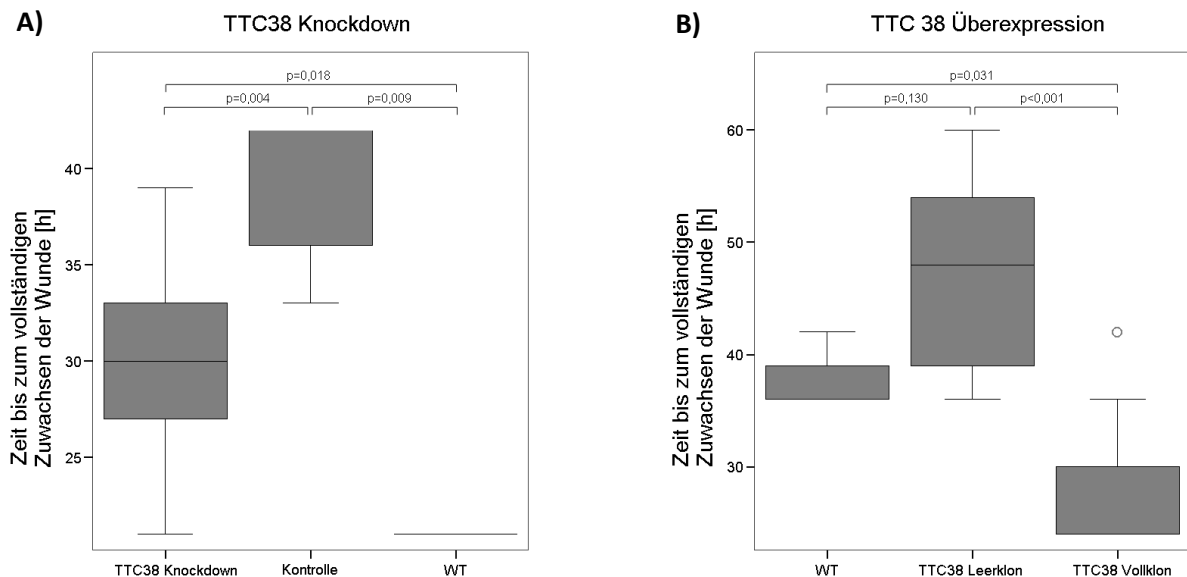


Abbildung 4.48: Boxplot der Zeitpunkte des Zuwachsens der Wunde von TTC38 knockdown Klonen (**A**) und TTC38 Überexpressionsklonen (**B**) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollklonen im Scratch-Assay. Dieser Assay dient der Analyse des Einflusses von TTC38 auf das Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzelllinie PC-3. Die TTC38 knockdown Klone (blau) sind zu einem früheren Zeitpunkt zugewachsen als die zugehörigen Kontrollklone (weiß). Dieser Unterschied ist signifikant ($p=0,004$). Allerdings wachsen auch die TTC38 Überexpressionsklone (Vollklone) zu einem signifikant früheren Zeitpunkt zu als die zugehörigen Kontrollklone (Leerkclone) ($p<0,001$).

Die TTC38 Überexpressionsklone waren im Durchschnitt zum Zeitpunkt $t=29\text{h}$ zugewachsen, während die zugehörigen Kontrollklone im Durchschnitt $46,4\text{h}$ bis zum Zuwachsen der Wunde benötigten. Die Zeitpunkte bei denen die Einzelklone zugewachsen waren, sind in Tabelle 4.11 dargestellt. Repräsentative Aufnahmen des Zuwachsens der einzelnen Klone sind in Abbildung 4.49 dargestellt.

Tabelle 4.11: Zeitpunkte des Zuwachsens der TTC38 Überexpressionsklone sowie der zugehörigen Kontrollklone im Wundheilungsassay. Dargestellt sind die Zeiten des vollständigen Verschlusses der Wunde für jeden Klon in allen drei Replikaten.

TTC38 Überexpressionsklon	t1 [h]	t2 [h]	t3 [h]	Kontrollklon	t1 [h]	t2 [h]	t3 [h]
voll D1	24	-	-	leer D2	42	36	36
voll D5	42	30	-	leer E1	42	36	36
voll D6	24	36	24	leer E4	60	60	54
voll D7	24	24	30	leer E5	54	54	42
voll E1	30	30	30	leer E6	48	48	48

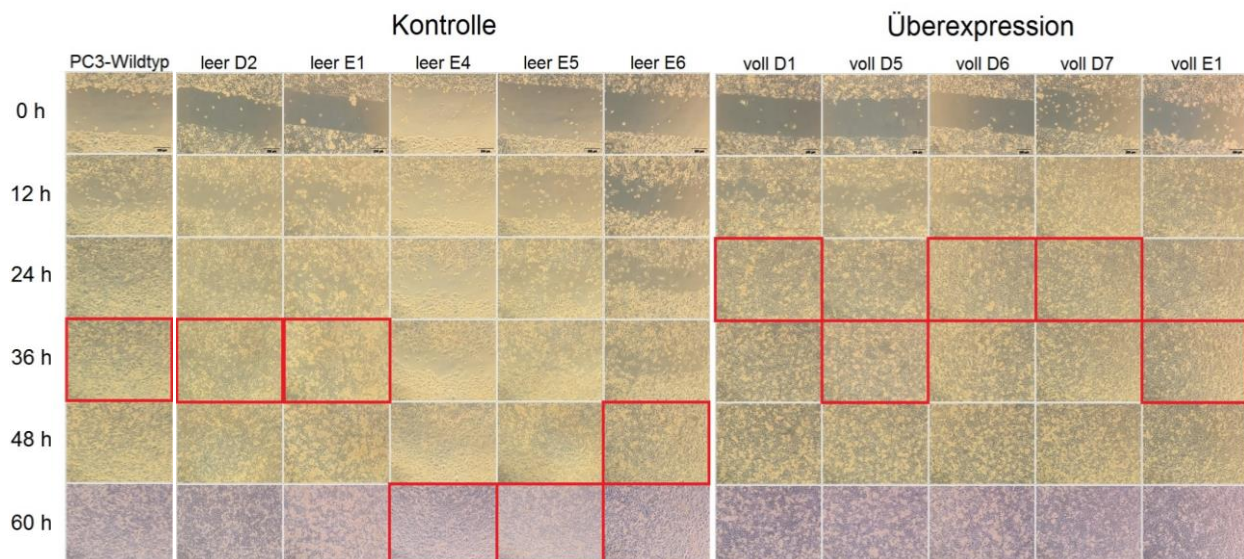


Abbildung 4.49: Repräsentative Aufnahmen des Zuwachsens der Wunden des Scratch Assays zur Analyse des Einflusses von TTC38 auf das Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzelllinie PC-3. Dargestellt ist jeweils ein beispielhafter Ansatz eines Klons. Mit roter Umrandung ist der Zeitpunkt des Zuwachsens eines Klons gekennzeichnet. Die TTC38 Überexpressionsklone (voll) sind zu einem früheren Zeitpunkt zugewachsen als die Kontrollklone (leer). Die TTC38 Überexpressionsklone zeigen damit eine größere Migrationsfähigkeit als die Kontrollklone ($p<0,001$). Verändert nach George (George, 2013).

Auch die Wiederholungsversuche des Scratch-Assays mit TTC38 Überexpressionsklonen zeigten ebenfalls ein signifikant schnelleres Zuwachsen der Vollklone (mittlere Zeit bis zum Zuwachsen $t=42,8\text{h}$) im Vergleich zu den Leerklonen (mittlere Zeit bis zum Zuwachsen $t=60\text{h}$; $p=0,010$ (Daten nicht gezeigt)).

4.6.3.5 Der Einfluss von TTC38 auf die Invasionsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3

Neben der Fähigkeit zur Migration ist die Fähigkeit zur Invasion eine Eigenheit von Karzinomzellen (Hanahan und Weinberg, 2011). Diese Fähigkeit ist es auch, die Tumorzellen die Möglichkeit bietet, Metastasen bilden zu können (Hanahan und Weinberg, 2011). Da es durch die erhöhte Migrationsfähigkeit der TTC38 Überexpressionsklone nahelegt, dass TTC38 auch einen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit von PC-3 Zellen hat, sollte dies als nächstes in einem sog. *Boyden Chamber Invasionsassay* überprüft werden. Hierbei werden die Zellen in FCS freiem Medium ausgehungert, trypsinisiert und in FCS freiem Medium oberhalb einer matrigelbeschichteten Membran mit 8 µm großen Poren in der Boyden Kammer inkubiert. Im unteren Teil der Kammer dient FCS-haltiges Medium als Chemoattractant. Die Fähigkeit der Zellen sich durch das Matrigel und die Poren hin zum FCS zu bewegen, spiegelt dabei die Invasionsfähigkeit der Zellen wieder. Dabei simulieren die nur 8µm großen Poren die Basalschicht. Diese durchbrechen zu können, ist eine nötige Fähigkeit von Tumorzellen zur Ausbildung von Metastasen.

Für die TTC38 knockdown Klone konnte im Boyden Chamber Invasionsassay kein signifikanter Unterschied der Invasionsfähigkeit zwischen den blauen TTC38 knockdown Klonen und den Kontrollklonen festgestellt werden ($p=0,157$; Abbildung 4.50). Ein Wiederholungsversuch sowie Versuche mit den grünen TTC38 knockdown Klonen bestätigten dies.

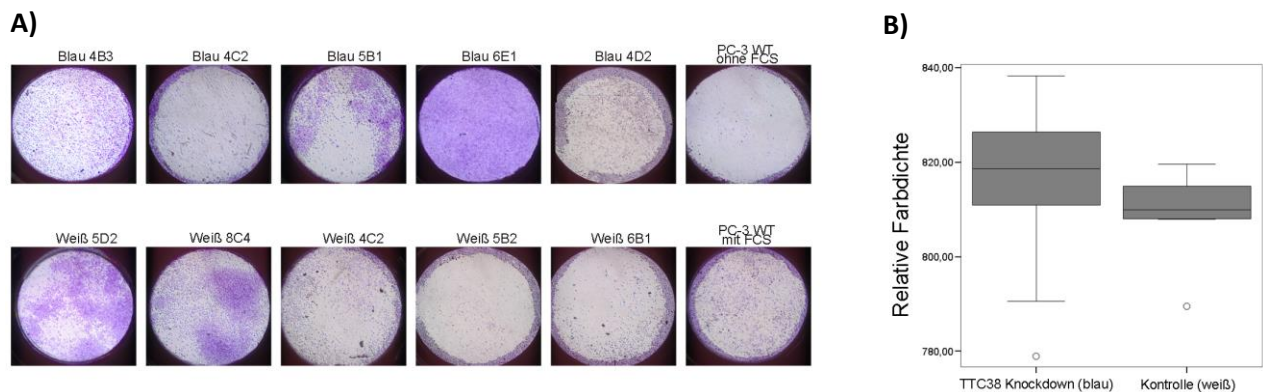


Abbildung 4.50: Repräsentative Aufnahmen des Boyden-Chamber-Invasionsassays. **A)** Dargestellt ist die Unterseite der Membran je einer Boyden-Chamber eines jeden Klons, nachdem die durch die Membran der Kammern gewachsenen Zellen fixiert und gefärbt worden sind. Die TTC38 knockdown Klone (blau) zeigen eine leichte Tendenz zur stärkeren Färbung, was einer Tendenz zum schnelleren Invadieren der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bedeutet. Die densitometrische Auswertung der Ergebnisse und die Darstellung dieser im Boxplot **(B)** zeigt allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrollklonen und TTC38 knockdown Klonen ($p=0,157$). Verändert nach Moll (Moll, 2012).

Die TTC38 Überexpressionsklone zeigten eine erhöhte Invasionsfähigkeit im Vergleich zu den Kontrollklonen. Abbildung 4.51 zeigt, dass es deutlich mehr TTC38 Überexpressionsklone geschafft haben, durch Matrigel und die Poren auf die dargestellte Unterseite der Membran der Boyden Chamber zu invadieren, als es bei den Kontrollklonen der Fall war. Eine densitometrische Auswertung des

Versuches belegte die statistische Signifikanz dieses Unterschiedes ($p=0,006$). Somit konnte im vorliegenden Assay gezeigt werden, dass TTC38 auch einen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 hat.

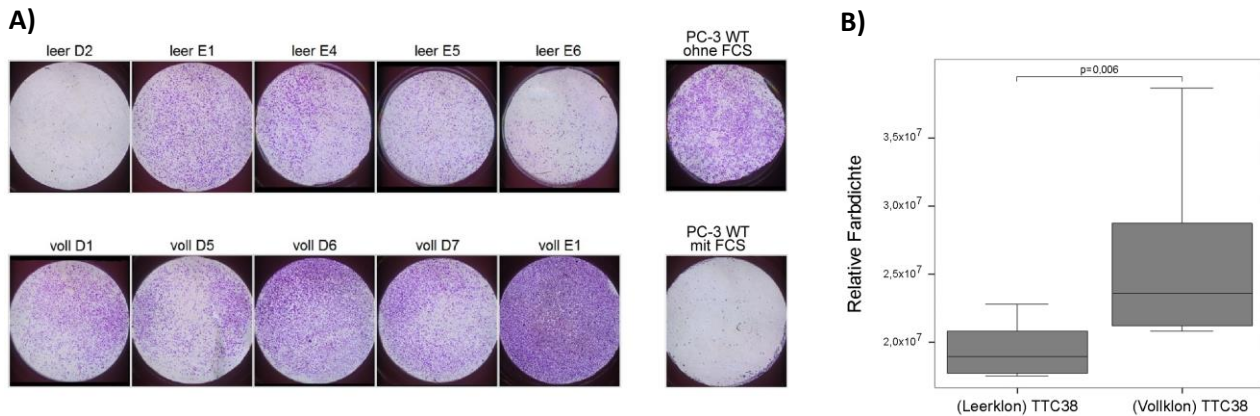


Abbildung 4.51: **A)** Boyden Chamber Invasionsassay der TTC38 Überexpressionsklone sowie der zugehörigen Kontrollklone. Es sind mehr angefärbte Zellen der TTC38 Überexpressionsklone auf der dargestellten Membranunterseite der Boyden Chamber erkennbar als bei den Kontrollklonen. **B)** Densitometrische Auswertung des Boyden Chamber Invasionsassays. Die TTC38 Überexpressionsklone zeigen signifikant mehr Zellen auf der Unterseite der Boyden Chamber als die Kontrollklone ($p=0,006$). Damit zeigen die TTC38 Überexpressionsklone eine größere Fähigkeit zur Invasion als die Kontrollklone. Verändert nach George (George, 2013).

4.6.4 TTC38 als Protein-Protein Interaktionspartner

Datenbank- und Literaturrecherchen zu TTC38 ergaben, dass TTC38 drei sogenannte TPR Domänen enthält. Jede dieser Domänen ist 34 Aminosäuren lang. Startpunkte sind die Aminosäurepositionen 108, 180 und 252 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q5R3I4>). TPR Domänen dienen der Protein-Protein Interaktion. Daher lag es nahe, bei der Suche nach der biologischen Funktion von TTC38 die Interaktionspartner dieses Proteins zu identifizieren. Kombiniert mit einer Zielproteinanalyse wurden so Hinweise zu den Signalwegen, in denen TTC38 eine Rolle spielt, erhofft.

4.6.4.1 TTC38 als Protein-Protein Interaktionspartner – Ingenuity Pathway Analysen und die experimentelle Bestätigung der theoretisch berechneten Interaktionspartner

Die Identifikation potentieller Interaktionspartner und Zielproteine von TTC38 erfolgte zunächst theoretisch mit Hilfe der Software IPA (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com). Hierbei werden auf Grundlage vorhandener Publikationen und Datenbankeinträge mögliche Interaktionspartner von der Software berechnet. Für TTC38 konnten mit IPA die vier potentiellen Interaktionspartner Thymidinkinase 1 (TK1), Prefoldin Subunit 1 (PFDN1), Hepatozyten Nuclearer Faktor 4 alpha (HNF4alpha) und Ubiquitin C (UBC) identifiziert werden (Abbildung 4.52 A). Weiterhin konnten für TTC38 Verbindungen, insbesondere zum Kolonkarzinom und zum Brustkrebs, über die Interaktionspartner,

aber auch noch zu weiteren Karzinomen (z.B. Blasen-, Lungen- und Leberkarzinomen) identifiziert werden (Abbildung 4.52 B). Auch eine erste Einordnung in Signalwege war mittels IPA bereits möglich (Abbildung 4.52 C).

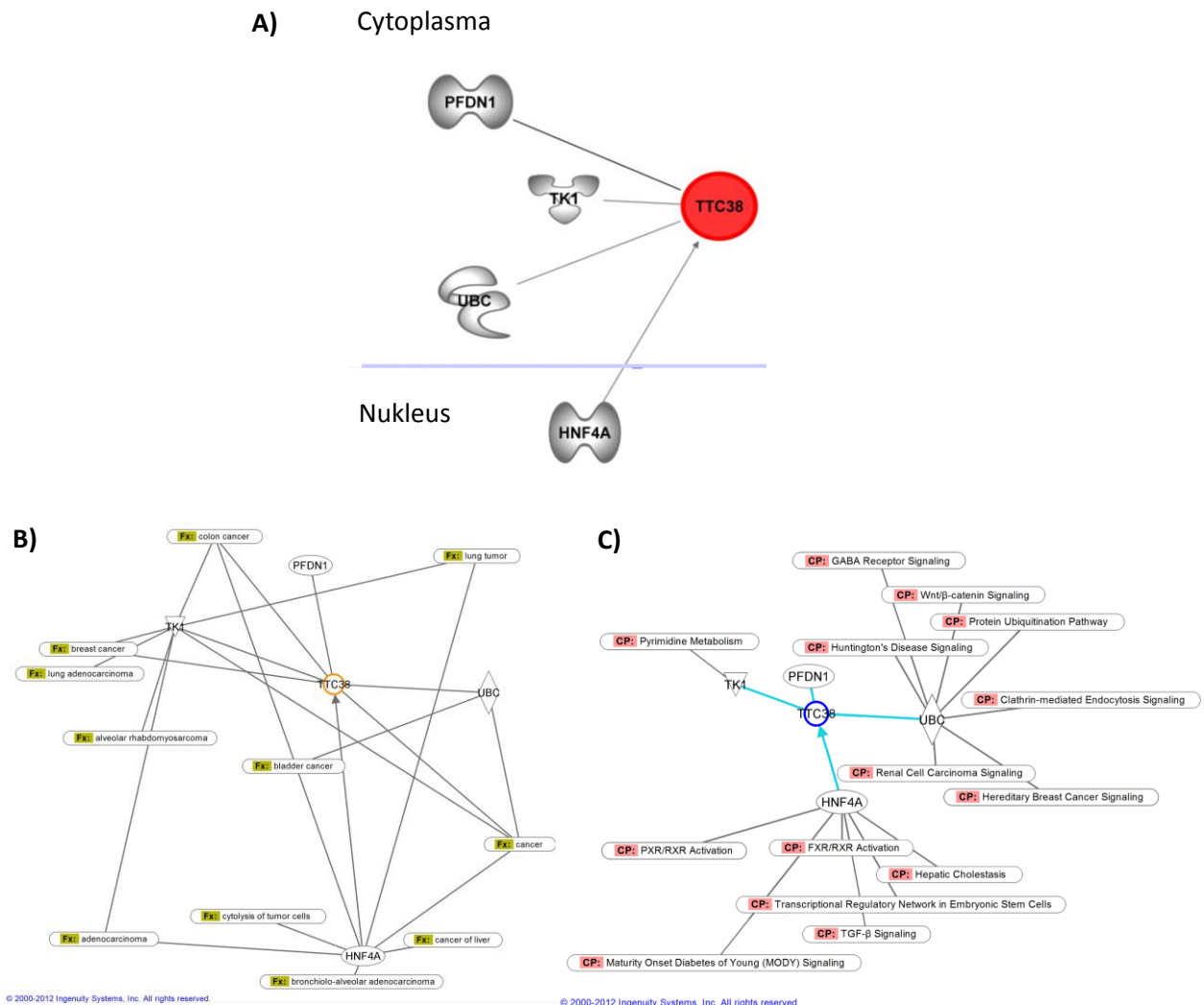


Abbildung 4.52 Mit IPA Softwareanalysen (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) ermittelte potentielle Interaktionspartner von TTC38. **A)** Laut durchgeführter Softwareberechnungen besteht insbesondere eine Interaktion von TTC38 zu den Proteinen Thymidinkinase 1 (TK1), Prefoldin Subunit 1 (PFDN1), Hepatozyten Nuclearer Faktor 4 alpha (HNF4alpha) und Ubiquitin C (UBC). **B)** Die IPA Softwareanalysen legen auch eine Rolle von TTC38 in verschiedenen Karzinomen nahe. So scheint TTC38 insbesondere im Brust- und Kolonkarzinom eine Rolle zu spielen. TTC38 ist aber über seine potentiellen Interaktionspartner auch mit anderen Karzinomen assoziiert. **C)** Potentielle Signalwege, in denen TTC38 eine Rolle spielt: TTC38 ist über seine Interaktionspartner mit verschiedenen Signalwegen, die bekannterweise auch im Krebs eine Rolle spielen, assoziiert. Zu diesen Signalwegen zählen u.a. der wnt/beta-Catenin Signalweg, der Hereditary breast cancer Signalweg, PXR/RXR Aktivierung, TGF-beta Signalweg und der *Renal Cell Carcinoma* Signalweg.

Um diese theoretischen Interaktionspartner experimentell zu belegen, sollten Immunpräzipitationsversuche durchgeführt werden. Diese konnten bis zum Ende dieser Arbeit allerdings nicht erfolgreich etabliert werden. Daher wurden alternativ Western Blots mit Proteinlysaten der stabilen TTC38 knockdown Klone und der stabilen TTC38 Überexpressionsklone durchgeführt

(Abbildung 4.53), um mögliche Koregulationen der potentiellen Interaktionspartner mit TTC38 aufzudecken. Hierbei war TK1 in TTC38 Überexpressionsklonen stärker exprimiert als in den zugehörigen Kontrollklonen. Allerdings war TK1 auch in den TTC38-knockdown Klonen stärker exprimiert als in den zugehörigen Kontrollklonen. Eine Deregulation von TTC38 scheint folglich auch zu einer Deregulation von TK1 zu führen. Im Gegensatz scheint PDFN1 in den verschiedenen Klonen nicht reguliert vorzuliegen und auch für UBC war keine klare Koregulation mit TTC38 nachweisbar. Für HNF4alpha waren Western Blot Analysen nicht möglich.

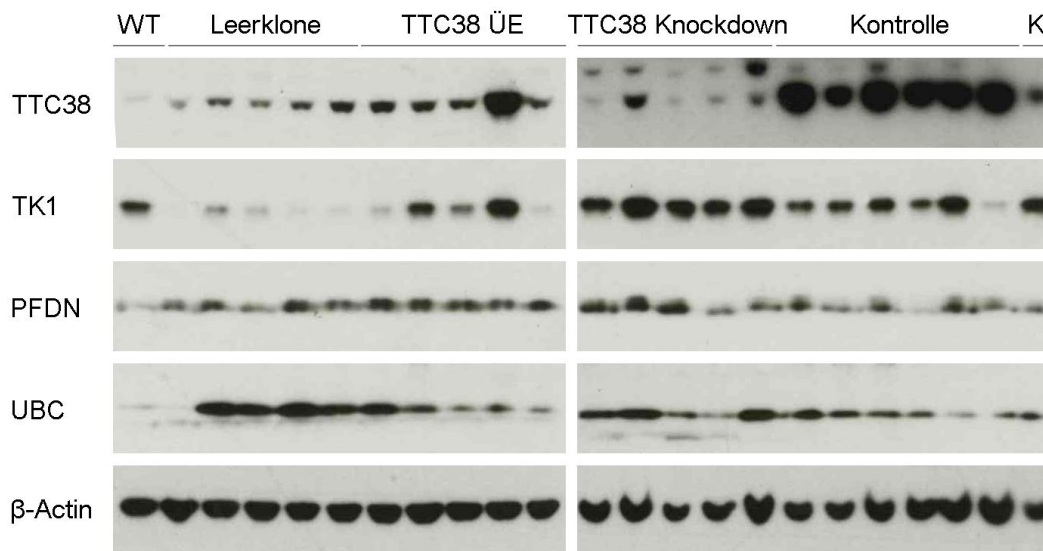


Abbildung 4.53: Western Blot der potentiellen TTC38-Interaktionspartner TK1, PDFN1 und UBC. Dargestellt ist außerdem die TTC38 Expression der Klone sowie β-Actin als Haushaltsprotein. TK1 ist in den TTC38-knockdown Klonen aber auch in den TTC38-Überexpressionsklonen stärker exprimiert als in den jeweils zugehörigen Kontrollklonen. Eine eindeutige Deregulation von PDFN1 und UBC ist nicht nachweisbar.

4.6.4.2 TTC38 als Protein-Protein Interaktionspartner – Identifikation neuer potentieller Zielproteine von TTC38

Neben potentiellen Interaktionspartnern können auch Zielproteine wichtige Hinweise darauf liefern, welche biologische Funktion ein Protein erfüllt und an welchen Funktionen und Stoffwechselaktivitäten ein Protein in der Zelle beteiligt ist. Daher wurden für TTC38 Zielproteinanalysen an den PC-3 TTC38 knockdown- und Überexpressionsklonen mittels LC-MS durchgeführt. Hierzu wurden Proteinlysate von acht knockdown Klonen (vier blaue knockdown Klone 6C3, 4C2, 4D2 und 4B3 und vier grüne knockdown Klone 4C2, 5C1, 6D1 und 5B3) und vier zugehörigen Kontrollklonen (Weiß 4C2, 5D2, 6B1 und 8C4) sowie vier Überexpressionsklonen (D1, D5, D7 und E1) und vier zugehörigen Kontrollklonen (E1, E5, E6 und D2) miteinander verglichen. Zwischen den einzelnen Klongruppen mindestens zweifach deregulierte Proteinen (maximaler *fold-change* >2), deren Expression signifikant mit der Expression von TTC38 korreliert (Korrelationskoeffizient > 0,5), stellen dabei potentielle Zielproteine von TTC38 dar. So wurden

mittels LC-MS 56 deregulierte und mit TTC38 korrelierende Proteine identifiziert (siehe Tabelle 4.12). Tabellen mit den detaillierten Ergebnissen zur Identifikation und zur Korrelation der Proteine findet sich im Anhang (Tabelle 7.23 und Tabelle 7.24 im Anhang).

Tabelle 4.12: Deregulierte Proteine zwischen TTC38 knockdown- und TTC38 Überexpressionsklonen, detektiert und identifiziert mittels LC-MS

Accession Nr.	Proteinname	Korrelations -koeffizient	Max. fold change
Q5R3I4	Tetratricopeptide repeat protein 38	1	
B4DRN7	C2 domain-containing protein 5	0,692	10,11
O75787	Renin receptor	0,732	9,08
P35251	Replication factor C subunit 1	0,645	8,63
Q5C9Z4	Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1	0,523	6,18
Q12789	General transcription factor 3C polypeptide 1	0,634	5,87
E9PFK5	Nucleolar protein 14	0,531	5,66
Q92581	Sodium/hydrogen exchanger 6	0,674	4,73
Q9P270	SLAIN motif-containing protein 2	0,552	4,63
O94761	ATP-dependent DNA helicase Q4	0,677	4,29
Q14692	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	0,608	4,23
H0YCE8	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog (Fragment)	0,512	4,22
Q3KQU3	MAP7 domain-containing protein 1	0,562	4,13
Q9NTI5	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	0,606	3,96
O14981	TATA-binding protein-associated factor 172	0,601	3,92
Q9Y2L1	Exosome complex exonuclease RRP44	0,623	3,70
Q8NDT2	Putative RNA-binding protein 15B	0,579	3,44
F8WEZ4	Tetratricopeptide repeat protein 26	0,520	3,33
Q8IWV7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR1	0,519	3,29
F5GX05	Band 4.1-like protein 3	0,521	3,29
Q9UIX5	Anaphase-promoting complex subunit 4	0,620	3,28
Q13751	Laminin subunit beta-3	0,651	3,24
Q8NI27	THO complex subunit 2	0,564	3,13
Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B	0,650	3,07
Q6ZXV5	Transmembrane and TPR repeat-containing protein 3	0,594	3,03
A6NIT2	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform	0,561	2,96
Q02880	DNA topoisomerase 2-beta	0,500	2,93
G3V1C4	Cell division cycle 27, isoform CRA_b	0,546	2,85
J9JIE6	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	0,545	2,82
B4DVG8	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	0,573	2,77
O60287	Nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1	0,588	2,71
O14802	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	0,504	2,69
Q9P260	LisH domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468	0,559	2,62
Q6ZRS2	Helicase SRCAP	0,525	2,49
P46934	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	0,510	2,48
O15040	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 2	0,547	2,41
P03915	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	0,503	2,41
Q9BQK8	Phosphatidate phosphatase LPIN3	0,509	2,40
Q14690	Protein RRP5 homolog	0,547	2,40
B1AN89	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	0,601	2,38
H3BSH7	Cirhin (Fragment)	0,587	2,36
Q15058	Kinesin-like protein KIF14	0,646	2,36
Q9BQG0	Myb-binding protein 1A	0,505	2,36
Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1	0,644	2,34

P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	0,559	2,25
O75165	DnaJ homolog subfamily C member 13	0,614	2,24
F5GZJ1	Condensin complex subunit 1	0,639	2,20
Q9ULH1	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	0,586	2,20
Q460N5	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	0,651	2,18
P48651	Phosphatidylserine synthase 1	0,522	2,15
Q6N021	Methylcytosine dioxygenase TET2	0,504	2,13
F5GWX5	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	0,540	2,09
P26358	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	0,704	2,08
B9ZVN9	DNA-directed RNA polymerase	0,676	2,08
P18827	Syndecan-1	0,791	2,04
Q96P70	Importin-9	0,656	2,04
O60524	Nuclear export mediator factor NEMF	0,728	2,03

Accession Nr. = Accession Nummer

Die identifizierten und dargestellten deregulierten Proteine stellen potentielle Zielproteine von TTC38 da. Sie wurden im Folgenden mittels *Ingenuity Pathwayanalysen* den verschiedenen Stoffwechselaktivitäten und Signalwegen zugeordnet. Die fünf am stärksten mit den identifizierten Proteinen assoziierten kanonischen Signalwege sind DNA Methylierungs- und transkriptions Repressions Signaling, G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation, Protein Ubiquitinylation Pathway, mitotische Rolle der Polo-Like Kinase und Phosphatidylcholine Biosynthese I. Die am stärksten mit den identifizierten Proteinen assoziierte Funktion ist die Genexpression. 17,5% der identifizierten Proteine spielen hierbei eine Rolle. Weitere 12,3% der Proteine sind mit dem Zellzyklus assoziiert und 8,8% der Proteine spielen eine Rolle bei der DNA Replikation, Rekombination und Reparatur (Abbildung 4.54). Außerdem weisen 44 der 56 identifizierten Proteine eine Assoziation zu verschiedenen Krebsarten auf (Tabelle 7.25 im Anhang). Vier dieser Proteine zeigen eine Assoziation mit dem Prostatakarzinom (CDC27, DNMT1, SRCAP, TOP2B).

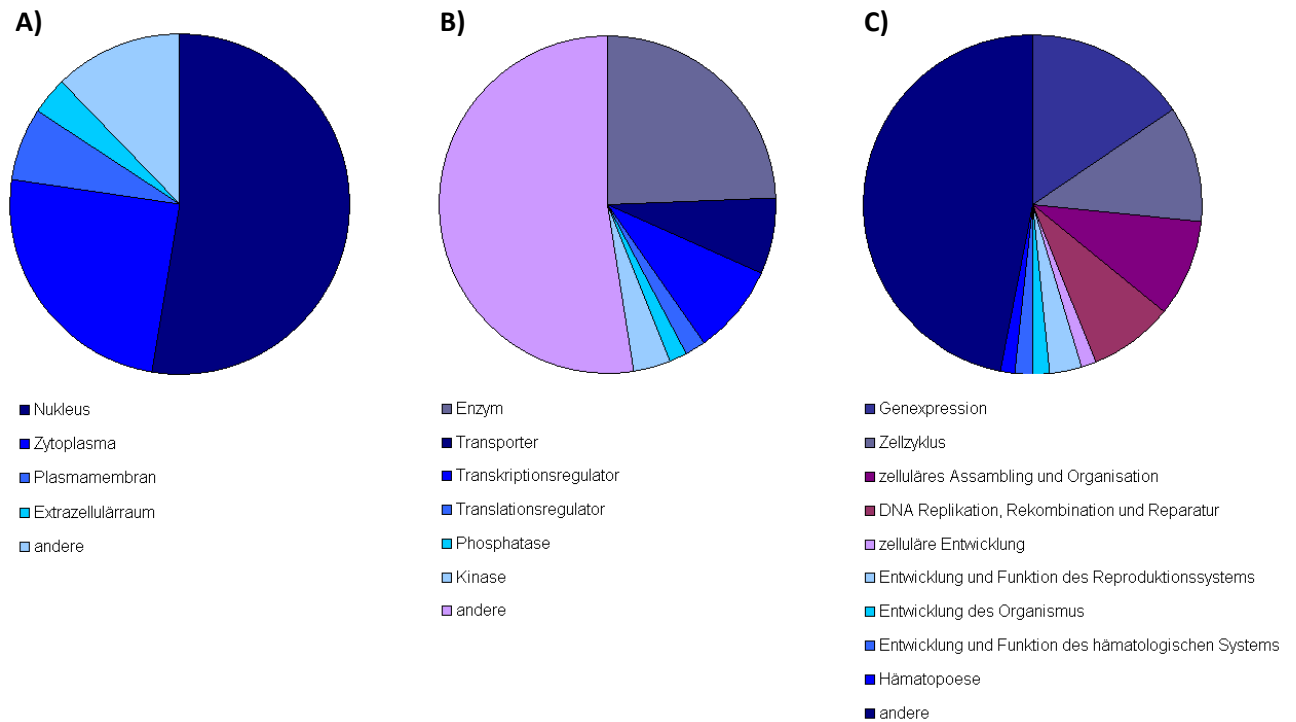


Abbildung 4.54: Ingenuity Pathway Analysen der zwischen acht knockdown Klonen (vier grünen und vier blauen knockdown Klonen) und vier zugehörigen Kontrollklonen sowie vier Überexpressionsklonen und vier zugehörige Kontrollklonen deregulierten Proteinen. **A)** Lokalisation der mittels LC-MS identifizierten Proteine. **B)** Art der identifizierten Proteine und **C)** Funktion der identifizierten Proteine. Die deregulierten und identifizierten Proteine sind vor allem mit der Genexpression, dem Zellzyklus, dem zellulären Assambling und der DNA Replikation, Rekombination und Reparatur assoziiert. Auffallend viele Proteine sind im Nukleus lokalisiert.

5 Diskussion

5.1 Vorstudien an Prostatektomieproben von sechs Prostatakarzinompatienten validieren die Proteomik als gute Möglichkeit der Biomarkeridentifikation

Bis heute fehlt es an verlässlichen Biomarkern zur Diagnose (hier insbesondere für das Screening) und Prognose des humanen Prostatakarzinoms (Kristiansen, 2012). Viele publizierte Biomarker für das humane Prostatakarzinom sind auf die *Discovery* Phase beschränkt, wobei diese potentiellen Biomarker entweder noch auf die Validierung warten oder aber sich in unabhängigen Studien nicht validieren ließen (Goo und Goodlett, 2010). Da die meisten funktionellen Informationen Krebs-assoziiierter Gene im Proteom vorhanden sind, bietet die Proteomik gute Möglichkeiten der Biomarkeridentifikation (Liang und Chan, 2007). Erst das Proteom transformiert normale Zellen in maligne Tumorzellen (Kondo, 2008). Zusätzlich sind viele von der US Food and Drug Administration (FDA) zugelassene diagnostische und prognostische Tests sowie Krebstherapien proteinbasiert. Damit sind Ergebnisse proteomischer Studien leichter in klinisch nützliche Tools umzusetzen als Ergebnisse genombasierter Studien (Ornstein und Petricoin, 2004). Die Diskordanz von mRNA und Proteinexpressionsleveln verdeutlichen weiter den Nutzen proteomischer Methoden (Kondo, 2008). Damit war die Methode der Proteomik die Methode der Wahl in der vorliegenden Studie.

Da das Krebsproteom aufgrund von Modifikationen schätzungsweise über 1,5 Mio Proteine enthält, ist es zum Auffinden der einzelnen Krankheitsrelevanten Proteine nötig, jeden einzelnen Proteinbiomarker zu separieren und zu identifizieren (Liang und Chan, 2007), auch wenn mit den derzeitigen Techniken nur ein Bruchteil der entsprechenden Proteine identifizierbar ist. Allerdings ist davon auszugehen, dass es nicht den einen Biomarker zur Detektion unterschiedlicher Krebsstadien inklusive der Prädiktion der Behandlungseffizienz geben wird, sondern Biomarker Panels für die Detektion, Prognose und Prädiktion des Prostatakarzinoms benötigt werden (Goo und Goodlett, 2010). Dies ist besonders beim Prostatakarzinom der Fall, da es sich um eine heterogene und multifaktorielle, multifokale Erkrankung handelt (Talesa et al., 2009).

Ziel dieser Arbeit war es folglich, neue potentielle Biomarker für das humane Prostatakarzinom mittels proteomischer Methoden zu identifizieren. Aufgrund der Tatsache, dass Blut eine enorme Proteinkomplexität und dynamischen Konzentrationsbereich an Proteinen aufweist, sind initiale Biomarkerstudien von Blut anstatt Gewebe bisher nicht besonders erfolgreich (Meyer und Stuhler, 2007) weshalb für die vorliegende Studie zunächst Gewebeproben analysiert wurden.

Vor der eigentlichen Studie wurde in Vorversuchen analysiert, ob die proteomische Methode der zweidimensionalen *difference in gel electrophoresis* (2D-DIGE) kombiniert mit Massenspektrometrie (MS) für die Identifikation potentieller neuer Biomarker des rezidivierenden Prostatakarzinoms geeignet ist. Hierzu wurde die 2D-DIGE an Prostatakarzinomgewebe etabliert. Dabei stellten sich 4mm²

mikordissoziiertes Prostatagewebe mit einem finalen Drüsenanteil von mind. 80% (aufgeschlossen mittels Glaskügelchen) als optimal für die Durchführung der 2D-DIGE heraus. Bei der Auswertung der sieben analysierten Patientenproben war eine Trennung der Proben mit Rezidiv von denen ohne Rezidiv mittels Hauptkomponentenanalyse (*Principal component analysis*, PCA) möglich. Zusätzlich war die Identifikation von Proteinen möglich. Unter den zehn zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteinen waren unter anderem Prostataspezifische saure Phosphatase (PAP), sowie *Heat Shock* Protein 70 kDa 1A/1B (HSPA1A) und Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1), welche in der Literatur bereits im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom erwähnt wurden (Tosoian und Loeb, 2010; Lu et al., 2010; Romanuik et al., 2009; Jung et al., 2009).

Ummanni et al. konnten bereits zeigen, dass die 2D-DIGE gekoppelt mit MS-Analysen eine vielversprechende Methode zur Identifikation potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom ist (Ummanni et al., 2011). Die vorliegende Studie zeigt außerdem, dass diese Methode auch zur Identifikation potentieller neuer Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom geeignet ist. Durch die Diskriminierung von Patienten mit und ohne Rezidiv mittels PCA sowie das Wiederfinden von Proteinen, welche bereits als Marker für das (aggressive) Prostatakarzinom diskutiert werden, konnte die 2D-DIGE kombiniert mit MS in den vorliegenden Vorversuchen als vielversprechende Methode für die Identifikation potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom validiert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Angaben der Literatur, wonach die 2D-DIGE eine robuste Methode für den quantitativen Vergleich globaler Protein-Expressionslevel zwischen verschiedenen Gewebetypen und ein leistungsstarkes Werkzeug zur Identifikation diagnostischer und prognostischer Biomarker ist (Ornstein und Petricoin, 2004). Insbesondere erlaubte die Kombination aus 2D-DIGE und MS die Identifikation potentieller neuer Biomarker zur Unterscheidung von Prostatakarzinompatienten mit hohem und niedrigem Rezidivrisiko. In folgenden Experimenten konnten dann die eigentlichen Tumorproben analysiert werden.

5.2 Identifikation potentieller neuer Biomarker für das humane Prostatakarzinom mittels 2-dimensionaler Difference in Gel Electrophoresis (2D-DIGE) und Massenspektrometrie (MS)

Ein Problem der wenigen vorhandenen Studien zur Suche von Biomarkern für die Progressionsvorhersage des Prostatakarzinoms ist die nicht ausreichende Qualität des Probenkollektives. Häufig sind die Probengruppen nicht Alter-, Stage-, oder Grade-ausgeglichen, das Gewebe nicht durch Lasermikrodissektion aufgereinigt oder keine ausreichenden Follow-up Daten vorhanden. Beispielhaft sei hier die Studie von Pang et al. genannt, in denen nicht angepasste Patientenkohorten verwendet wurden (Pang et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurden in den Studien von Gao et al. und Bismar et al. Gewebeproben von Patienten verwendet, die zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme bereits metastasiert waren (Bismar et al., 2006; Gao et al., 2010). Der Vergleich von

solchen retrospektiven Proben führt nicht zwangsweise zu Biomarkern, die bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bei nicht-metastasierten Patienten eine Aussage über die Prognose des Prostatakarzinoms treffen können. Auch Kahn et al. nutzten Proben von Patienten, die bereits metastasiert sind. Zusätzlich vergleichen sie Proben von Rezidiven/Metastasen mit Proben von Primärtumoren (Khan et al., 2010). Auch hier ist keine Aussage darüber möglich, ob die gefundenen differentiell exprimierten Proteine so früh in ihrer Expression verändert werden, dass sie sich als Prognosemarker zum Zeitpunkt der Erstdiagnose noch vor einer Prostatektomie eignen. Daher wurde in der vorliegenden Studie bei der Auswahl der Gewebeproben besonderen Wert auf ein Alter-, Tumorstadien- und Gleason score-angepasstes Patientenkollektiv gelegt. Durch die Analyse von 12 Prostatektomieproben von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv, 11 Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und 14 tumorfreien Prostatektomieproben konnten zehn potentielle neue Biomarker für die Diagnose des Prostatakarzinoms identifiziert werden. Zusätzlich konnten 32 neue potentielle prognostische Biomarker zur Unterscheidung von rezidivierenden und nicht-rezidivierenden Prostatakarzinomen zum Zeitpunkt der Diagnose identifiziert werden.

In Hauptkomponentenanalysen (Principal component analysis, PCA) der analysierten Patientenproben war dabei sowohl eine Separation zwischen Prostatakarzinomen und tumorfreien Geweben als auch eine Differenzierung von Tumoren mit und ohne Rezidiv möglich. Dies unterstreicht die Qualität der vorliegenden Studie. Mehr noch konnte in der vorliegenden Studie Prostataspezifische saure Phosphatase (PAP) und Galectin-3, als potentielle Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom identifiziert werden. Beides sind Proteine, die in der Literatur bereits als potentielle Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom diskutiert werden (Fang et al., 2008; Taira et al., 2007; Kong und Byun, 2013; Ellerhorst et al., 1999; van den Brule et al., 2000; Merseburger et al., 2008), wodurch die Qualität der vorliegenden Studie weiter untermauert wird. Zusätzlich gehören PAP und Vinculin zu den Proteinen, die bereits in den Vorversuchen identifiziert wurden, was zusätzlich die Reproduzierbarkeit der 2D-DIGE kombiniert mit MS auch bei Analysen verschiedener Patienten bestätigt.

5.3 „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der identifizierten potentiellen neuen Biomarker

Nach der erfolgreichen Identifikation von zehn potentiellen diagnostischen und 32 potentiellen prognostischen Biomarkern für das Prostatakarzinom mittels 2D-DIGE und MS wurden die identifizierten Proteine mittels *Ingenuity Pathway Analysen* (IPA) klassifiziert.

Die zehn zwischen tumorfreiem Gewebe und Tumoren deregulierten Proteine waren hauptsächlich mit zellulärer Assemblierung, zellulärer Entwicklung, Zellmorphologie, zellulärem *compromise* und Kohlenhydratmetabolismus assoziiert. Die 32 potentiellen Biomarker für rezidivierende Prostatakarzinome waren mit zellulärem Wachstum und Proliferation, zellulärer Entwicklung, zellulären Bewegungen (Invasion und Migration) sowie dem Kohlenhydratmetabolismus assoziiert.

Sowohl potentielle diagnostische als auch potentielle prognostische Biomarker sind assoziiert mit zellulärer Entwicklung, zellulärer Morphologie und dem Kohlenhydratmetabolismus. Zelluläre Assemblierung und zelluläres *compromise* sind allerdings mehr mit generellen diagnostischen Prostatakarzinombiomarkern assoziiert als mit spezifischen prognostischen Biomarkern. Im Gegensatz dazu sind im rezidivierenden Prostatakarzinom deregulierte Proteine vor allem mit zellulärer Bewegung (Invasion und Migration), zellulärem Wachstum und Proliferation assoziiert. Dies spiegelt bekannte Eigenschaften von Karzinomen wider. So ist die Aktivierung der Invasion mit entscheidend für die Metastasierung von Karzinomen (Hanahan und Weinberg, 2011), während zelluläres Wachstum und Proliferation die wohl fundamentalsten Eigenschaften von Krebszellen sind (Hanahan und Weinberg, 2011). Die vorliegende Studie zeigt, dass zelluläre Bewegung, insbesondere Invasion und Migration sowie zelluläres Wachstum und Proliferation, im rezidivierenden Prostatakarzinom eine wichtigere Rolle spielt als in der Gesamtheit aller Prostatakarzinome. Die Tatsache, dass diese Funktionen für das rezidivierende Prostatakarzinom wichtiger zu sein scheinen als für das Prostatakarzinom generell, spiegelt möglicherweise die Heterogenität dieser Erkrankung wider. Viele Prostatakarzinome sind indolent und klinisch nicht relevant aufgrund ihrer langsamen Proliferation (Johansson et al., 2004). Aufgrund dieses Phänomens scheinen Proteine, die in Proliferation und zellulärer Bewegung involviert sind, besonders geeignete Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom zu sein.

5.4 Validierung potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom

5.4.1 Ist LC-MRM-MS für die Urin- und Serumvalidierung potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom geeignet? Beispielhafte Analyse von PAP und Galectin-3, zwei bekannten potentiellen Biomarkern für das Prostatakarzinom

Heutzutage sind ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) die am meisten verwendete Technik zur Verifikation und Validierung von Biomarkern (Huttenhain et al., 2009). Allerdings können mit der ELISA-Technik keine Multiplex-Assays entwickelt werden. Außerdem ist die Verfügbarkeit der benötigten Antikörper nicht immer gegeben und die Entwicklung neuer Assays ist ausgesprochen kostenintensiv. Die Notwendigkeit von alternativen Methoden zur reproduzierbaren Proteinquantifizierung hat daher zur Entwicklung des *Multiple Reaction Monitorings* (MRM) geführt (Huttenhain et al., 2009). MRM bietet den Vorteil einer guten Selektivität und Sensitivität bei gleichzeitiger Abdeckung eines breiten Konzentrationsbereiches – alles Eigenschaften, die für die Validierung von Biomarkern entscheidend sind (Huttenhain et al., 2009). Außerdem ist mittels MRM eine Analyse von Biomarkern im Serum von Patienten möglich (Domanski et al., 2012; Percy et al., 2013).

Urin ist eine ideale Körperflüssigkeit zur Detektion von Proteinbiomarkern, da es nicht-invasiv gewonnen werden kann und sekretierte Proteine aus Prostata, Blase und Nieren enthält (Wood et al., 2013). Daher

sollte die Eignung von Flüssigchromatographie (*Liquid chromatography*)-*Multiple Reaction Monitoring*-MS (LC-MRM-MS) zur Validierung potentieller Urin- und Serumbiomarker für das Prostatakarzinom in der vorliegenden Studie getestet werden. Hierbei wurden u. a. PAP und Galectin-3 Level im Serum und Urin von Prostatakarzinompatienten bestimmt. Beide Proteine wurden in initialen 2D-DIGE und MS Analysen als potentielle Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom identifiziert und werden als solche auch in der Literatur diskutiert.

Gutman und Gutman konnten bereits 1938 nachweisen, dass prostataspezifische saure Phosphatase (PAP) in Prostatakarzinompatienten erhöht ist (Gutman und Gutman, 1938). Später wurde PAP als erster Serum-Biomarker für das Prostatakarzinom klinisch eingesetzt. Allerdings war PAP weder als Biomarker für das Ansprechen einer systemischen Therapie noch als Biomarker für ein Rezidiv sensitiv genug (Bhavsar et al., 2013). Daher wurde PAP später durch PSA als Biomarker ersetzt. In den letzten Jahren rückt PAP allerdings wieder als möglicher prognostischer Marker für intermediäre und Hoch-Risiko Prostatakarzinome in den Fokus des Interesses (Taira et al., 2007; Kong und Byun, 2013). So konnten Fang et al. zeigen, dass PAP das Überleben von Hoch-Risiko Prostatakarzinompatienten nach einer Behandlung besser vorhersagen konnte als PSA und der Gleason Score (Fang et al., 2008).

Überraschenderweise ist über die Relevanz von PAP als potentielltem Biomarker im Urin von Prostatakarzinompatienten wenig bekannt. 1991 publizierten Bogdanowicz et al. eine Studie, die die PAP und PSA Level im Urin von Prostatakarzinompatienten verglichen hat. Hierbei konnten sie zeigen, dass sowohl PAP als auch PSA Level im Urin in fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms ansteigen. So war PAP in 35% aller Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom erhöht. In Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom wiesen sogar 77% aller Patienten erhöhte PAP-Werte auf (Bogdanowicz et al., 1991). In der vorliegenden Studie wurde PAP in initialen 2D-DIGE und MS Experimenten als heraufreguliert in Prostatakarzinomen mit Rezidiv im Vergleich zu Karzinomen ohne spätere Rezidiventwicklung identifiziert. In den vorliegenden LC-MRM-MS Studien konnte PAP im Serum von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv allerdings nicht nachgewiesen werden. Hier sind weitere Entwicklungen der LC-MRM-MS Technologie, ggf. eine Vorfraktionierung des Serums sowie der Einsatz besserer Peptide nötig, um die Serumlevel von PAP mittels LC-MRM-MS in Zukunft analysieren zu können.

Im Gegensatz zu den Serumanalysen konnte PAP im Urin von Prostatakarzinompatienten nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine signifikant höhere PAP Konzentration im Urin von Patienten mit Rezidiv im Vergleich zum Urin von Patienten ohne Rezidiv und den Kontrollurinen. Damit bestätigen die vorliegenden LC-MRM-MS Analysen die Literaturdaten, wonach PAP ein möglicher Marker für Prostatakarzinompatienten mit hohem Rezidivrisiko ist. Die Zulassung von Sipuleucel T (Provenge), einem Krebsvaccine, welches eine Immunantwort gegen PAP hervorruft, weist ebenfalls auf die bedeutende Rolle von PAP im Prostatakarzinom hin. Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen damit

die Theorie, dass PAP ein möglicher prognostischer Biomarker für das Prostatakarzinom ist. Mehr noch legen die vorliegenden Ergebnisse der LC-MRM-MS Studien nahe, dass PAP auch als nicht-invasiver prognostischer Urinbiomarker zur Identifikation von Prostatakarzinomen, welche im späteren Verlauf der Erkrankung rezidivieren werden, eingesetzt werden kann. Da die in dieser Studie mittels LC-MRM-MS analysierte Patientenkohorte nur sehr klein war, sollte PAP in Zukunft an einem großen Patientenkollektiv weiter als vielversprechender nicht-invasiver Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom validiert werden.

In den durchgeführten, initialen 2D-DIGE und MS Experimenten konnten nicht nur PAP und andere Proteine als potentielle Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom identifiziert werden, sondern auch Galectin-3. Galectin-3 ist ein β -Galactosid Bindeprotein, welches in Tumorphiliferation, Angiogenese und Apoptose involviert ist (Califice et al., 2004). Außerdem ist Galectin-3 ein Substrat für PSA und wird durch dieses gespalten (Saraswati et al., 2011). Ähnlich wie PAP wird auch Galectin-3 in der Literatur als potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom diskutiert. So ist Galectin-3 in primären Prostatakarzinomen sowie metastasierten Prostatakarzinomen signifikant herabreguliert im Vergleich zu normalem und premalignem Prostatagewebe (Ellerhorst et al., 1999). Während normale Prostatadrüsen eine moderate Galectin-3 Expression in Nukleus und Zytoplasma der Zellen aufweisen, wird Galectin-3 in Prostatakarzinomzellen kaum oder gar nicht exprimiert (van den Brule et al., 2000; Ahmed et al., 2009). Im Falle, dass eine leichte Galectin-3 Expression in Prostatakarzinomzellen vorliegt, ist diese nur im Zytoplasma, nicht aber im Zellkern detektierbar (van den Brule et al., 2000; Ahmed et al., 2009). Immunhistochemische Analysen der Galectin-3 Expression zeigen, dass Galectin-3 während der Progression des Prostatakarzinoms gespalten wird (Wang et al., 2009). Außerdem zeigten univariate Analysen, dass die zytoplasmatische Galectin-3 Expression mit PSA-Rezidiven assoziiert ist (van den Brule et al., 2000). Darüber hinaus zeigten multivariate Analysen, dass Galectin-3 nach Gleason Score und pathologischem Stadium ein unabhängiger Prediktor für ein PSA Rezidiv ist (van den Brule et al., 2000). Demnach zeigt Galectin-3 Anti-Tumoraktivität, wenn es im Nukleus exprimiert wird, fördert aber die Tumorphiliferation bei zytoplasmatischer Expression (van den Brule et al., 2000; Califice et al., 2004). Mehr noch zeigen Hormon-refraktäre Tumore eine niedriger Galectin-3 Expression als Hormon-sensitive Tumore (Merseburger et al., 2008). Interessanterweise ist Galectin-3 außerdem im Serum von Prostatakarzinompatienten herunterreguliert im Vergleich zum Serum von gesunden Kontrollpatienten (de Melo-Junior et al., 2010). Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden LC-MRM-MS-Urinstudie wider, in der Galectin-3 als herabreguliert im Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv im Vergleich zu Urin von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv gefunden wurde. Damit konnte eine Herabregulation der Galectin-3 Level im Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv im Vergleich zu Urin von Patienten ohne Rezidiv erstmals nachgewiesen werden. Die einzige bis dato publizierte Studie bezüglich Galectin-3 im Urin analysierte

die Galectin-3 Promotormethylierung in Kombination mit Glutathion S-Transferase pi 1 (GSTP1) Promotormethylierung. Hierbei konnte eine Promotormethylierung von Galectin-3 in 22 von 22 analysierten Patientenurinen nachgewiesen werden (Ahmed, 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden LC-MRM-MS Studie zeigen, dass Galectin-3 Expression im Urin ein vielversprechender Biomarker zur Vorhersage einer möglichen Progression des Prostatakarzinoms ist.

Die mit Erfolg durchgeführte Validierung von PAP und Galectin-3 als potentielle Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom bestätigt auch, dass LC-MRM-MS eine vielversprechende Methode zur Quantifizierung potentieller Biomarker in Serum und Urin von Prostatakarzinompatienten ist. Mit fortschreitender Entwicklung der LC-MRM-MS-Methode und der benötigten Technologie hoffen Percy et al. auf die FDA (*Food and Drug Administration*) Zulassung von MS-basierten Methoden für die klinische Anwendung (Percy et al., 2013). Schon heute sind Multiplex-LC-MRM-MS Assays zu Quantifizierung von Biomarkern für kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs im humanen Plasma entwickelt worden (Domanski et al., 2012; Percy et al., 2013). Die entwickelten Assays erfüllen sämtliche Kriterien zur prä-klinischen Evaluierung potentieller Biomarker. Auch im Serum von Prostatakarzinomen konnten mittels LC-MRM-MS bereits Biomarkersignaturen, bestehend aus den Proteinen Thrombospondin-1 (THBS1), Metalloproteinase Inhibitor-1 (TIMP-1), Complement Factor H (CFH) und *Prolow-density Lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP-1) zur Diskriminierung von Patienten mit und ohne Prostatakarzinom identifiziert werden (Cima et al., 2011). Zusätzlich konnte eine weitere Signatur zur Prognose des lokalisierten Prostatakarzinoms, bestehend aus *Hypoxia up-regulated protein 1* (HYOU1), Asporin (ASPN), Cathespin D (CTSD) und Olfactomedin-4 (OLFM4) mittels LC-MRM-MS identifiziert werden (Cima et al., 2011). Nicht nur im Serum, sondern auch in EPS-(*expressed prostatic secretions*) Urin von Prostatakarzinompatienten wurde LC-MRM-MS erfolgreich zur Validierung von potentiellen Biomarkern für das Prostatakarzinom angewendet. So konnten Kim et al. Stratifin (SFN), Membran Metallo-Endopeptidase (MME), Parkinson Protein 7 (PARK7) Metalloproteinase Inhibitor 1 (TIMP1) und Transglutaminase 4 (TGM4) erfolgreich mittels LC-MRM-MS in EPS-Urin nachweisen, auch wenn in diesem Fall die Ergebnisse für SFN und TGM4 von den Western Blot Ergebnissen abwichen (Kim et al., 2012). Diese und unsere LC-MRM-MS Ergebnisse für Galectin-3 und PAP unterstreichen, dass LC-MRM-MS eine ausgesprochen vielversprechende Methode zur Analyse von Biomarkern im Urin und Serum von Prostatakarzinompatienten ist.

5.4.2 Weitere Validierung potentieller neuer Biomarker für das Prostatakarzinom im Serum und Urin von Patienten mittels LC-MRM-MS – A1BG, GRP78

Die Messung von PAP und Galectin-3 mittels LC-MRM-MS im Urin von Prostatakarzinompatienten konnten zeigen, dass die Methode der LC-MRM-MS für die Validierung potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom geeignet ist. Parallel zur Messung von PAP und Galectin-3 wurden die Abundanzen

weiterer Proteine in Serum und Urin mittels LC-MRM-MS ermittelt. Hierzu zählten u. a. Annexin A5, Vinculin, TTC38, Gelsolin, 78 kDa Glucose-regulated Protein (GRP78) und Alpha-1B-Glycoprotein (A1BG). Da für Annexin A5, Vinculin, TTC38 und Gelsolin neben den LC-MRM-MS Versuchen weitere Validierungsversuche durchgeführt wurden, sollen diese in den jeweiligen Kapiteln zu diesen Proteinen später diskutiert werden. In den initialen 2D-DIGE und MS Analysen wurden Alpha-1B-Glycoprotein und GRP78 als heraufreguliert in rezidivierenden Prostatakarzinomen identifiziert. Die Analysen zeigten außerdem eine Heraufregulation von Alpha-1B-Glycoprotein in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe. GRP78 Expression in Serum und Urin zeigt deutliche Diskrepanzen zu den initialen 2D-DIGE Studien und zur Literatur, ist GRP78 doch im Prostatakarzinomgewebe heraufreguliert (Pootrakul et al., 2006; Daneshmand et al., 2007; Tan et al., 2011). Auch für A1BG sind solche Diskrepanzen zur Literatur gegeben. So ist A1BG heraufreguliert in verschiedenen Karzinomen (Liu et al., 2012; Tian et al., 2008; Yoon et al., 2006; Gollapalli et al., 2012; Jeong et al., 2008; Kreunin et al., 2007), aber herabreguliert in der Gesamtheit aller gemessenen Tumorproben im Vergleich zu den Kontrollen in den LC-MRM-MS-Analysen. Damit ist für beide Proteine eine Eignung als nicht-invasive Biomarker für das Prostatakarzinom unwahrscheinlich, weshalb die Ergebnisse hier nicht weiter im Detail diskutiert werden.

5.4.3 Annexin A5 und Gelsolin als potentieller neuer diagnostischer Biomarker für das humane Prostatakarzinom

Initiale 2D-DIGE Experimente dieser Studie zeigten eine signifikante Heraufregulation von Annexin A5 und eine signifikante Herabregulation von Gelsolin im Prostatakarzinom im Vergleich zum tumorfreien Gewebe sowie im rezidivierenden Prostatakarzinom im Vergleich zum nicht rezidivierenden Karzinom. Im rezidivierenden Prostatakarzinom konnte auch Annexin A4 als heraufreguliert identifiziert werden. In der Literatur ist bereits für andere Mitglieder der Annexinfamilie ein Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom bekannt. Allerdings legen Studien von Annexin A4 eher eine Herabregulation im Prostatakarzinom nahe als die in der vorliegenden Arbeit in der initialen 2D-DIGE Studie gefundene Heraufregulation. So zeigten cDNA Microarray Analysen sowie immunhistochemische TMA Analysen eine signifikante Herabregulation von Annexin A1, A2, A4, A7 und A11 in hormonrefraktären Prostatakarzinomen im Vergleich zu hormonnaiven, lokalisierten Prostatakarzinomen. Allerdings konnte keine signifikante Deregulation zwischen klinisch lokalisierten Prostatakarzinomen und tumorfreien Geweben nachgewiesen werden. Auch konnte in der Studie von Xin et al. keine Deregulation von Annexin A5 und Annexin A3 nachgewiesen werden (Xin et al., 2003). Zwei andere Studien zeigen allerdings eine Herabregulation von Annexin A3 im Prostatakarzinom (Schostak et al., 2009; Kollermann et al., 2008). Auch für Annexin A5 stehen die Ergebnisse von Xin et al. im Kontrast zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie und anderer Studien. So ist die Annexin A5 Expression in CD44+

Prostatakarzinomstammzellen der Zelllinien Du145 erhöht im Vergleich zu CD44- Zellen (Lee et al., 2011). Weiterhin ist Annexin A5 in anderen Tumorentitäten heraufreguliert. So ist Annexin A5 in Plattenepithelkarzinomen der Zervix, in Pankreaskarzinomen, in Glioblastomen, in Lymphknoten-positiven Blasenkarzinomen im Vergleich zu Lymphknoten-negativen Blasenkarzinomen und in Hepatokarzinomen mit hohem Potential für lymphatische Metastasierung heraufreguliert (Peng et al., 2014). Außerdem ist Annexin A5 in die Entwicklung von Brustkrebs involviert (Peng et al., 2014) sowie in Kolorektalkarzinomen überexprimiert und mit Rezidiven und schlechtem Gesamtüberleben assoziiert (Peng et al., 2014). Interessanterweise ist Annexin A5 in Schilddrüsenkarzinomen negativ mit der Malignität der Karzinome assoziiert (Peng et al., 2014). In Plattenepithelkarzinomen der Zervix ist Annexin A5 Protein heraufreguliert, während die mRNA Expression herabreguliert ist (Peng et al., 2014). Mehr noch wird Annexin A5 als therapeutische Option für Karzinome diskutiert, da Annexin A5 in lebenden Zellen internalisiert wird und dies genutzt werden könnte um Chemotherapeutika in Annexin A5-targeted Liposomen einzukapseln. Dies führt z.B. bei Doxorubicin zu besseren Sicherheitsprofilen und weniger Nebenwirkungen (Kenis et al., 2007). Da auch Annexin A1 und A2 in Prostatakarzinomen herabreguliert sind (Liu et al., 2003; Chetcuti et al., 2001; Kang et al., 2002), sind unterschiedliche Annexine in Tumoren unterschiedlich dereguliert. Die Ergebnisse der vorliegenden und der erwähnten Studien legen nahe, dass möglicherweise die gesamte Annexinfamilie eine Rolle im humanen Prostatakarzinom spielt. Dies wird durch IPA Ergebnisse unterstrichen, die zeigten, dass Annexin A4 und Annexin A5 über Galectin-2 (LGALS2) miteinander in Verbindung stehen. Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurde beispielhaft Annexin A5 ausgewählt, da dieses Protein nicht nur in rezidivierenden Prostatakarzinomen signifikant heraufreguliert war, sondern auch in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreien Geweben als heraufreguliert gefunden wurde. Sowohl Western Blot Analysen als auch LC-MRM-MS Versuche konnten die Heraufregulation von Annexin A5 in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe bzw. im Urin von Prostatakarzinompatienten im Vergleich zum Urin von Patienten ohne Prostatakarzinom bestätigen. Die Urinanalysen mittels LC-MRM-MS waren allerdings nicht signifikant, was vermutlich auf das kleine Patientenkollektiv zurückzuführen ist. Eine Heraufregulation von Annexin A5 im rezidivierenden Prostatakarzinom im Vergleich zu nicht-rezidivierenden Prostatakarzinomen konnte nicht validiert werden. In Übereinstimmung mit den Literaturdaten zeigen die vorliegenden Ergebnisse dennoch, dass Annexin A5 ein potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom ist, insbesondere da Annexin A5 einen möglichen nicht-invasiven Urinbiomarker darstellt.

Auch für Gelsolin konnten LC-MRM-MS Experimente die signifikante Herabregulation in Urinen von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv im Vergleich zu Urinen von Patienten ohne Rezidiv bestätigen. Allerdings zeigt sich in den LC-MRM-MS Serumanalysen im Gegensatz zu den 2D-DIGE Analysen eine Heraufregulation in Tumoren mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv. Diese Heraufregulation

ist allerdings nicht in den Teilkollektiven „Serum Bonn“ bzw. „Serum Aachen“ nachweisbar. Mehr noch ist im Gesamtserumkollektiv eine signifikante Herabregulation in Seren von Prostatakarzinompatienten im Vergleich zu den Kontrollseren nachweisbar. Während für die LC-MRM-MS Serumversuche die Heraufregulation in Karzinomen mit Rezidiv zweifelhaft ist, bestätigen die LC-MRM-MS Urinalysen der Vergleiche der Seren von Kontrollpatienten und Prostatakarzinompatienten die mittels 2D-DIGE gefundene Herabregulation von Gelsolin in Prostatakarzinomen bzw. in Prostatakarzinomen mit Rezidiv. Die Herabregulation von Gelsolin im Urin von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv sowie im Serum von Prostatakarzinompatienten im Vergleich zu Kontrollpatienten steht im Einklang mit vorherigen Studien. So konnten Lee et al. zeigen, dass Gelsolin in Prostatakarzinomen und BPH herabreguliert ist im Vergleich zu nicht-proliferativen Geweben (Lee et al., 1999). Mehr noch ist Gelsolin mit dem Androgenrezeptor assoziiert. Gelsolin erhöht dabei die Androgenrezeptoraktivität in Anwesenheit von Androgenen, wodurch die Blockade der Androgenrezeptor-Gelsolin-Interaktion als potentiell therapeutisches Target für die Behandlung von Prostatakarzinomen gehandelt wird (Nishimura et al., 2003). Aber nicht nur im Prostatakarzinom ist Gelsolin herabreguliert. Auch in Brust- (Winston et al., 2001), Colon- (Gay et al., 2008), Blasen- (Sanchez-Carbayo et al., 2007), Magen- und Lungenkarzinomen ist Gelsolin signifikant herabreguliert (Spinardi und Witke, 2007). Allerdings zeigten erbB2 und EGFR überexprimierenden Brustkarzinomen sowie Subgruppen von nicht-kleinzelligen Lungentumoren eine erhöhte Gelsolinexpression und Korrelation der Gelsolinexpression mit einer negativen Prognose dieser Tumore (Li et al., 2012; Spinardi und Witke, 2007; Thor et al., 2001; Shieh et al., 1999). Diese widersprüchlichen Ergebnisse in Karzinomsubgruppen könnten auch die etwas widersprüchlichen Ergebnisse von Western Blot und LC-MRM-MS Serum- und Urinalysen erklären. Folglich sollte die Eignung von Gelsolin als potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom an großen Patientenkollektiven, an denen auch Subgruppenanalysen möglich sind, weiter überprüft werden. Dies erscheint notwendig, da aufgrund der Deregulation in Urin und Serum von Prostatakarzinompatienten Gelsolin ein ausgesprochen vielversprechender potentieller nicht-invasiver Biomarker für das Prostatakarzinom ist. Damit könnte Gelsolin zumindest für Subgruppen ein vielversprechender Biomarker für das Prostatakarzinom werden und so möglicherweise eine Rolle in einem Biomarkerpanel einnehmen.

5.4.4 T-Komplex Protein 1 subunit alpha (TCP1alpha) und Calponin-1 sind weder als diagnostische noch als prognostische potentielle neue Biomarker für das humane Prostatakarzinom geeignet

In 2D-DIGE und MS Analysen wurde TCP1alpha als hochreguliert in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe sowie in Karzinomen mit Rezidiv im Vergleich zu Karzinomen ohne Rezidiv gefunden. Western Blot Validierungen von TCP1alpha bestätigen zwar eine leichte Tendenz der Heraufregulation von TCP1alpha in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe, zeigten

aber weder eine signifikante Deregulation ($p=0,237$) in Tumor und tumorfreiem Gewebe, noch in Prostatakarzinomen mit Rezidiv im Vergleich zu Karzinomen ohne Rezidiv. Auch die mittels 2D-DIGE und MS identifizierte Deregulation von Calponin-1 konnte mittels Western Blot nicht validiert werden. Möglicherweise ist sowohl im Falle von TCP1alpha als auch im Falle von Calponin-1 die in der 2D-DIGE gefundene Deregulation durch zwei sich überlagernde Proteine zustande gekommen, von denen nur ein Protein mittels MS identifiziert wurde. Im Falle von Calponin-1 ist im zugehörigen deregulierten Spot neben Calponin-1 auch Malatdehydrogenase identifiziert worden, welches möglicherweise für die detektierte Deregulation des Spots in der 2D-DIGE Analyse verantwortlich sein. Malatdehydrogenase ist in dieser Studie allerdings nicht weiter analysiert worden. Damit kommen weder TCP1alpha noch Calponin-1 als mögliche Biomarker für das Prostatakarzinom in Frage. Im Falle von TCP1alpha bestätigt dieses Ergebnis Analysen von Leonart et al., die für den gesamten TCP1 Komplex ebenfalls keine signifikante Deregulation im Prostatakarzinom nachweisen konnten (Leonart et al., 2006).

5.4.5 KCTD12, Secernin-1, Vinculin und TTC38 als potentielle neue Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

5.4.5.1 KCTD12

BTB/POZ domain-containing protein KCTD12 (KCTD12, Pftin) gehört zur Proteinfamilie der spannungsabhängigen Kalium-Kanal Tetramerisierungs-Domänen (*KCTD, voltage-gated potassium channel tetramerization domain*), welche zum Aufbau spannungsabhängiger Kaliumkanäle beitragen (Resendes et al., 2004). Die Funktion von Pftin bei der Krebsentwicklung und Progression ist noch unbekannt (Kikuta et al., 2010). 2D-DIGE Analysen kombiniert mit MS identifizierten KCTD12 als potentiellen Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom, da KCTD12 in dieser Tumorgruppe im Vergleich zu nicht-rezidivierenden Tumoren heraufreguliert war. Literaturrecherchen untermauerten die Einschätzung, dass KCTD12 ein ausgesprochen vielversprechender Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom sein könnte. So ist Pftin ein prognostischer Biomarker für gastrointerstinale Stromtumore (GIST) (Kikuta et al., 2010; Suehara et al., 2008; Kubota et al., 2011; Kawai et al., 2008). Daher sollte die in der 2D-DIGE detektierte Deregulation von KCTD12 in der vorliegenden Studie weiter validiert werden. Allerdings war in der vorliegenden Arbeit eine Western Blot Validierung der KCTD12 Deregulation leider nicht möglich. Ersatzweise wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Hierbei fiel auf, dass KCTD12 in Folgeschnitten von Prostatagewebe eine ausgesprochen ähnliche Verteilung der Expression im Prostatagewebe aufwies wie Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR). So färbten beide Proteine in der Immunhistochemie Tumore, nicht aber tumorfreie Drüsen an. AMACR ist in Prostatakarzinomen bis zu 9-fach hochreguliert im Vergleich zu Normalgewebe (Luo et al., 2002), wobei diese Überexpression auch auf mRNA Ebene nachweisbar ist (Xu et al., 2000). Als Marker für das

Prostatakarzinom weist AMACR in immunhistochemischen Analysen eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 88% auf (Jiang et al., 2001). Im Serum erreicht AMACR allerdings nur eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 81% (Sreekumar et al., 2004). Indirekt lässt sich damit die Hypothese aufstellen, dass KCTD12 ein potentieller diagnostischer Marker für das Prostatakarzinom sein könnte. Diese Hypothese konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt werden. Die vorliegenden vorläufigen Ergebnisse sind aber vielversprechend, so dass eine weitere Validierung der KCTD12 Expression als möglicher Marker für das Prostatakarzinom in Zukunft erfolgen sollte. Hierbei sollten unbedingt auch Serumanalysen durchgeführt werden um zu überprüfen, ob KCTD12 möglicherweise AMACR als potentiellen nicht-invasiven Biomarker unterstützen oder sogar eine nicht-invasive Diagnosemöglichkeit darstellen könnte.

5.4.5.2 Secernin-1 als neuer Basalzellmarker

Secernin-1 wurde 2002 von O'Neill et al. als KIAA0193 in 2D Analysen des Thrombozytenproteoms entdeckt (O'Neill et al., 2002). Kurze Zeit später identifizierten und charakterisierten Way et al. Secernin-1 als ein 50kDa großes, cytosolisches Protein, welches in die Regulation der Exocytose von peritonealen Mastzellen involviert ist (Way et al., 2002). In der vorliegenden Studie konnten Secernin-1 in initialen 2D-DIGE Analysen kombiniert mit MS als herunterreguliert im rezidivierenden Prostatakarzinom im Vergleich zu nicht-rezidivierenden Prostatakarzinomen identifiziert werden. Literaturrecherchen lieferten zusätzlich vielversprechende Hinweise, dass Secernin-1 ein potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom ist. So ist Secernin-1 bereits in verschiedenen Karzinomen als heraufreguliert beschrieben worden (Fan et al., 2011; Miyoshi et al., 2010; Suda et al., 2006); (Suda et al., 2006); (Sabo et al., 2008) und korreliert teilweise mit klinikpathologischen Daten und schlechten Prognosen (Miyoshi et al., 2010). Im Gegensatz dazu ist Secernin-1 in Synovial Sarcomen mit guter Prognose heraufreguliert im Vergleich zu Synovialsarkomen mit schlechter Prognose (Suehara et al., 2011). Außerdem zeigten *gene expression profiling* Studien an Prostatakarzinomen, dass Secernin-1 während des Übergangs der PIN zum Prostatakarzinom herabreguliert wird (Ashida et al., 2004). Auch in der vorliegenden Studie war Secernin-1 im Prostatakarzinom herabreguliert. So zeigten die zur Validierung der 2D-DIGE durchgeführten Western Blot und immunhistochemischen Analysen an zwei unabhängigen Patientenkollektiven eine signifikante Herabregulation von Secernin-1 im Prostatakarzinom im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe. Die Auswertung der immunhistochemischen TMA Analysen zeigte außerdem, dass Secernin-1 bereits in intraepithelialen Neoplasien (PIN) herabreguliert ist. Weiter konnten die immunhistochemischen Analysen zeigen, dass Secernin-1 in den Basalzellen der Prostatadrüsen exprimiert wird, während lumenale Prostatadrüsenzellen keine Secernin-1 Expression aufweisen. Interessanterweise zeigten einige wenige Prostatakarzinome des analysierten Dresdener Patientenkollektives eine schwache Secernin-1 Expression in den Drüsenzellen (Daten nicht gezeigt).

Diese Secernin-1 Expression konnte an einem unabhängigen Patientenkollektiv aus Bonn allerdings nicht bestätigt werden. Demnach ist Secernin-1 vor allem in den Basalzellen der Prostata Drüsen exprimiert und geht während der Transition von benignen Prostatagewebe über die PIN zum Prostatakarzinom verloren, was auch schon von Ahida et al. beobachtet wurde (Ashida et al., 2004). Da die Secernin-1 Expression im inflammatorischen und normalem Prostatagewebe identisch ist, ist eine weitere dringend benötigte Eigenschaft eines guten Tumorbiomarkers für Secernin-1 gegeben. Demnach ist Secernin-1 ein vielversprechender Biomarker für das Prostatakarzinom, wobei die initiale Idee, dass es sich um einen Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom handelt, nicht bestätigt werden konnte. Eine Detektion von Secernin-1 im Serum oder Urin von Prostatakarzinompatienten mittels LC-MRM-MS war leider nicht möglich. Daher kann über das Potential von Secernin-1 als möglicher nicht-invasiver Biomarker noch keine Aussage gemacht werden. Diese Analysen sind allerdings Bestandteil weiterer Studien.

5.4.5.3 Vinculin als potentieller neuer Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

Vinculin ist ein 117 kDa großes Strukturprotein, welches an Aktin bindet (Mierke, 2009). Es ist Teil der *Adherents Junctions* zwischen Zellen (Subauste et al., 2005) und Teil der *Focal Adhesions* für die Zell-Extrazellulärmatrix Kommunikation (Tran et al., 2002). Außerdem ist Vinculin mit dem Tumorsuppressor PTEN assoziiert: F9 vinculin-null Zellen (VIN-/-) exprimieren kein PTEN Protein trotz normaler PTEN mRNA Expression. Die Reexpression von Vinculin in diesen Zellen stellt auch die PTEN Expression wieder her (Subauste et al., 2005). Demnach ist Vinculin in die PTEN Regulation involviert (Subauste et al., 2005) und kein reines Strukturprotein. Die nicht nur (sub)membranöse sondern auch cytoplasmatische Expression von Vinculin unterstreicht ebenfalls, dass Vinculin möglicherweise neben strukturellen Funktionen weitere regulatorische Funktionen ausübt (Ruiz et al., 2011). Damit passt Vinculin in das mittels *Ingenuity Pathway Analysen* (IPA) erstellte Bild besonders interessanter Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom.

In 2D-DIGE und MS Analysen konnte Vinculin als heraufreguliert im rezidivierenden Prostatakarzinom im Vergleich zu nicht rezidierten Prostatakarzinomen identifiziert werden. Auch Ruiz et al. konnten bereits zeigen, dass Vinculin in BPH kaum oder gar nicht exprimiert wird, während 92% der lokalisierten Prostatakarzinome eine niedrige Vinculinexpression aufwiesen. Dagegen war die Vinculinexpression in 16% der kastrationsresistenten Prostatakarzinomen hoch und in weiteren 34% der kastrationsresistenten Prostatakarzinomen mittelstark vorhanden (Ruiz et al., 2011). Eine Amplifikation und Überexpression von Vinculin ist also mit fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms assoziiert (Ruiz et al., 2011)). Dies passt zu den Erkenntnissen der IPA, wonach insbesondere Proteine, die in Proliferation und zellulärer Bewegung involviert sind besonders geeignete Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom zu sein scheinen ((siehe Kapitel 5.3 „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA)

der identifizierten potentiellen neuen Biomarker). Außerdem ist diese Überexpression mit einer hohen Tumorzellproliferation – repräsentiert durch eine hohe Expression des ebenfalls als potentieller prognostischer Marker für das rezidivierende Prostatakarzinom diskutierte Protein Ki67 (Kristiansen, 2012) im Prostatakarzinomgewebe – assoziiert (Ruiz et al., 2011). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten die vorliegenden TMA Analysen eine signifikante Heraufregulation von Vinculin im Prostatakarzinom im Vergleich zum tumorfreien Gewebe. Diese Heraufregulation konnte schon in PIN Läsionen nachgewiesen werden. Auch Urinblots zur Analyse der Eignung von Vinculin als nicht-invasiver Biomarker zeigten eine signifikante Heraufregulation der Vinculin Level im Urin von Prostatakarzinompatienten im Vergleich zu Kontrollurinen. Mehr noch ist Vinculin im Urin von Prostatakarzinompatienten mit späterem Rezidiv im Verlauf ihrer Erkrankung heraufreguliert im Vergleich zum Urin von Prostatakarzinompatienten ohne Rezidiv, was durch ähnliche Ergebnisse der Urin LC-MRM-MS Analysen unterstrichen wird. Damit ist Vinculin ein ausgesprochen vielversprechender nicht-invasiver Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom. Entsprechend sollten weitere Analysen an großen Patientenkollektiven in Zukunft das in der vorliegenden Studie und der Studie von Ruiz et al. (Ruiz et al., 2011) gezeigte Potential von Vinculin als Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom validieren. Allerdings sollte hierbei die Expression verschiedener Vinculin Isoformen mit berücksichtigt werden. Denn Pang et al. konnten zeigen, dass die Vinculin Isoform 2 in Lymphknoten von metastatischem Prostatakarzinom heraufreguliert ist im Vergleich zu Lymphknoten-negativem Prostatakarzinomgewebe (Pang et al., 2010). Außerdem beschrieben Thorsen et al. eine alternative Splicing Variante von Vinculin in Kolon-, Blasen- und Prostatakarzinomen. Bei dieser Splicevariante wird Vinculin im Karzinomgewebe ohne Exon 19 exprimiert. Zusätzlich ist die lange Vinculinisoform im metastatischen Prostatakarzinom herabreguliert im Vergleich zum lokalisierten Prostatakarzinom (Thorsen et al., 2008). Interessanterweise kodiert Exon 19 für ein Peptid im c-terminalen Teil von Vinculin, welches an der Proteinoberfläche lokalisiert ist und möglicherweise an der Protein-Protein Interaktion teilnimmt. Außerdem enthält dieses Exon zwei starke potentielle Phosphorylierungsstellen, welche regulatorischen Funktionen dienen könnten (Thorsen et al., 2008) und damit wiederum die These stützen, dass Vinculin mehr als ein Strukturprotein ist. Diese zwei Studien zeigen aber vor allem, dass verschiedene Vinculinisoformen im Prostatakarzinom unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen können. Entsprechend sollten zukünftige Studien zur Vinculinexpression im Prostatakarzinom die Analyse verschiedener Vinculinisoformen mit einbeziehen. Zusammenfassend ist Vinculin ein ausgesprochen vielversprechender, potentieller, nicht-invasiver Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom, dessen Potential in weiteren großangelegten Studien unbedingt weiter validiert werden sollte.

5.4.5.4 TTC38 als potentieller neuer Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom

Neben Vinculin, Secernin-1 und anderen Molekülen zeigten die initialen 2D-DIGE Analysen auch für TTC38 eine signifikante Deregulation zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv im weiteren Verlauf der Erkrankung. So war TTC38 in Prostatakarzinomen mit Rezidiv 2,4-fach herabreguliert im Vergleich zu Karzinomen ohne Rezidiv ($p=0,036$). In der Literatur war zu Beginn dieser Arbeit über TTC38 ausgesprochen wenig bekannt. Anhaltspunkte für eine Assoziation von TTC38 mit Krebs oder anderen Erkrankungen gab es nicht. So war lediglich bekannt, dass TTC38 als ein Protein aus der Familie der *Tetratricopeptide repeat domain containing* Proteine drei *Tetratricopeptid repeat* Motive (TPR) enthält. TPR Motive bestehen aus einer Sequenz von 34 degenerierten Aminosäuren angeordnet zu zwei anti-parallelen α -Helices (Sikorski et al., 1990). Zwei TPR Motive (Tandem TPR) bilden dann eine rechtsgängige helikale Struktur mit einem amphipathischen Kanal, welcher als Bindestelle die komplementäre Region eines potentiellen Interaktionspartners aufnehmen kann (Blatch und Lassle, 1999). Damit enthält TTC38 potentielle Protein-Protein Interaktionsdomänen.

Das 26045 bp große Gen von TTC38 liegt auf dem langen Arm von Chromosom 22 (Dunham et al., 1999). Dabei codiert das Gen für insgesamt sieben Transkripte, von denen drei Protein-kodierend sind (Ensembl, 2013). Das längste 52,8 kDa große und 469 Aminosäuren lange Transkript (Isoelektrischen Punkt 5,89) enthält drei TPR Motive an den Positionen 108-141, 180-213 und 252-185 (Uniprot.org, 2013).

Die nur spärlich vorhandenen Informationen über TTC38 machten das Protein zu einem ausgesprochen spannenden Molekül für weitere Validierungsversuche. Western Blot und immunhistochemische Analysen bestätigten dann auch die Herabregulation von TTC38 in Tumoren mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv. Mehr noch zeigten diese Analysen aber auch eine signifikante Heraufregulation von TTC38 in Tumoren ohne Rezidiv im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe. Zusätzlich zeigte sich, dass die Herabregulation von TTC38 in Prostatakarzinomen mit Rezidiv im Vergleich zu Tumoren ohne Rezidiv nicht an das Niveau des tumorfreien Gewebes heranreichte. Demnach muss nun nach den Validierungsstudien davon ausgegangen werden, dass die TTC38 Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene im Tumor ansteigt, wobei dieser Anstieg in Tumoren ohne Rezidiv am höchsten ausfällt und in Prostatakarzinomen mit Rezidiv wieder leicht sinkt, nicht aber das Niveau der tumorfreien Proben erreicht. Diese Regulation zieht sich einheitlich durch die Western Blot, mRNA und immunhistochemischen Analysen und ist in jeder Analyse signifikant. Mehr noch zeigt die LC-MRM-MS Analyse eines unabhängigen Patientenkollektives selbst im Urin diese TTC38 Regulation. Damit stellte TTC38 in Kombination mit einem weiteren Biomarker, welcher Prostatakarzinome insgesamt zuverlässig detektieren kann, einen vielversprechenden neuen Biomarker für Prostatakarzinome mit einer guten Prognose dar. Ein oder mehrere weitere Biomarker in Kombination mit TTC38 werden aber benötigt, um auch potentiell TTC38 negative rezidivierende Prostatakarzinome zu detektieren. Hier wären z.B. die im

vorhergegangenen Kapiteln bereits diskutierten Marker AMACR oder KCTD12 Kandidatenproteine für ein Biomarker Panel (siehe Kapitel 5.4.5.1 KCTD12).

Mit dem weiteren Fortschritt der vorliegenden Arbeit war es umso überraschender, dass in immunhistochemischen Analysen an einem weiteren unabhängigen Patientenkollektiv mittels TMA diese interessante Regulation von TTC38 nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Hier war eine Heraufregulation von TTC38 einheitlich sowohl in Prostatakarzinomen mit als auch in Prostatakarzinomen ohne Rezidiv sowie in den PIN Läsionen nachweisbar. Damit bleibt der Nutzen von TTC38 als Marker für Prostatakarzinome mit einer guten Prognose (ohne Rezidiv im Laufe der Entwicklung) unklar. Zweifelsohne handelt es sich allerdings um einen ausgesprochen spannenden vollständig neuen Biomarker für das Prostatakarzinom, wobei weitere Studien klären müssen, ob TTC38 einen Biomarker für Prostatakarzinome insgesamt oder für Prostatakarzinome mit einer guten Prognose darstellt. Besonders erfreulich ist die Möglichkeit der Detektion von TTC38 im Urin, womit es sich sogar um einen potentiellen nicht-invasiven Biomarker für das Prostatakarzinom handelt.

5.5 Funktionelle Charakterisierung von TTC38, einem potentiellen neuen Biomarker für das (rezidivierende) Prostatakarzinom

Da wie im letzten Kapitel schon erwähnt über die Funktion von TTC38 zu Beginn dieser Arbeit nur ausgesprochen wenig bekannt war, war es ein weiteres Ziel, mögliche Auswirkungen der TTC38 Deregulation auf die Tumorgenese und Progression des Prostatakarzinoms zu untersuchen. Hierzu musste zunächst ein geeignetes Modell für die Untersuchung von TTC38 identifiziert werden. Grundsätzlich sind Zelllinien hierfür geeignete Modelle, tragen sie doch enorm zum Verständnis des Prostatakarzinoms bei (van Bokhoven et al., 2003). Außerdem stellen Überexpressions- und knockdown-Zellkulturmodelle Möglichkeiten zur Analyse der Wirkung eines Moleküls dar (Hatina et al., 2008; Seyffert, 1998). Voraussetzung für eine Überexpression ist ein endogener Verlust der Expression des Zielmoleküls. Im Falle des Knockdowns ist eine endogene Expression Voraussetzung. Mit Hilfe genetischer Manipulationen kann dann die Überexpression oder der Knockdown des Zielmoleküls herbeigeführt werden.

Initial durchgeführte mRNA Expressionsanalysen an den Tumorzelllinien MDA-MB-231 (Mammakarzinomzelllinie), Du145 und PC-3 (beides Prostatakarzinomzelllinien) zeigten eine hohe Expression von TTC38 in der Zelllinie MDA-MB-231 und im Vergleich dazu ausgesprochen niedrige TTC38 Expressionen der Zelllinien Du145 und PC-3. Beide Prostatakarzinomzelllinien stammen von Metastasen von kastrationsresistenten Prostatakarzinomen ab. Die Prostatakarzinomgewebeanalysen mittels Western Blot und Immunhistochemie haben gezeigt, dass aggressive Prostatakarzinome, welche im weiteren Verlauf der Erkrankung Rezidive bilden, eine niedrigere TTC38 Expression aufweisen als Prostatakarzinome ohne Rezidiv. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, warum die

kastrationsresistenten Prostatakarzinomzelllinien Du145 und PC-3 eine nur sehr niedrige TTC38 Expression aufweisen.

Zur Herstellung eines *in vitro* Modell für das Prostatakarzinom wurde zunächst TTC38 knockdown Klone der Zelllinie PC-3 hergestellt. Nach erfolgreicher Analyse der TTC38 knockdown Klone wurden im späteren Verlauf auch TTC38-Überexpressionsklone hergestellt. Die Zelllinie PC-3 wurde aus einer Knochenmetastase eines viert-gradigen Prostatakarzinoms eines 62-jährigen weißen Mannes etabliert (Kaighn et al., 1979). Der spendende Patient erhielt zum Zeitpunkt der Zellentnahme eine Antiandrogentherapie, was vermutlich die Antiandrogenresistenz der Zelllinie bedingt. Dabei weisen die PC3-Zellen im Vergleich zu den Zelllinien Du145 und LNCaP ein hohes Potential zur Bildung von Metastasen auf (Pulukuri et al., 2005), was sie zu einem geeigneten Modell des Einflusses von TTC38 auf die Prostatakarzinomgenese und Progression machte.

Mit Hilfe der hergestellten Zellkulturmodelle sollte der Einfluss von TTC38 auf für die Tumorentwicklung wichtigen Eigenschaften wie Proliferation (Hanahan und Weinberg, 2011), Migration und Kolonienbildung (Hanahan und Weinberg, 2011; Yamaguchi et al., 2005) *in vitro* analysiert werden.

Die Proliferaton von Tumorzellen erfolgt autark von exogenen Wachstumssignalen. Weiterhin sind Tumorzellen insensitiv gegen Anti-Wachstumssignale und können die Apoptose u. a. durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53 umgehen (Hanahan und Weinberg, 2000). Da TTC38 in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe heraufreguliert ist, wäre in Proliferationsassays eine proliferationsstärkende Eigenschaft von TTC38 erwartet worden. Allerdings ist TTC38 in Prostatakarzinomen mit Rezidiv herabreguliert, was eher zu einer durch TTC38 negativ beeinflussten Proliferation passen würde. In durchgeführten XTT-Proliferationsassays und Kolonienbildungsassays war weder in den TTC38 knockdown Klonen noch in den TTC38 Überexpressionsklonen ein signifikanter Einfluss von TTC38 auf die Proliferation der Zellen nachweisbar. Im Kolonienbildungsassay, welcher neben dem Kolonienbildungsvermögen auch die Proliferation der Zellen über einen langen Zeitraum widerspiegelt, konnte in beiden Zellkulturmodellen eine Tendenz zum schnelleren Wachstum und einer höheren Kolonienbildungsfähigkeit der Zellen mit hoher TTC38 Expression detektiert werden. Mehr noch zeigten die TTC38 knockdown Klone eine etwas geringere Koloniengröße als die Kontrollklone, während die TTC38 Überexpressionsklone tendenziell etwas größere Kolonien als die zugehörigen Kontrollklone zeigten. Diese Daten weisen darauf hin, dass Zellen mit einer hohen TTC38 Expression einen Vorteil in der Proliferation haben. Dies korreliert mit den Expressionsdaten in Patientengewebe, wonach TTC38 in Tumoren heraufreguliert ist.

Diese Analysen der Kolonienbildungsfähigkeit geben auch schon einen Hinweis auf das Potential der Zellen zur Tumordinvasion und Metastasierung. Dies wird durch multiple zelluläre Eigenschaften beeinflusst (Yamaguchi et al., 2005). Unter anderem spielt die Zellmigration eine Rolle in der Tumorzellinvasion, da Zellen zur Bildung von Metastasen in der Lage sein müssen, sich von ihrer

Ursprungsmasse zu trennen und abzuwandern (van Zijl et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit zeigten durchgeführte Migrationsassays (Scratch Assays) ein ambivalentes Bild: TTC38 Überexpressionsklone zeigten eine höhere Migrationsfähigkeit als die zugehörigen Kontrollklone. Allerdings zeigten auch TTC38 knockdown Klone eine höhere Migrationsfähigkeit als die zugehörigen Kontrollklone. Bei den TTC38 knockdown Klonen waren allerdings starke Diskrepanzen zwischen der Migrationsfähigkeit der Kontrollklone und der Migrationsfähigkeit der PC-3 Wildtypzellen feststellbar. Da die Kontrollklone eine dem Wildtyp entsprechende TTC38 Expression aufwiesen, wären hier auch ähnliche Ergebnisse bei der Migrationsfähigkeit zu erwarten. Da dies nicht der Fall ist, ist die Vertrauenswürdigkeit der Ergebnisse der TTC38 knockdown Klone etwas eingeschränkt. Demnach kann in Zusammenschau mit den Kolonienbildungsassays davon ausgegangen werden, dass eine hohe TTC38 Expression auch die Migrationsfähigkeit der Zellen erhöht. Im Hinblick auf die Eignung von TTC38 als Biomarker spricht dies eher für eine Eignung von TTC38 als Biomarker für das Prostatakarzinom wie es in den immunhistochemischen TMA Analysen beobachtet werden konnte. Allerdings ist zu beachten, dass auch die Prostatakarzinome mit Rezidiv immer noch eine höhere TTC38 Expression aufwiesen, als die Prostatakarzinome ohne Rezidiv. Daher ist alternativ in weiteren Experimenten die Frage zu klären, ob eine Deregulation sowohl in Form einer TTC38 Hochregulation als auch in Form einer TTC38 Herabregulation immer zu einer Erhöhung der Migrationsfähigkeit der Zellen führt. Dies würde erklären, weshalb ausgerechnet Patienten mit einer etwas niedrigeren TTC38 Expression im Vergleich zur Gesamtheit aller Prostatakarzinompatienten Rezidive entwickeln. Für eine endgültige Klärung dieser Frage müssten weitere Prostatakarzinomzelllinien durch TTC38 Knockdown bzw. Überexpression genetisch manipuliert und analysiert werden. Zusätzlich könnten *in vivo* Experimente hier weitere Aufschlüsse ermöglichen. Beides war im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht mehr möglich. Für die Bildung von Metastasen ist nicht nur die Migrationsfähigkeit sondern insbesondere auch die Invasionsfähigkeit der Zellen entscheidend (Yamaguchi et al., 2005). Die Invasion ist der erste Schritt der Metastasierung, bei der die Überwindung der Basalmembran durch den Abbau der Extrazellulärmatrix eine zentrale Rolle spielt (Hanahan und Weinberg, 2000; Yamaguchi et al., 2005; Sahai, 2005). *In vitro* ist dieses Durchbrechen der Basalmembran durch die Invasion der Zellen durch eine Matrigelschicht simulierbar. In den durchgeführten Invasionsassays zeigte TTC38 Überexpressionsklone in Übereinstimmung mit den Migrationsassays eine stärkere Invasion als die Kontrollklone. Für die TTC38 knockdown Klon konnte kein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Kontrollklonen nachgewiesen werden. Als Zusammenfassung sämtlicher funktionellen Analysen von TTC38 scheint die TTC38 Expression mit einer erhöhten Migrationsfähigkeit und Invasionsfähigkeit der PC-3 Zellen assoziiert zu sein.

Da Datenbank- und Literaturrecherchen ergaben, dass TTC38 drei sogenannte TPR Domänen enthält (Uniprot.org, 2013), welche der Protein-Protein-Interaktion dienen (Blatch und Lassle, 1999), sollte in

einem nächsten Schritt zur weiteren Aufklärung der biologischen Funktion von TTC38 Interaktionspartneranalysen durchgeführt werden. Hierzu wurden zunächst theoretische IPA Analysen durchgeführt. Diese identifizierten Prefoldin Subunit 1 (PFDN1), Thymidinkinae 1 (TK1), Ubiquitin C (UBC) und Hepatozyten Nuklearer Faktor 4 alpha (HNF4A) als potentielle TTC38 Interaktionspartner. Diese theoretischen Ergebnisse sollten mittels Immunpräzipitation gekoppelt an LC-MS Analysen validiert werden, was bis zum Ende der Arbeit allerdings nicht erfolgreich etabliert werden konnte. Daher wurden Analysen zum Aufdecken etwaiger Koregulationen zwischen TTC38 und den potentiellen Interaktionspartnern durchgeführt. Hierbei zeigte nur TK1 eine klare Deregulation: TK1 war in den TTC38 Überexpressionklonen aber auch in den TTC38 knockdown Klonen heraufreguliert. Eine TTC38 Deregulation scheint also mit einer TK1 Deregulation zusammen zu hängen. TK1 stellt Deoxythymidine monophosphate für den Aufbau von DNA zur Verfügung (Wintersberger, 1997). Dies und die Möglichkeit über die Aktivität und Konzentration von TK1 Rückschlüsse auf die Teilungsaktivität von Zellen zu schließen (Sherley und Kelly, 1988) bedingt, dass TK1 als Marker für die Proliferation angesehen wird (Aufderklamm et al., 2012). Allerdings ist zu beachten, dass nur das Tetramer, welches im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte, eine starke Aktivität aufweist, während das Dimer wenig aktiv ist (Munch-Petersen et al., 1993; Munch-Petersen, 2009; Mutahir et al., 2013). Demnach steht die TK1 Deregulation vermutlich eher nicht im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Proliferationsassays, scheint aber mit TTC38 assoziiert zu sein.

Durchgeführte LC-MS Analysen der TTC38 knockdown und Überexpressionsklone verfolgten das Ziel, mit TTC38 koregulierte Proteine zu identifizieren. Solche Proteine können ein potentielles Zielprotein von TTC38 darstellen und somit Hinweise auf die biologische Funktion eines Proteins liefern. Die durchgeführten Analysen konnten 57 potentielle Zielproteine von TTC38 identifizieren. 2/3 dieser Proteine waren Transporter, Enzyme oder Transkriptionsregulatoren und mehr als die Hälfte der identifizierten Proteine waren im Nukleus lokalisiert. Dies stimmt mit der Erkenntnis überein, dass die Mehrzahl der identifizierten Proteine mit den molekularen und zellulären Funktionen Genexpression, Zellzyklus, zelluläres Assembling und Organisation sowie DNA Replikation, Rekombination und Reparatur assoziiert sind. Interessanterweise sind auch die mittels IPA identifizierten potentiellen Interaktionspartner von TTC38 mit diesen Funktionen assoziiert: So spielt PFDN1 im Zellzyklus eine Rolle, TK1 in der DNA Synthese und DNA Replikation, UBC in der DNA Reparatur und HNF4A in der Transkription (Uniprot, 2013). Dies lässt den Rückschluss zu, dass vermutlich auch TTC38 mit Genexpression, Zellzyklus, zellulärem Assembling und Organisation sowie DNA Replikation, Rekombination und Reparatur assoziiert ist. Proteine, welche TPR-Motive enthalten, sind häufig in der Funktion von Chaperonen, des Zellzyklus, der Transkription und von Proteintransport-Komplexen involviert (Blatch und Lassle, 1999). Neueren Erkenntnissen zufolge sind Proteinkomplexe mit TPR-Motiv enthaltenden Proteinen außerdem in der Immunabwehr von Pathogenen involviert (Allan und

Ratajczak, 2011). IPA Analysen kombiniert mit den vorliegenden Literaturdaten lassen für TTC38 den Rückschluss zu, dass es in die Transkription, den Zellzyklus, die Proteintranslokation sowie die Genexpression, DNA Replikation, Rekombination und Reparatur involviert ist. Die Auswirkung von TTC38 auf Proteine, die in der Regulation der Genexpression involviert sind, ist möglicherweise auch verantwortlich für den beobachteten Einfluss von TTC38 auf die Zellmigration von PC-3 Zellen, denn das veränderte Motilitätsverhalten von Krebszellen wird u.a. durch veränderte Genexpressionsmuster hervorgerufen (Sahai, 2005). Damit legen die *in vitro* Analysen von TTC38 dar, dass es sich um einen neuen potentiellen Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom handelt, der vermutlich auch biologisch eine Rolle in der Invasion und Migration von Prostatakarzinomzellen spielt.

5.6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie ist es gelungen, potentielle neue Biomarker für das Prostatakarzinom mittels 2D-DIGE und MS wie u. a. Secernin-1, TTC38, Vinculin, PAP, Galectin-3, TCP1alpha, Annexin A5, GRP78 und Gelsolin zu identifizieren und teilweise auch zu validieren. Einige dieser Biomarker dürften allerdings nur in Kombination mit anderen Biomarkern als Panel interessant sein. Ein solcher Biomarker ist TTC38, welcher als potentieller Biomarker für Prostatakarzinome mit einer guten Prognose interessant ist, so er denn kombiniert wird mit einem Biomarker, der auch potentiell TTC38 negative Prostatakarzinome mit Rezidiv identifiziert. Allerdings ist davon auszugehen, dass es nicht den einen Biomarker zur Detektion unterschiedlicher Krebsstadien inklusive der Prädiktion der Behandlungseffizienz geben wird, sondern Biomarker Panels für die Detektion, Prognose und Prädiktion des Prostatakarzinoms benötigt werden (Goo und Goodlett, 2010). Dies ist besonders beim Prostatakarzinom der Fall, da es sich um eine heterogene und multifaktorielle, multifokale Erkrankung handelt (Talesa et al., 2009).

In der vorliegenden Studie ist es nicht für jeden in initialen 2D-DIGE und MS Analysen identifizierten Rezidivmarker gelungen ihn zu validieren. Dies unterstreicht, wie schwierig die Identifikation potentieller Rezidivbiomarker ist. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, dass einige Karzinome ihren metastatischen Phänotyp erst im Verlauf der Tumorgenese und Progression entwickeln (Klein, 2008; Chung et al., 2005), andere Prostatakarzinome aber von Beginn an klinisch signifikant sind (Bastian et al., 2009; Klein, 2008).

Dennoch ist es gelungen, mit Vinculin und TTC38 zwei potentielle Biomarker zur Stratifizierung des Rezidivrisikos von Prostatakarzinompatienten zu identifizieren. Mehr noch sind beide potentiell nicht-invasive Urinbiomarker, wie Urin Blots und LC-MRM-MS Versuche bestätigen. Für TTC38 konnte außerdem verdeutlicht werden, dass dieses Protein auch funktionell in der Prostatakarzinomentwicklung eine Rolle in der Invasion und Migration spielt und potentielle Zielproteine und Interaktionspartner vor allem im Bereich der Transkription, des Zellzyklus, der

Proteintranslokation sowie der Genexpression, DNA Replikation, Rekombination und Reparatur zu finden sind. Weiter stellte sich Secernin-1 als vielversprechender Biomarker für die Diagnose des Prostatakarzinoms heraus, da es neben einer Herabregulation im Prostatakarzinom im Vergleich zum Normalgewebe in Entzündungen keinen Unterschied in der Expression zum umgebenden nicht-entzündetem Gewebe aufwies.

LC-MRM-MS Analysen bestätigen weiterhin den schon in der Literatur bekannten potentiellen Nutzen von Galectin-3 und PAP als Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom, wobei sie gleichzeitig als potentielle nicht-invasive Urinbiomarker identifiziert wurden. Zusätzlich zeigten und validierten diese Analysen wie vielversprechend das LC-MRM-MS als Tool zur Biomarkervalidierung ist und weshalb ihr aufgrund der Zuverlässigkeit Chancen eingeräumt werden, eines Tages auch in der Klinik eingesetzt werden zu können (Picotti und Aebersold, 2012; Percy et al., 2013). IPA Analysen der identifizierten Proteine zeigten zudem, dass vielversprechende Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom vor allem solche Proteine sind, die in Proliferation und zellulärer Bewegung involviert sind.

5.7 Ausblick

Die vielversprechendsten Kandidatenbiomarker für das Prostatakarzinom, die identifiziert wurden, sind TTC38, Vinculin, prostataspezifische saure Phosphatase und Galectin-3. Die identifizierten Proteine sind putative neue Biomarker zur Identifikation von Patienten mit hohem Rezidivrisiko. So werden z.B. prostataspezifische saure Phosphatase und Galectin-3 in der Literatur bereits als Marker für das aggressive Prostatakarzinom diskutiert. Auch Vinculin wurde bereits als mit dem Prostatakarzinom assoziiert beschrieben.

Diese Arbeit zeigt, dass es mit Hilfe proteombasierter Methoden möglich ist, im primären Tumorgewebe interessante Proteinkandidaten zur Identifizierung von Prostatakarzinompatienten mit hohem Rezidivrisiko zu finden. Die identifizierten Proteine sind putative neue Biomarker und werden in unserem Labor an einem großen Patientenkollektiv mittels Tissue Microarray und LC-MRM-MS derzeit weiter validiert. Nichts desto Trotz sind die hier aufgezeigten potentielle Biomarker noch weit von einem klinischen Einsatz entfernt. Um einen potentiellen klinischen Einsatz der Proteine als Biomarker zu ermöglichen sind weitere intensive Studien an großen Patientenkollektiven über die derzeit weitergehenden Arbeiten hinaus nötig. Bestätigen sich die Biomarker einzeln oder als Panel als zuverlässig in der Detektion des rezidivierenden Prostatakarzinoms ist die Entwicklung eines kostengünstig und schnell durchführbaren Tests nötig. Diese Arbeit legt nahe, dass neben ELISA auch die Methode der LC-MRM-MS bei entsprechender Weiterentwicklung ein mögliches alternatives, schnelles und günstiges Testverfahren darstellt. Diese Methode wird des Weiteren sicher in Zukunft ihren unverzichtbaren Platz als Hochdurchsatzmethode in der proteomischen Biomarkervalidierung einnehmen.

6 Literaturverzeichnis

- Aebersold, R. und M. Mann. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422 (2003): 198-207.
- Ahmed, H. Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples. *Biomark Cancer* 2 (2010): 17-33.
- Ahmed, H., F. Cappello, V. Rodolico und G. R. Vasta. Evidence of heavy methylation in the galectin 3 promoter in early stages of prostate adenocarcinoma: development and validation of a methylated marker for early diagnosis of prostate cancer. *Transl Oncol* 2 (2009): 146-56.
- Alberts und Jaenicke. *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage: Weinheim, Wiley-VCH, 2004.
- Allan, R. K. und T. Ratajczak. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones* 16 (2011): 353-67.
- Alva, A. und M. Hussain. The changing natural history of metastatic prostate cancer. *Cancer J* 19 (2013): 19-24.
- Andriole, G. L., E. D. Crawford, R. L. Grubb, S. S. Buys, D. Chia, T. R. Church, M. N. Fouad, E. P. Gelmann, P. A. Kvale, D. J. Reding, J. L. Weissfeld, L. A. Yokochi, B. O'Brien, J. D. Clapp, J. M. Rathmell, T. L. Riley, R. B. Hayes, B. S. Kramer, G. Izmirlian, A. B. Miller, P. F. Pinsky, P. C. Prorok, J. K. Gohagan und C. D. Berg. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 360 (2009): 1310-9.
- Anzuini, F., A. Battistella und A. Izzotti. Physical activity and cancer prevention: a review of current evidence and biological mechanisms. *J Prev Med Hyg* 52 (2011): 174-80.
- Ashcroft, A. E. An Introduction to Mass Spectrometry. <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>.
- Ashida, S., H. Nakagawa, T. Katagiri, M. Furihata, M. Iizumi, Y. Anazawa, T. Tsunoda, R. Takata, K. Kasahara, T. Miki, T. Fujioka, T. Shuin und Y. Nakamura. Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs. *Cancer Res* 64 (2004): 5963-72.
- ATCC. Primary cell culture guide - tips and techniques for culturing primary cells. (2012).
- Aufderklamm, S., T. Todenhofer, G. Gakis, S. Kruck, J. Hennenlotter, A. Stenzl und C. Schwentner. Thymidine kinase and cancer monitoring. *Cancer Lett* 316 (2012): 6-10.
- Avances, C., V. Georget, B. Terouanne, F. Orio, O. Cussenot, N. Mottet, P. Costa und C. Sultan. Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens. *Mol Cell Endocrinol* 184 (2001): 13-24.
- Aygun, C. Small cell carcinoma of the prostate: a case report and review of the literature. *Md Med J* 46 (1997): 353-6.
- Banez, L. L., L. Sun, G. J. van Leenders, T. M. Wheeler, C. H. Bangma, S. J. Freedland, M. M. Ittmann, A. L. Lark, J. F. Madden, A. Hartman, G. Weiss und E. Castanos-Velez. Multicenter clinical validation of PITX2 methylation as a prostate specific antigen recurrence predictor in patients with post-radical prostatectomy prostate cancer. *J Urol* 184 (2010): 149-56.
- Bangma, C. H., M. J. Roobol und E. W. Steyerberg. Predictive models in diagnosing indolent cancer. *Cancer* 115 (2009): 3100-6.
- Barr, J. R., V. L. Maggio, D. G. Patterson, Jr., G. R. Cooper, L. O. Henderson, W. E. Turner, S. J. Smith, W. H. Hannon, L. L. Needham und E. J. Sampson. Isotope dilution--mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I. *Clin Chem* 42 (1996): 1676-82.
- Bast, Kufe und Pollock. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 5. Auflage Hamilton (ON): BC Decker, 2000.
- Bastian, P. J., B. H. Carter, A. Bjartell, M. Seitz, P. Stanislaus, F. Montorsi, C. G. Stief und F. Schroder. Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *Eur Urol* 55 (2009): 1321-30.
- Ben-Shlomo, Y., S. Evans, F. Ibrahim, B. Patel, K. Anson, F. Chinegwundoh, C. Corbishley, D. Dorling, B. Thomas, D. Gillatt, R. Kirby, G. Muir, V. Nargund, R. Popert, C. Metcalfe und R. Persad. The risk of prostate cancer amongst black men in the United Kingdom: the PROCESS cohort study. *Eur Urol* 53 (2008): 99-105.
- Berridge, M. V., P. M. Herst und A. S. Tan. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11 (2005): 127-52.
- Bertz, J., Dahm, S., Haberland, J., Kraywinkel, K., Kurth, B.-M., Wolf, U. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland, Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. (2012).
- Bhavsar, T., P. McCue und R. Birbe. Molecular diagnosis of prostate cancer: are we up to age? *Semin Oncol* 40 (2013): 259-75.
- Bickers, B. und C. Aukim-Hastie. New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer - the post PSA era. *Anticancer Res* 29 (2009): 3289-98.
- Bishop, J. M. The molecular genetics of cancer. *Science* 235 (1987): 305-11.

- Bismar, T. A., F. Demichelis, A. Riva, R. Kim, S. Varambally, L. He, J. Kutok, J. C. Aster, J. Tang, R. Kuefer, M. D. Hofer, P. G. Febbo, A. M. Chinnaiyan und M. A. Rubin. Defining aggressive prostate cancer using a 12-gene model. *Neoplasia* 8 (2006): 59-68.
- Blatch, G. L. und M. Lasse. The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21 (1999): 932-9.
- Bogdanowicz, J. F., F. M. Bentvelsen, R. Oosterom und F. H. Schroeder. Evaluation of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in untreated prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 138 (1991): 97-103.
- Bonkhoff, H. und R. Berges. From pathogenesis to prevention of castration resistant prostate cancer. *Prostate* 70 (2010): 100-12.
- Bonkhoff, H. und K. Remberger. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 28 (1996): 98-106.
- Bostwick, D. G., H. B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S. M. Ho, J. Landolph, H. Morrison, B. Sonawane, T. Shifflett, D. J. Waters und B. Timms. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101 (2004): 2371-490.
- Bouck, N., V. Stellmach und S. C. Hsu. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69 (1996): 135-74.
- Bratt, O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 168 (2002): 906-13.
- Brodeur, G. M. The involvement of oncogenes and suppressor genes in human neoplasia. *Adv Pediatr* 34 (1987): 1-44.
- Brooks, J. D., M. Weinstein, X. Lin, Y. Sun, S. S. Pin, G. S. Bova, J. I. Epstein, W. B. Isaacs und W. G. Nelson. CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7 (1998): 531-6.
- Brünner, N. *Dako Connection Molecular Pathology*. (2009): 1.
- Bryan, T. M. und T. R. Cech. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11 (1999): 318-24.
- Bubendorf, L., G. Sauter, H. Moch, H. P. Schmid, T. C. Gasser, P. Jordan und M. J. Mihatsch. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Pathol* 178 (1996): 437-41.
- Bucher, O. und H. Wartenberg. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 12. . Auflage: Hans Huber Verlag, 1997.
- Bussemakers, M. J., A. van Bokhoven, G. W. Verhaegh, F. P. Smit, H. F. Karthaus, J. A. Schalken, F. M. Debruyne, N. Ru und W. B. Isaacs. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 59 (1999): 5975-9.
- Büttner, R. und C. Thomas. *Allgemeine Pathologie*. 3. Auflage Stuttgart: Schattauer, 2003.
- Califice, S., V. Castronovo, M. Bracke und F. van den Brule. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* 23 (2004): 7527-36.
- Calle, E. E., C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond und M. J. Thun. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348 (2003): 1625-38.
- Cannon, G. M., Jr., P. C. Walsh, A. W. Partin und C. R. Pound. Prostate-specific antigen doubling time in the identification of patients at risk for progression after treatment and biochemical recurrence for prostate cancer. *Urology* 62 Suppl 1 (2003): 2-8.
- Carver, L. A. und J. E. Schnitzer. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer* 3 (2003): 571-81.
- Chambers, A. F. und L. M. Matrisian. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89 (1997): 1260-70.
- Chan, J. M. und E. L. Giovannucci. Dairy products, calcium, and vitamin D and risk of prostate cancer. *Epidemiol Rev* 23 (2001): 87-92.
- Chan, J. M., M. J. Stampfer, J. Ma, P. H. Gann, J. M. Gaziano und E. L. Giovannucci. Dairy products, calcium, and prostate cancer risk in the Physicians' Health Study. *Am J Clin Nutr* 74 (2001): 549-54.
- Chen, C. S., S. S. Wang, J. R. Li, C. L. Cheng, C. R. Yang, W. M. Chen, Y. C. Ou, H. C. Ho, K. Y. Chiu und C. K. Yang. PSA density as a better predictor of prostate cancer than percent-free PSA in a repeat biopsy. *J Chin Med Assoc* 74 (2011): 552-5.
- Chen, G., T. G. Gharib, C. C. Huang, J. M. Taylor, D. E. Misek, S. L. Kardia, T. J. Giordano, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer, S. M. Hanash und D. G. Beer. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1 (2002): 304-13.
- Chen, Z., H. Chen und T. A. Stamey. Prostate specific antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization. *J Urol* 157 (1997): 2166-70.

- Chen, Z., Z. Fan, J. E. McNeal, R. Nolley, M. C. Caldwell, M. Mahadevappa, Z. Zhang, J. A. Warrington und T. A. Stamey. Hepsin and maspin are inversely expressed in laser capture microdissected prostate cancer. *J Urol* 169 (2003): 1316-9.
- Chetcuti, A., S. H. Margan, P. Russell, S. Mann, D. S. Millar, S. J. Clark, J. Rogers, D. J. Handelsman und Q. Dong. Loss of annexin II heavy and light chains in prostate cancer and its precursors. *Cancer Res* 61 (2001): 6331-4.
- Chignard, N. und L. Beretta. Proteomics for hepatocellular carcinoma marker discovery. *Gastroenterology* 127 (2004): S120-5.
- Chou, R., J. M. Croswell, T. Dana, C. Bougatsos, I. Blazina, R. Fu, K. Gleitsmann, H. C. Koenig, C. Lam, A. Maltz, J. B. Ruge und K. Lin. Screening for prostate cancer: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 155 (2011): 762-71.
- Christofori, G. und H. Semb. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24 (1999): 73-6.
- Chung, L. W., A. Baseman, V. Assikis und H. E. Zhau. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol* 173 (2005): 10-20.
- Cima, I., R. Schiess, P. Wild, M. Kaelin, P. Schuffler, V. Lange, P. Picotti, R. Ossola, A. Templeton, O. Schubert, T. Fuchs, T. Leippold, S. Wyler, J. Zehetner, W. Jochum, J. Buhmann, T. Cerny, H. Moch, S. Gillessen, R. Aebersold und W. Krek. Cancer genetics-guided discovery of serum biomarker signatures for diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011): 3342-7.
- Coman, D. R. Mechanisms responsible for the origin and distribution of blood-borne tumor metastases: a review. *Cancer Res* 13 (1953): 397-404.
- Corn, P. G. und T. C. Thompson. Identification of a novel prostate cancer biomarker, caveolin-1: Implications and potential clinical benefit. *Cancer Manag Res* 2 (2010): 111-22.
- Corona, G., E. De Lorenzo, C. Elia, M. P. Simula, C. Avellini, U. Baccarani, F. Lupo, C. Tiribelli, A. Colombatti und G. Toffoli. Differential proteomic analysis of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 36 (2010): 93-9.
- Coussens, L. M. und Z. Werb. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* 3 (1996): 895-904.
- D'Amico, A. V., R. Whittington, S. B. Malkowicz, D. Schultz, K. Blank, G. A. Broderick, J. E. Tomaszewski, A. A. Renshaw, I. Kaplan, C. J. Beard und A. Wein. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 280 (1998): 969-74.
- Damber, J. E. und G. Aus. Prostate cancer. *Lancet* 371 (2008): 1710-21.
- Daneshmand, S., M. L. Quek, E. Lin, C. Lee, R. J. Cote, D. Hawes, J. Cai, S. Groshen, G. Lieskovsky, D. G. Skinner, A. S. Lee und J. Pinski. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Hum Pathol* 38 (2007): 1547-52.
- de Kok, J. B., G. W. Verhaegh, R. W. Roelofs, D. Hessels, L. A. Kiemeny, T. W. Aalders, D. W. Swinkels und J. A. Schalken. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 62 (2002): 2695-8.
- de Melo-Junior, M. R., J. L. Araujo-Filho, C. A. Lins, N. T. de Pontes-Filho und L. B. de Carvalho, Jr. Immobilization of anti-galectin-3 onto polysiloxane-polyvinyl alcohol disks for tumor prostatic diseases diagnosis. *Appl Biochem Biotechnol* 160 (2010): 2198-207.
- DeLongchamps, N. B., A. Singh und G. P. Haas. The role of prevalence in the diagnosis of prostate cancer. *Cancer Control* 13 (2006): 158-68.
- DeMarzo, A. M., W. G. Nelson, W. B. Isaacs und J. I. Epstein. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 361 (2003): 955-64.
- Demichelis, F., K. Fall, S. Perner, O. Andren, F. Schmidt, S. R. Setlur, Y. Hoshida, J. M. Mosquera, Y. Pawitan, C. Lee, H. O. Adami, L. A. Mucci, P. W. Kantoff, S. O. Andersson, A. M. Chinnaiyan, J. E. Johansson und M. A. Rubin. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 26 (2007): 4596-9.
- DeNardo, D. G., P. Andreu und L. M. Coussens. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 29 (2010): 309-16.
- DGU. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms 1.03 Auflage Düsseldorf: Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V, 2011.
- Dhanasekaran, S. M., T. R. Barrette, D. Ghosh, R. Shah, S. Varambally, K. Kurachi, K. J. Pienta, M. A. Rubin und A. M. Chinnaiyan. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412 (2001): 822-6.
- Dhir, R., B. Vietmeier, J. Arlotti, M. Acquafondata, D. Landsittel, R. Masterson und R. H. Getzenberg. Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies. *J Urol* 171 (2004): 1419-23.
- Di Fiore, P. P., J. H. Pierce, M. H. Kraus, O. Segatto, C. R. King und S. A. Aaronson. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237 (1987): 178-82.

- Domanski, D., A. J. Percy, J. Yang, A. G. Chambers, J. S. Hill, G. V. Freue und C. H. Borchers. MRM-based multiplexed quantitation of 67 putative cardiovascular disease biomarkers in human plasma. *Proteomics* 12 (2012): 1222-43.
- Dunham, I., N. Shimizu, B. A. Roe, S. Chisoe, A. R. Hunt, J. E. Collins, R. Bruskiewich, D. M. Beare, M. Clamp, L. J. Smink, R. Ainscough, J. P. Almeida, A. Babbage, C. Bagguley, J. Bailey, K. Barlow, K. N. Bates, O. Beasley, C. P. Bird, S. Blakey, A. M. Bridgeman, D. Buck, J. Burgess, W. D. Burrill, K. P. O'Brien und et al. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 402 (1999): 489-95.
- Ellerhorst, J., P. Troncoso, X. C. Xu, J. Lee und R. Lotan. Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. *Urol Res* 27 (1999): 362-7.
- Elston und Ellis. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. 19(5): 403-10. Auflage: Histopathology, 1991.
- Emmert-Buck, M. R., C. D. Vocke, R. O. Pozzatti, P. H. Duray, S. B. Jennings, C. D. Florence, Z. Zhuang, D. G. Bostwick, L. A. Liotta und W. M. Linehan. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 55 (1995): 2959-62.
- Ensembl. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000075234;r=22:46663858-46689905. (02-04-2014).
- Epstein, J. I. An update of the Gleason grading system. *J Urol* 183 (2010): 433-40.
- Faller, A. Der Körper des Menschen. 13. Auflage Stuttgart: Thieme, 1999.
- Fan, J., D. Yan, M. Teng, H. Tang, C. Zhou, X. Wang, D. Li, G. Qiu und Z. Peng. Digital transcript profile analysis with aRNA-LongSAGE validates FERMT1 as a potential novel prognostic marker for colon cancer. *Clin Cancer Res* 17 (2011): 2908-18.
- Fang, L. C., M. Dattoli, A. Taira, L. True, R. Sorace und K. Wallner. Prostatic acid phosphatase adversely affects cause-specific survival in patients with intermediate to high-risk prostate cancer treated with brachytherapy. *Urology* 71 (2008): 146-50.
- Fearon, E. R. und B. Vogelstein. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (1990): 759-67.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong und C. M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246 (1989): 64-71.
- Feuerstein, I., M. Rainer, K. Bernardo, G. Stecher, C. W. Huck, K. Kofler, A. Pelzer, W. Horninger, H. Klocker, G. Bartsch und G. K. Bonn. Derivatized cellulose combined with MALDI-TOF MS: a new tool for serum protein profiling. *J Proteome Res* 4 (2005): 2320-6.
- Fink, L., W. Seeger, L. Ermert, J. Hanze, U. Stahl, F. Grimminger, W. Kummer und R. M. Bohle. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4 (1998): 1329-33.
- Ford, O. H., 3rd, C. W. Gregory, D. Kim, A. B. Smitherman und J. L. Mohler. Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol* 170 (2003): 1817-21.
- Foulds, L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14 (1954): 327-39.
- Fraley, E. E., S. Ecker und M. M. Vincent. Spontaneous in vitro neoplastic transformation of adult human prostatic epithelium. *Science* 170 (1970): 540-2.
- Fujita, K., C. M. Ewing, D. Y. Chan, L. A. Mangold, A. W. Partin, W. B. Isaacs und C. P. Pavlovich. Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. *Int J Cancer* 124 (2009): 664-9.
- Fynan, T. M. und M. Reiss. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 4 (1993): 493-540.
- Gann, P. H. Risk factors for prostate cancer. *Rev Urol* 4 Suppl 5 (2002): S3-S10.
- Gao, X., J. Pang, L. Y. Li, W. P. Liu, J. M. Di, Q. P. Sun, Y. Q. Fang, X. P. Liu, X. Y. Pu, D. He, M. T. Li, Z. L. Su und B. Y. Li. Expression profiling identifies new function of collapsin response mediator protein 4 as a metastasis-suppressor in prostate cancer. *Oncogene* 29 (2010): 4555-66.
- Garland, C. F., E. D. Gorham, S. B. Mohr und F. C. Garland. Vitamin D for cancer prevention: global perspective. *Ann Epidemiol* 19 (2009): 468-83.
- Gay, F., Y. Estornes, J. C. Saurin, M. O. Joly-Pharaboz, E. Friederich, J. Y. Scoazec und J. Abello. In colon carcinogenesis, the cytoskeletal protein gelsolin is down-regulated during the transition from adenoma to carcinoma. *Hum Pathol* 39 (2008): 1420-30.
- Gayther, S. A., K. A. de Foy, P. Harrington, P. Pharoah, W. D. Dunsmuir, S. M. Edwards, C. Gillett, A. Ardern-Jones, D. P. Dearnaley, D. F. Easton, D. Ford, R. J. Shearer, R. S. Kirby, A. L. Dowe, J. Kelly, M. R. Stratton, B. A. Ponder, D. Barnes und R. A. Eeles. The frequency of germ-line mutations in the breast cancer predisposition genes BRCA1 and BRCA2 in familial prostate cancer. The Cancer Research Campaign/British Prostate Group United Kingdom Familial Prostate Cancer Study Collaborators. *Cancer Res* 60 (2000): 4513-8.
- George, B. Funktionelle Charakterisierung von TTC38 mit Hilfe der stabil transfizierten Prostatakarzinomzelllinie PC3. Bachelorarbeit, Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, 2013.

- Ghosh, A., X. Wang, E. Klein und W. D. Heston. Novel role of prostate-specific membrane antigen in suppressing prostate cancer invasiveness. *Cancer Res* 65 (2005): 727-31.
- Gleason, D. F. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 23 (1992): 273-9.
- Gleason, D. F. und G. T. Mellinger. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111 (1974): 58-64.
- Glick B, Pasternak J. . *Molekulare Biotechnologie*. 1. Auflage Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
- Goel, M. M., D. Agrawal, S. M. Natu und A. Goel. Hepsin immunohistochemical expression in prostate cancer in relation to Gleason's grade and serum prostate specific antigen. *Indian J Pathol Microbiol* 54 (2011): 476-81.
- Goessl, C., H. Krause, M. Muller, R. Heicappell, M. Schrader, J. Sachsinger und K. Miller. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 60 (2000): 5941-5.
- Gollapalli, K., S. Ray, R. Srivastava, D. Renu, P. Singh, S. Dhali, J. Bajpai Dikshit, R. Srikanth, A. Moiyadi und S. Srivastava. Investigation of serum proteome alterations in human glioblastoma multiforme. *Proteomics* 12 (2012): 2378-90.
- Goo, Y. A. und D. R. Goodlett. Advances in proteomic prostate cancer biomarker discovery. *J Proteomics* 73 (2010): 1839-50.
- Gorstein, F. und T. L. Anderson. Malignant mixed mesodermal tumors: carcinoma, sarcoma, or both? *Hum Pathol* 22 (1991): 207-9.
- Gregory, C. W., X. Fei, L. A. Ponguta, B. He, H. M. Bill, F. S. French und E. M. Wilson. Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *J Biol Chem* 279 (2004): 7119-30.
- Gregory, C. W., B. He, R. T. Johnson, O. H. Ford, J. L. Mohler, F. S. French und E. M. Wilson. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 61 (2001): 4315-9.
- Grivennikov, S. I., F. R. Greten und M. Karin. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140 (2010): 883-99.
- Gronberg, H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 361 (2003): 859-64.
- Grossmann, M. und G. Wittert. Androgens, diabetes and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 19 (2012): F47-62.
- Guazzoni, G., M. Lazzeri, L. Nava, G. Lughezzani, A. Larcher, V. Scattoni, G. M. Gadda, V. Bini, A. Cestari, N. M. Buffi, M. Freschi, P. Rigatti und F. Montorsi. Preoperative Prostate-Specific Antigen Isoform p2PSA and Its Derivatives, %p2PSA and Prostate Health Index, Predict Pathologic Outcomes in Patients Undergoing Radical Prostatectomy for Prostate Cancer. *Eur Urol* (2011).
- Gumpp, V. und H. Henß. *Klinisches Krebsregister Kodierhilfe - Prostata* (1). Tumorzentrum Ludwig Heilmeyer, Comprehensive Cancer Center Freiburg (2010).
- Gumus, B. H., N. Nese, M. I. Gunduz, A. R. Kandiloglu, Y. Ceylan und C. Buyuksu. Does asymptomatic inflammation increase PSA? A histopathological study comparing benign and malignant tissue biopsy specimens. *Int Urol Nephrol* 36 (2004): 549-53.
- Gutman, A. B. und E. B. Gutman. An "acid" phosphatase occurring in the serum of patients with metastasizing carcinoma of the prostate gland. *J Clin Invest* 17 (1938): 473-8.
- Haese, A., A. de la Taille, H. van Poppel, M. Marberger, A. Stenzl, P. F. Mulders, H. Huland, C. C. Abbou, M. Remzi, M. Tinzl, S. Feyerabend, A. B. Stillebroer, M. P. van Gils und J. A. Schalken. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol* 54 (2008): 1081-8.
- Halkidou, K., V. J. Gnanapragasam, P. B. Mehta, I. R. Logan, M. E. Brady, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal und C. N. Robson. Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene* 22 (2003): 2466-77.
- Han, M., A. W. Partin, S. Piantadosi, J. I. Epstein und P. C. Walsh. Era specific biochemical recurrence-free survival following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol* 166 (2001): 416-9.
- Hanahan, D. und J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86 (1996): 353-64.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (2000): 57-70.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (2011): 646-74.
- Hankey, B. F., E. J. Feuer, L. X. Clegg, R. B. Hayes, J. M. Legler, P. C. Prorok, L. A. Ries, R. M. Merrill und R. S. Kaplan. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer - part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst* 91 (1999): 1017-24.
- Hansel, D. E., A. M. DeMarzo, E. A. Platz, S. Jadallah, J. Hicks, J. I. Epstein, A. W. Partin und G. J. Netto. Early prostate cancer antigen expression in predicting presence of prostate cancer in men with histologically negative biopsies. *J Urol* 177 (2007): 1736-40.

- Hatina, J., W. Huckenbeck, H. Rieder, H. H. Seifert und W. A. Schulz. [Bladder carcinoma cell lines as models of the pathobiology of bladder cancer. Review of the literature and establishment of a new progression series]. *Urologe A* 47 (2008): 724-34.
- Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains *Exp Cell Res* 37 (1965): 614-36.
- Hegarty, J., P. V. Beirne, E. Walsh, H. Comber, T. Fitzgerald und M. Wallace Kazer. Radical prostatectomy versus watchful waiting for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev* (2010): CD006590.
- Heidenreich, A., J. Bellmunt, M. Bolla, S. Joniau, M. Mason, V. Matveev, N. Mottet, H. P. Schmid, T. van der Kwast, T. Wiegel und F. Zattoni. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol* 59 (2011): 61-71.
- Henkel, C., M. Roderfeld, R. Weiskirchen, B. Scheibe, S. Matern und E. Roeb. Identification of fibrosis-relevant proteins using DIGE (difference in gel electrophoresis) in different models of hepatic fibrosis. *Z Gastroenterol* 43 (2005): 23-9.
- Herman, J. G. und S. B. Baylin. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349 (2003): 2042-54.
- Hessels, D., J. M. Klein Gunnewiek, I. van Oort, H. F. Karthaus, G. J. van Leenders, B. van Balken, L. A. Kiemeny, J. A. Witjes und J. A. Schalken. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 44 (2003): 8-15; discussion 15-6.
- Hinev, A. I., V. I. Hadjiev und N. H. Kolev. Validation of preoperative nomograms predicting lymph node involvement in prostate cancer: a Bi-institutional study. *Eur Urol* 60 (2011): 1310-1.
- Hochreiter, W. W. The issue of prostate cancer evaluation in men with elevated prostate-specific antigen and chronic prostatitis. *Andrologia* 40 (2008): 130-3.
- Hofer, M. D., R. Kuefer, S. Varambally, H. Li, J. Ma, G. I. Shapiro, J. E. Gschwend, R. E. Hautmann, M. G. Sanda, K. Giehl, A. Menke, A. M. Chinnaiyan und M. A. Rubin. The role of metastasis-associated protein 1 in prostate cancer progression. *Cancer Res* 64 (2004): 825-9.
- Hoffman, R. M., F. D. Gilliland, J. W. Eley, L. C. Harlan, R. A. Stephenson, J. L. Stanford, P. C. Albertson, A. S. Hamilton, W. C. Hunt und A. L. Potosky. Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst* 93 (2001): 388-95.
- Hollis, B. W., D. T. Marshall, S. J. Savage, E. Garrett-Mayer, M. S. Kindy und S. Gattoni-Celli. Vitamin D3 supplementation, low-risk prostate cancer, and health disparities. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136 (2013): 233-7.
- Horoszewicz, J. S., S. S. Leong, T. M. Chu, Z. L. Wajsman, M. Friedman, L. Papsidero, U. Kim, L. S. Chai, S. Kakati, S. K. Arya und A. A. Sandberg. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37 (1980): 115-32.
- Horoszewicz, J. S., S. S. Leong, E. Kawinski, J. P. Karr, H. Rosenthal, T. M. Chu, E. A. Mirand und G. P. Murphy. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43 (1983): 1809-18.
- Hosako, M., T. Muto, Y. Nakamura, K. Tsuta, N. Tochigi, H. Tsuda, H. Asamura, T. Tomonaga, A. Kawai und T. Kondo. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J Proteomics* 75 (2012): 833-44.
- Hsing, A. W. und A. P. Chokkalingam. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci* 11 (2006): 1388-413.
- Hsu, C. Y., S. Joniau, R. Oyen, T. Roskams und H. Van Poppel. Detection of clinical unilateral T3a prostate cancer - by digital rectal examination or transrectal ultrasonography? *BJU Int* 98 (2006): 982-5.
- Hudson, D. L., M. O'Hare, F. M. Watt und J. R. Masters. Proliferative heterogeneity in the human prostate: evidence for epithelial stem cells. *Lab Invest* 80 (2000): 1243-50.
- Huggins, C. und C. V. Hodges. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin* 22 (1972): 232-40.
- Huggins, C. und C. V. Hodges. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* 168 (2002): 9-12.
- Huggins, C., R. E. Stevens, Jr und C. V. Hodges. Studies on prostatic cancer: II. the effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Archives of Surgery* 43 (1941): 209-23.
- Humphrey, P. A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* 17 (2004): 292-306.
- Huttenhain, R., J. Malmstrom, P. Picotti und R. Aebersold. Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification. *Curr Opin Chem Biol* 13 (2009): 518-25.
- Ilic, D., M. M. Neuberger, M. Djulbegovic und P. Dahm. Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 1 (2013): CD004720.
- Jeong, D. H., H. K. Kim, A. E. Prince, D. S. Lee, Y. N. Kim, J. Han und K. T. Kim. Plasma proteomic analysis of patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Gynecol Oncol* 19 (2008): 173-80.

- Jiang, Z., B. A. Woda, K. L. Rock, Y. Xu, L. Savas, A. Khan, G. Pihan, F. Cai, J. S. Babcook, P. Rathanaswami, S. G. Reed, J. Xu und G. R. Fanger. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol* 25 (2001): 1397-404.
- Jimenez, C. R., S. Piersma und T. V. Pham. High-throughput and targeted in-depth mass spectrometry-based approaches for biofluid profiling and biomarker discovery. *Biomark Med* 1 (2007): 541-65.
- Johansson, J. E., O. Andren, S. O. Andersson, P. W. Dickman, L. Holmberg, A. Magnuson und H. O. Adami. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA* 291 (2004): 2713-9.
- Jung, Y., Y. Shiozawa, J. Wang, Z. Wang, E. A. Pedersen, C. H. Lee, C. L. Hall, P. J. Hogg, P. H. Krebsbach, E. T. Keller und R. S. Taichman. Expression of PGK1 by prostate cancer cells induces bone formation. *Mol Cancer Res* 7 (2009): 1595-604.
- Kaighn, M. E., K. S. Narayan, Y. Ohnuki, J. F. Lechner und L. W. Jones. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17 (1979): 16-23.
- Kallioniemi, O. P., U. Wagner, J. Kononen und G. Sauter. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 10 (2001): 657-62.
- Kang, J. S., B. F. Calvo, S. J. Maygarden, L. S. Caskey, J. L. Mohler und D. K. Ornstein. Dysregulation of annexin I protein expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8 (2002): 117-23.
- Karam, J. A., Y. Lotan, C. G. Roehrborn, R. Ashfaq, P. I. Karakiewicz und S. F. Shariat. Caveolin-1 overexpression is associated with aggressive prostate cancer recurrence. *Prostate* 67 (2007): 614-22.
- Karnoub, A. E. und R. A. Weinberg. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis* 26 (2006): 75-85.
- Karp, N. A., R. Feret, D. V. Rubtsov und K. S. Lilley. Comparison of DIGE and post-stained gel electrophoresis with both traditional and SameSpots analysis for quantitative proteomics. *Proteomics* 8 (2008): 948-60.
- Kaulen, H. Biomarker: Plausibilität und Korrelation allein reichen nicht aus. *Deutsches Ärzteblatt* 104 (2007).
- Kawai, A., T. Kondo, Y. Suehara, K. Kikuta und S. Hirohashi. Global protein-expression analysis of bone and soft tissue sarcomas. *Clin Orthop Relat Res* 466 (2008): 2099-106.
- Kellner. Die Ausbreitung des Krebses. Invasion und Metastasierung. 1. Auflage München: Urban & Schwarzenberg, 1971.
- Kenis, H., L. Hofstra und C. P. Reutelingsperger. Annexin A5: shifting from a diagnostic towards a therapeutic realm. *Cell Mol Life Sci* 64 (2007): 2859-62.
- Khan, A. P., L. M. Poisson, V. B. Bhat, D. Fermin, R. Zhao, S. Kalyana-Sundaram, G. Michailidis, A. I. Nesvizhskii, G. S. Omenn, A. M. Chinnaiyan und A. Sreekumar. Quantitative proteomic profiling of prostate cancer reveals a role for miR-128 in prostate cancer. *Mol Cell Proteomics* 9 (2010): 298-312.
- Khan, M. A., A. W. Partin, L. A. Mangold, J. I. Epstein und P. C. Walsh. Probability of biochemical recurrence by analysis of pathologic stage, Gleason score, and margin status for localized prostate cancer. *Urology* 62 (2003): 866-71.
- Khoo, V. S., A. Pollack, D. Cowen, D. L. Joon, N. Patel, N. H. Terry, G. K. Zagars, A. C. von Eschenbach, M. L. Meistrich und P. Troncoso. Relationship of Ki-67 labeling index to DNA-ploidy, S-phase fraction, and outcome in prostate cancer treated with radiotherapy. *Prostate* 41 (1999): 166-72.
- Kikuta, K., M. Gotoh, T. Kanda, N. Tochigi, T. Shimoda, T. Hasegawa, H. Katai, Y. Shimada, Y. Suehara, A. Kawai, S. Hirohashi und T. Kondo. Pftin as a prognostic biomarker in gastrointestinal stromal tumor: novel monoclonal antibody and external validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol* 40 (2010): 60-72.
- Kim, R., M. Emi und K. Tanabe. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 121 (2007): 1-14.
- Kim, Y., V. Ignatchenko, C. Q. Yao, I. Kalatskaya, J. O. Nyalwidhe, R. S. Lance, A. O. Gramolini, D. A. Troyer, L. D. Stein, P. C. Boutros, J. A. Medin, O. J. Semmes, R. R. Drake und T. Kislinger. Identification of differentially expressed proteins in direct expressed prostatic secretions of men with organ-confined versus extracapsular prostate cancer. *Mol Cell Proteomics* 11 (2012): 1870-84.
- Kinzler, K. W. und B. Vogelstein. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386 (1997): 761, 63.
- Klein, E. Prostate cancer. *Urol Oncol* 26 (2008): 494.
- Knudsen, E. S. und K. E. Knudsen. Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle. *Exp Biol Med* (Maywood) 231 (2006): 1271-81.
- Knudson, A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (1971): 820-3.
- Kollermann, J., T. Schlomm, H. Bang, G. P. Schwall, C. von Eichel-Streiber, R. Simon, M. Schostak, H. Hülndt, W. Berg, G. Sauter, H. Klocker und A. Schrattenholz. Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate cancer. *Eur Urol* 54 (2008): 1314-23.

- Kondo, T. Tissue proteomics for cancer biomarker development: laser microdissection and 2D-DIGE. *BMB Rep* 41 (2008): 626-34.
- Kong, H. Y. und J. Byun. Emerging Roles of Human Prostatic Acid Phosphatase. *Biomol Ther (Seoul)* 21 (2013): 10-20.
- Kraywinkel, K., J. Bertz, A. Laudi und U. Wolf. Epidemiologie und Früherkennung häufiger Krebserkrankungen in Deutschland. GBE kompakt 3(4) Auflage Berlin: Robert Koch-Institut, 2012.
- Kreunin, P., J. Zhao, C. Rosser, V. Urquidi, D. M. Lubman und S. Goodison. Bladder cancer associated glycoprotein signatures revealed by urinary proteomic profiling. *J Proteome Res* 6 (2007): 2631-9.
- Kristiansen, G. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. *Histopathology* 60 (2012): 125-41.
- Kubota, D., H. Orita, A. Yoshida, M. Gotoh, T. Kanda, H. Tsuda, T. Hasegawa, H. Katai, Y. Shimada, K. Kaneko, A. Kawai und T. Kondo. Pftin as a prognostic biomarker for gastrointestinal stromal tumor: validation study in multiple clinical facilities. *Jpn J Clin Oncol* 41 (2011): 1194-202.
- Kuzyk, M. A., D. Smith, J. Yang, T. J. Cross, A. M. Jackson, D. B. Hardie, N. L. Anderson und C. H. Borchers. Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma. *Mol Cell Proteomics* 8 (2009): 1860-77.
- Labrie, F., A. Belanger, A. Dupont, V. Luu-The, J. Simard und C. Labrie. Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. *Clin Invest Med* 16 (1993): 475-92.
- Labrie, F., B. Candas, L. Cusan, J. L. Gomez, A. Belanger, G. Brousseau, E. Chevrete und J. Levesque. Screening decreases prostate cancer mortality: 11-year follow-up of the 1988 Quebec prospective randomized controlled trial. *Prostate* 59 (2004): 311-8.
- Lange, P. H., C. J. Ercole, D. J. Lightner, E. E. Fraley und R. Vessella. The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. *J Urol* 141 (1989): 873-9.
- Lapointe, J., C. Li, J. P. Higgins, M. van de Rijn, E. Bair, K. Montgomery, M. Ferrari, L. Egevad, W. Rayford, U. Bergerheim, P. Ekman, A. M. DeMarzo, R. Tibshirani, D. Botstein, P. O. Brown, J. D. Brooks und J. R. Pollack. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004): 811-6.
- Laxman, B., D. S. Morris, J. Yu, J. Siddiqui, J. Cao, R. Mehra, R. J. Lonigro, A. Tsodikov, J. T. Wei, S. A. Tomlins und A. M. Chinnaiyan. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res* 68 (2008): 645-9.
- Lee, E. K., H. Cho und C. W. Kim. Proteomic analysis of cancer stem cells in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 412 (2011): 279-85.
- Lee, H. K., D. Driscoll, H. Asch, B. Asch und P. J. Zhang. Downregulated gelsolin expression in hyperplastic and neoplastic lesions of the prostate. *Prostate* 40 (1999): 14-9.
- Lee, W. H., R. A. Morton, J. I. Epstein, J. D. Brooks, P. A. Campbell, G. S. Bova, W. S. Hsieh, W. B. Isaacs und W. G. Nelson. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994): 11733-7.
- Leman, E. S. und R. H. Getzenberg. Biomarkers for prostate cancer. *J Cell Biochem* 108 (2009): 3-9.
- Lemoine, J., T. Fortin, A. Salvador, A. Jaffuel, J. P. Charrier und G. Choquet-Kastylevsky. The current status of clinical proteomics and the use of MRM and MRM(3) for biomarker validation. *Expert Rev Mol Diagn* 12 (2012): 333-42.
- Li, Guo Hua, Pamela D. Arora, Yu Chen, Christopher A. McCulloch und Peter Liu. Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases. *Medicinal Research Reviews* 32 (2012): 999-1025.
- Liang, S. L. und D. W. Chan. Enzymes and related proteins as cancer biomarkers: a proteomic approach. *Clin Chim Acta* 381 (2007): 93-7.
- Liede, A., B. Y. Karlan und S. A. Narod. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol* 22 (2004): 735-42.
- Lilja, H., A. M. Cronin, A. Dahlin, J. Manjer, P. M. Nilsson, J. A. Eastham, A. S. Bjartell, P. T. Scardino, D. Ulmert und A. J. Vickers. Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50. *Cancer* 117 (2011): 1210-9.
- Lilley, K. S., A. Razzaq und P. Dupree. Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation. *Curr Opin Chem Biol* 6 (2002): 46-50.
- Lin, M. F., T. C. Meng, P. S. Rao, C. Chang, A. H. Schonthal und F. F. Lin. Expression of human prostatic acid phosphatase correlates with androgen-stimulated cell proliferation in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem* 273 (1998): 5939-47.
- Lin, X., M. Tascilar, W. H. Lee, W. J. Vles, B. H. Lee, R. Veeraswamy, K. Asgari, D. Freije, B. van Rees, W. R. Gage, G. S. Bova, W. B. Isaacs, J. D. Brooks, T. L. DeWeese, A. M. De Marzo und W. G. Nelson. GSTP1 CpG island

- hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am J Pathol* 159 (2001): 1815-26.
- Linja, M. J., K. J. Savinainen, O. R. Saramaki, T. L. Tammela, R. L. Vessella und T. Visakorpi. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 61 (2001): 3550-5.
- Liu, J. W., J. J. Shen, A. Tanzillo-Swartz, B. Bhatia, C. M. Maldonado, M. D. Person, S. S. Lau und D. G. Tang. Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. *Oncogene* 22 (2003): 1475-85.
- Liu, Y., X. Luo, H. Hu, R. Wang, Y. Sun, R. Zeng und H. Chen. Integrative proteomics and tissue microarray profiling indicate the association between overexpressed serum proteins and non-small cell lung cancer. *PLoS One* 7 (2012): e51748.
- Lleonart, ME., F. Vidal, D. Gallardo, M. Diaz-Fuertes, F. Rojo, M. Cuatrecasas, L. Lopez-Vicente, H. Kondoh, C. Blanco, A. Carnero und S. Ramon y Cajal. New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas. *Oncol Rep* 16 (2006): 603-8.
- Loberg, R. D., C. J. Logothetis, E. T. Keller und K. J. Pienta. Pathogenesis and treatment of prostate cancer bone metastases: targeting the lethal phenotype. *J Clin Oncol* 23 (2005): 8232-41.
- Loeb, L. A., K. R. Loeb und J. P. Anderson. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003): 776-81.
- Logothetis, C. J. und S. H. Lin. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5 (2005): 21-8.
- Lottspeich, F., Engels, J.W. *Bioanalytik. 2. Auflage* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2008.
- Lottspeich, F. und H. Zorbas. *Bioanalytik. 1. Auflage* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- Lu, S., Z. Tan, M. Wortman und Z. Dong. Regulation of heat shock protein 70-1 expression by androgen receptor and its signaling in human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 36 (2010): 459-67.
- Ludwig, J. A. und J. N. Weinstein. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 5 (2005): 845-56.
- Luo, J., S. Zha, W. R. Gage, T. A. Dunn, J. L. Hicks, C. J. Bennett, C. M. Ewing, E. A. Platz, S. Ferdinandusse, R. J. Wanders, J. M. Trent, W. B. Isaacs und A. M. De Marzo. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res* 62 (2002): 2220-6.
- Maffezzini, M., A. Bossi und L. Collette. Implications of prostate-specific antigen doubling time as indicator of failure after surgery or radiation therapy for prostate cancer. *Eur Urol* 51 (2007): 605-13; discussion 13.
- Magi-Galluzzi, C., J. Luo, W. B. Isaacs, J. L. Hicks, A. M. de Marzo und J. I. Epstein. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 27 (2003): 1128-33.
- Masters, J. R. Prostate cancer proteomics. *OMICS* 15 (2011): 169-71.
- Masters, J. R., J. A. Thomson, B. Daly-Burns, Y. A. Reid, W. G. Dirks, P. Packer, L. H. Toji, T. Ohno, H. Tanabe, C. F. Arlett, L. R. Kelland, M. Harrison, A. Virmani, T. H. Ward, K. L. Ayres und P. G. Debenham. Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001): 8012-7.
- Mayya, V., K. Rezual, L. Wu, M. B. Fong und D. K. Han. Absolute quantification of multisite phosphorylation by selective reaction monitoring mass spectrometry: determination of inhibitory phosphorylation status of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Proteomics* 5 (2006): 1146-57.
- McNeal, J. E. und D. G. Bostwick. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol* 17 (1986): 64-71.
- McNeal, J. E., E. A. Redwine, F. S. Freiha und T. A. Stamey. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 12 (1988): 897-906.
- Merlo, L. M., J. W. Pepper, B. J. Reid und C. C. Maley. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6 (2006): 924-35.
- Merseburger, A. S., M. W. Kramer, J. Hennenlotter, P. Simon, J. Knapp, J. T. Hartmann, A. Stenzl, J. Serth und M. A. Kuczyk. Involvement of decreased Galectin-3 expression in the pathogenesis and progression of prostate cancer. *Prostate* 68 (2008): 72-7.
- Meyer, H. E. und K. Stuhler. High-performance proteomics as a tool in biomarker discovery. *Proteomics* 7 Suppl 1 (2007): 18-26.
- Mickey, D. D., K. R. Stone, H. Wunderli, G. H. Mickey, R. T. Vollmer und D. F. Paulson. Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res* 37 (1977): 4049-58.
- Mierke, C. T. The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells. *Cell Biochem Biophys* 53 (2009): 115-26.

- Mikolajczyk, S. D., L. S. Millar, T. J. Wang, H. G. Rittenhouse, L. S. Marks, W. Song, T. M. Wheeler und K. M. Slawin. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Res* 60 (2000): 756-9.
- Minden, J. S., S. R. Dowd, H. E. Meyer und K. Stuhler. Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* 30 Suppl 1 (2009): S156-61.
- Mitra, A., C. Fisher, C. S. Foster, C. Jameson, Y. Barbachanno, J. Bartlett, E. Bancroft, R. Doherty, Z. Kote-Jarai, S. Peock, D. Easton und R. Eeles. Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. *Br J Cancer* 98 (2008): 502-7.
- Miyoshi, N., H. Ishii, K. Mimori, M. Sekimoto, Y. Doki und M. Mori. SCRN1 is a novel marker for prognosis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 101 (2010): 156-9.
- Moll, M. Funktionelle Charakterisierung des potentiellen Tumormarkers Tetratricopeptide repeat protein 38 (TTC38) für das rezidivierende Prostatakarzinom. Masterarbeit, Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, 2012.
- Montironi, R., R. Mazzucchelli, A. Lopez-Beltran, M. Scarpelli und L. Cheng. Prostatic intraepithelial neoplasia: its morphological and molecular diagnosis and clinical significance. *BJU Int* 108 (2011): 1394-401.
- Montironi, R., R. Mazzucchelli und M. Scarpelli. Precancerous lesions and conditions of the prostate: from morphological and biological characterization to chemoprevention. *Ann N Y Acad Sci* 963 (2002): 169-84.
- Mortezavi, A., T. Hermanns, H. H. Seifert, M. K. Baumgartner, M. Provenzano, T. Sulser, M. Burger, M. Montani, K. Ikenberg, F. Hofstadter, A. Hartmann, R. Jaggi, H. Moch, G. Kristiansen und P. J. Wild. KPNA2 expression is an independent adverse predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 17 (2011): 1111-21.
- Mougiakakos, D., A. Choudhury, A. Lladser, R. Kiessling und C. C. Johansson. Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 107 (2010): 57-117.
- Mukesh, Verma, Patel Payal und Verma Mudit. Biomarkers in Prostate Cancer Epidemiology. *Cancers* 3 (2011).
- Munch-Petersen, B. Reversible tetramerization of human TK1 to the high catalytic efficient form is induced by pyrophosphate, in addition to tripolyphosphates, or high enzyme concentration. *FEBS J* 276 (2009): 571-80.
- Munch-Petersen, B., G. Tyrsted und L. Cloos. Reversible ATP-dependent transition between two forms of human cytosolic thymidine kinase with different enzymatic properties. *J Biol Chem* 268 (1993): 15621-5.
- Mutahir, Z., A. R. Clausen, K. M. Andersson, S. M. Wisen, B. Munch-Petersen und J. Piskur. Thymidine kinase 1 regulatory fine-tuning through tetramer formation. *FEBS J* 280 (2013): 1531-41.
- Nakayama, M., C. J. Bennett, J. L. Hicks, J. I. Epstein, E. A. Platz, W. G. Nelson und A. M. De Marzo. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* 163 (2003): 923-33.
- Negrini, S., V. G. Gorgoulis und T. D. Halazonetis. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (2010): 220-8.
- Nelson-Rees, W. A. und R. R. Flandermeyer. HeLa cultures defined. *Science* 191 (1976): 96-8.
- Nelson, W. G., A. M. De Marzo, T. L. Deweese, X. Lin, J. D. Brooks, M. J. Putzi, C. P. Nelson, J. D. Groopman und T. W. Kensler. Preneoplastic prostate lesions: an opportunity for prostate cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 952 (2001): 135-44.
- Netter, F.-H. Atlas der Anatomie des Menschen. 3. Auflage Stuttgart: Thieme, 2006.
- Neve, R. M., K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J. P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P. T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N. J. Wang, W. L. Kuo, J. L. Stilwell, D. Pinkel, D. G. Albertson, F. M. Waldman, F. McCormick, R. B. Dickson, M. D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar und J. W. Gray. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10 (2006): 515-27.
- Nishimura, K., H. J. Ting, Y. Harada, T. Tokizane, N. Nonomura, H. Y. Kang, H. C. Chang, S. Yeh, H. Miyamoto, M. Shin, K. Aozasa, A. Okuyama und C. Chang. Modulation of androgen receptor transactivation by gelsolin: a newly identified androgen receptor coregulator. *Cancer Res* 63 (2003): 4888-94.
- Nordling, C. O. A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 7 (1953): 68-72.
- Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (1976): 23-8.
- O'Neill, E. E., C. J. Brock, A. F. von Kriegsheim, A. C. Pearce, R. A. Dwek, S. P. Watson und H. F. Hebestreit. Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics* 2 (2002): 288-305.
- Ornstein, D. K. und E. F. Petricoin, 3rd. Proteomics to diagnose human tumors and provide prognostic information. *Oncology (Williston Park)* 18 (2004): 521-9.
- Oshita, F., A. Morita, H. Ito, Y. Kameda, E. Tsuchiya, S. Asai und Y. Miyagi. Proteomic screening of completely resected tumors in relation to survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 24 (2010): 637-45.

- Ostrand-Rosenberg, S. und P. Sinha. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182 (2009): 4499-506.
- Pang, J., W. P. Liu, X. P. Liu, L. Y. Li, Y. Q. Fang, Q. P. Sun, S. J. Liu, M. T. Li, Z. L. Su und X. Gao. Profiling protein markers associated with lymph node metastasis in prostate cancer by DIGE-based proteomics analysis. *J Proteome Res* 9 (2010): 216-26.
- Patel, A., F. Dorey, J. Franklin und J. B. deKernion. Recurrence patterns after radical retropubic prostatectomy: clinical usefulness of prostate specific antigen doubling times and log slope prostate specific antigen. *J Urol* 158 (1997): 1441-5.
- Patel, A. R. und E. A. Klein. Risk factors for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 6 (2009): 87-95.
- Paulsen, F. und R. Lüllmann-Rauch. *Prostata. Taschenlehrbuch Histologie*. 4. Auflage Stuttgart: Thieme, 2012.
- Peng, B., C. Guo, H. Guan, S. Liu und M. Z. Sun. Annexin A5 as a potential marker in tumors. *Clin Chim Acta* 427 (2014): 42-8.
- Percy, A. J., A. G. Chambers, J. Yang und C. H. Borchers. Multiplexed MRM-based quantitation of candidate cancer biomarker proteins in undepleted and non-enriched human plasma. *Proteomics* 13 (2013): 2202-15.
- Picotti, P. und R. Aebersold. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat Methods* 9 (2012): 555-66.
- Ploussard, G., J. I. Epstein, R. Montironi, P. R. Carroll, M. Wirth, M. O. Grimm, A. S. Bjartell, F. Montorsi, S. J. Freedland, A. Erbersdobler und T. H. van der Kwast. The contemporary concept of significant versus insignificant prostate cancer. *Eur Urol* 60 (2011): 291-303.
- Pootrakul, L., R. H. Datar, S. R. Shi, J. Cai, D. Hawes, S. G. Groshen, A. S. Lee und R. J. Cote. Expression of stress response protein Grp78 is associated with the development of castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 12 (2006): 5987-93.
- Porter, C. R., K. Kodama, R. P. Gibbons, R. Correa, Jr., F. K. Chun, P. Perrotte und P. I. Karakiewicz. 25-year prostate cancer control and survival outcomes: a 40-year radical prostatectomy single institution series. *J Urol* 176 (2006): 569-74.
- Pound, C. R., A. W. Partin, M. A. Eisenberger, D. W. Chan, J. D. Pearson und P. C. Walsh. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 281 (1999): 1591-7.
- Pschyrembel. *Pschyrembel, klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage Berlin: De Gruyter, 2002.
- Pulukuri, S. M., C. S. Gondi, S. S. Lakka, A. Jutla, N. Estes, M. Gujrati und J. S. Rao. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem* 280 (2005): 36529-40.
- Qian, B. Z. und J. W. Pollard. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141 (2010): 39-51.
- Qian, J., R. B. Jenkins und D. G. Bostwick. Genetic and chromosomal alterations in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Eur Urol* 35 (1999): 479-83.
- Rauchenwald, M., F. Sedlmayer, T. Leitha, C. Zielinski und W. Hörtl. Das biochemische Rezidiv beim Prostatakarzinom. *Journal für Urologie und Urogynäkologie* 17 (2010): 6-11.
- Resendes, B. L., S. F. Kuo, N. G. Robertson, A. B. Giersch, D. Honrubia, O. Ohara, J. C. Adams und C. C. Morton. Isolation from cochlea of a novel human intronless gene with predominant fetal expression. *J Assoc Res Otolaryngol* 5 (2004): 185-202.
- RKI. *Prostataerkrankungen*, Heft 36. Auflage Berlin: Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt, 2007.
- RKI. *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 8. Auflage Berlin: Robert Koch-Institut (RKI), 2010.
- RKI. *Krebs in Deutschland 2007/2008*. 8. Auflage Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012.
- RKI. *Krebs in Deutschland 2007/2008. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.* 8. Ausgabe (2012).
- Roberts, S. G., M. L. Blute, E. J. Bergstralh, J. M. Slezak und H. Zincke. PSA doubling time as a predictor of clinical progression after biochemical failure following radical prostatectomy for prostate cancer. *Mayo Clin Proc* 76 (2001): 576-81.
- Roddam, A. W., N. E. Allen, P. Appleby und T. J. Key. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 100 (2008): 170-83.
- Rogers, C. G., G. Yan, S. Zha, M. L. Gonzalgo, W. B. Isaacs, J. Luo, A. M. De Marzo, W. G. Nelson und C. P. Pavlovich. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme a racemase protein. *J Urol* 172 (2004): 1501-3.
- Romanuik, T. L., T. Ueda, N. Le, S. Haile, T. M. Yong, T. Thomson, R. L. Vessella und M. D. Sadar. Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts. *Am J Pathol* 175 (2009): 2264-76.

- Rubin, M. A., M. Zhou, S. M. Dhanasekaran, S. Varambally, T. R. Barrette, M. G. Sanda, K. J. Pienta, D. Ghosh und A. M. Chinnaiyan. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 287 (2002): 1662-70.
- Ruiz, C., D. R. Holz, M. Oeggerli, S. Schneider, I. M. Gonzales, J. M. Kiefer, T. Zellweger, A. Bachmann, P. A. Koivisto, H. J. Helin, S. Mousses, M. T. Barrett, D. O. Azorsa und L. Bubendorf. Amplification and overexpression of vinculin are associated with increased tumour cell proliferation and progression in advanced prostate cancer. *J Pathol* 223 (2011): 543-52.
- Russell, Pamela J, Paul Jackson und Elizabeth A Kingsley. *Prostate Cancer Methods and Protocols*. 81. Auflage Totowa, New Jersey: Humana Press, 2003.
- Sabo, E., P. A. Meitner, R. Tavares, C. L. Corless, G. Y. Lauwers, S. F. Moss und M. B. Resnick. Expression analysis of Barrett's esophagus-associated high-grade dysplasia in laser capture microdissected archival tissue. *Clin Cancer Res* 14 (2008): 6440-8.
- Sahai, E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 15 (2005): 87-96.
- Sakr, W. A., D. J. Grignon, G. P. Haas, L. K. Heilbrun, J. E. Pontes und J. D. Crissman. Age and racial distribution of prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur Urol* 30 (1996): 138-44.
- Sakr, W. A., G. P. Haas, B. F. Cassin, J. E. Pontes und J. D. Crissman. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 150 (1993): 379-85.
- Salk, J. J., E. J. Fox und L. A. Loeb. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu Rev Pathol* 5 (2010): 51-75.
- Sanchez-Carbayo, M., N. D. Socci, L. Richstone, M. Corton, N. Behrendt, J. Wulke, B. Bochner, E. Petricoin und C. Cordon-Cardo. Genomic and proteomic profiles reveal the association of gelsolin to TP53 status and bladder cancer progression. *Am J Pathol* 171 (2007): 1650-8.
- Sandblom, G., E. Varenhorst, J. Rosell, O. Lofman und P. Carlsson. Randomised prostate cancer screening trial: 20 year follow-up. *Bmj* 31 (2011).
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977): 5463-7.
- Saraswati, S., A. S. Block, M. K. Davidson, R. G. Rank, M. Mahadevan und A. B. Diekman. Galectin-3 is a substrate for prostate specific antigen (PSA) in human seminal plasma. *Prostate* 71 (2011): 197-208.
- Sawada, N., M. Inoue, M. Iwasaki, S. Sasazuki, T. Yamaji, T. Shimazu und S. Tsugane. Alcohol and smoking and subsequent risk of prostate cancer in Japanese men: the Japan Public Health Center-based prospective study. *Int J Cancer* 134 (2014): 971-8.
- Schäffler A, Menche N. U. . *Mensch, Körper, Krankheit. Anatomie, Physiologie, Krankheitsbilder. Lehrbuch und Atlas für die Berufe im Gesundheitswesen*. edited by 3. Auflage München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 1999.
- Schatz, P., D. Dietrich, T. Koenig, M. Burger, A. Lukas, I. Fuhrmann, G. Kristiansen, R. Stoeck, M. Schuster, R. Lesche, G. Weiss, J. Corman und A. Hartmann. Development of a diagnostic microarray assay to assess the risk of recurrence of prostate cancer based on PITX2 DNA methylation. *J Mol Diagn* 12 (2010): 345-53.
- Schmitz. Zellkulturen, Zelllinien und deren Einsatzmöglichkeiten. In *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- Schostak, M., G. P. Schwall, S. Poznanovic, K. Groebe, M. Muller, D. Messinger, K. Miller, H. Krause, A. Pelzer, W. Horninger, H. Klocker, J. Hennenlotter, S. Feyerabend, A. Stenzl und A. Schrattenholz. Annexin A3 in urine: a highly specific noninvasive marker for prostate cancer early detection. *J Urol* 181 (2009): 343-53.
- Schroder, F. H., J. Hugosson, M. J. Roobol, T. L. Tammela, S. Ciatto, V. Nelen, M. Kwiatkowski, M. Lujan, H. Lilja, M. Zappa, L. J. Denis, F. Recker, A. Berenguer, L. Maattanen, C. H. Bangma, G. Aus, A. Villers, X. Rebillard, T. van der Kwast, B. G. Blijenberg, S. M. Moss, H. J. de Koning und A. Auvinen. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 360 (2009): 1320-8.
- Schumacher, G.-H. und G. Aumüller. *Topographische Anatomie des Menschen*. 7. Auflage: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2004.
- Selevsek, N., M. Matondo, M. Sanchez Carbayo, R. Aebersold und B. Domon. Systematic quantification of peptides/proteins in urine using selected reaction monitoring. *Proteomics* 11 (2011): 1135-47.
- Seyffert. *Lehrbuch der Genetik*. 2. Auflage Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, 1998.
- Shaffer, D. R. und P. P. Pandolfi. Breaking the rules of cancer. *Nat Med* 12 (2006): 14-5.
- Sharifi, N., J. L. Gulley und W. L. Dahut. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA* 294 (2005): 238-44.
- Shaw, J., R. Rowlinson, J. Nickson, T. Stone, A. Sweet, K. Williams und R. Tonge. Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* 3 (2003): 1181-95.
- Shay, J. W. und S. Bacchetti. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33 (1997): 787-91.
- Sherley, J. L. und T. J. Kelly. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* 263 (1988): 8350-8.

- Shieh, D. B., J. Godleski, J. E. Herndon, 2nd, T. Azuma, H. Mercer, D. J. Sugarbaker und D. J. Kwiatkowski. Cell motility as a prognostic factor in Stage I nonsmall cell lung carcinoma: the role of gelsolin expression. *Cancer* 85 (1999): 47-57.
- Shields, J. D., I. C. Kourtis, A. A. Tomei, J. M. Roberts und M. A. Swartz. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328 (2010): 749-52.
- Sieverdinga, M., U. Matterna, L. Ciccarelloa und Luboldt H.-J. Prostatakarzinom-Früherkennung in Deutschland – Untersuchung einer repräsentativen Bevölkerungsstichprobe. *Der Urologe* 47 (2008): 1233-38.
- Sikorski, R. S., M. S. Boguski, M. Goebel und P. Hieter. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* 60 (1990): 307-17.
- Singh, D., P. G. Febbo, K. Ross, D. G. Jackson, J. Manola, C. Ladd, P. Tamayo, A. A. Renshaw, A. V. D'Amico, J. P. Richie, E. S. Lander, M. Loda, P. W. Kantoff, T. R. Golub und W. R. Sellers. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* 1 (2002): 203-9.
- Sitek, B., J. Luttges, K. Marcus, G. Kloppel, W. Schmiegell, H. E. Meyer, S. A. Hahn und K. Stuhler. Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 5 (2005): 2665-79.
- Sitek, B., B. Sipos, G. Kloppel, W. Schmiegell, S. A. Hahn, H. E. Meyer und K. Stuhler. Application of fluorescence dye saturation labeling for differential proteome analysis of 1,000 microdissected cells from pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Methods Mol Biol* 425 (2008): 1-14.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich und W. L. McGuire. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 (1987): 177-82.
- Slovin, S. F., A. S. Wilton, G. Heller und H. I. Scher. Time to detectable metastatic disease in patients with rising prostate-specific antigen values following surgery or radiation therapy. *Clin Cancer Res* 11 (2005): 8669-73.
- Sobel, R. E. und M. D. Sadar. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J Urol* 173 (2005): 342-59.
- Spinardi, L. und W. Witke. Gelsolin and diseases. *Subcell Biochem* 45 (2007): 55-69.
- Sporn, M. B. The war on cancer. *Lancet* 347 (1996): 1377-81.
- Sreekumar, A., B. Laxman, D. R. Rhodes, S. Bhagavathula, J. Harwood, D. Giacherio, D. Ghosh, M. G. Sanda, M. A. Rubin und A. M. Chinnaiyan. Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 96 (2004): 834-43.
- Stamey, T. A., M. Caldwell, J. E. McNeal, R. Nolley, M. Hemenez und J. Downs. The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol* 172 (2004): 1297-301.
- Statistisches-Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12 Reihe 4. Auflage Wiesbaden Statistisches Bundesamt, 2011.
- Stattin, P., J. E. Damber, L. Karlberg und A. Bergh. Cell proliferation assessed by Ki-67 immunoreactivity on formalin fixed tissues is a predictive factor for survival in prostate cancer. *J Urol* 157 (1997): 219-22.
- Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop und P. K. Vogt. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260 (1976): 170-3.
- Stephan, C., G. M. Yousef, A. Scorilas, K. Jung, M. Jung, G. Kristiansen, S. Hauptmann, T. Kishi, T. Nakamura, S. A. Loening und E. P. Diamandis. Hepsin is highly over expressed in and a new candidate for a prognostic indicator in prostate cancer. *J Urol* 171 (2004): 187-91.
- Stephenson, A. J., M. W. Kattan, J. A. Eastham, Z. A. Dotan, F. J. Bianco, Jr., H. Lilja und P. T. Scardino. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol* 24 (2006): 3973-8.
- Stone, K. R., D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey und D. F. Paulson. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21 (1978): 274-81.
- Strom, S. S., X. Wang, C. A. Pettaway, C. J. Logothetis, Y. Yamamura, K. A. Do, R. J. Babaian und P. Troncoso. Obesity, weight gain, and risk of biochemical failure among prostate cancer patients following prostatectomy. *Clin Cancer Res* 11 (2005): 6889-94.
- Subauste, M. C., P. Nalbant, E. D. Adamson und K. M. Hahn. Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein beta-catenin with the scaffolding protein MAGI-2. *J Biol Chem* 280 (2005): 5676-81.
- Suda, T., T. Tsunoda, N. Uchida, T. Watanabe, S. Hasegawa, S. Satoh, S. Ohgi, Y. Furukawa, Y. Nakamura und H. Tahara. Identification of secernin 1 as a novel immunotherapy target for gastric cancer using the expression profiles of cDNA microarray. *Cancer Sci* 97 (2006): 411-9.
- Suehara, Y., T. Kondo, K. Seki, T. Shibata, K. Fujii, M. Gotoh, T. Hasegawa, Y. Shimada, M. Sasako, T. Shimoda, H. Kurosawa, Y. Beppu, A. Kawai und S. Hirohashi. Pftin as a prognostic biomarker of gastrointestinal stromal tumors revealed by proteomics. *Clin Cancer Res* 14 (2008): 1707-17.

- Suehara, Y., N. Tochigi, D. Kubota, K. Kikuta, R. Nakayama, K. Seki, A. Yoshida, H. Ichikawa, T. Hasegawa, K. Kaneko, H. Chuman, Y. Beppu, A. Kawai und T. Kondo. Secernin-1 as a novel prognostic biomarker candidate of synovial sarcoma revealed by proteomics. *J Proteomics* 74 (2011): 829-42.
- Sun, S., C. C. Sprenger, R. L. Vessella, K. Haugk, K. Soriano, E. A. Mostaghel, S. T. Page, I. M. Coleman, H. M. Nguyen, H. Sun, P. S. Nelson und S. R. Plymate. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest* 120 (2010): 2715-30.
- Sun, Y., J. Niu und J. Huang. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res* 1 (2009): 148-62.
- Svatek, R. S., C. Jeldres, P. I. Karakiewicz, N. Suardi, J. Walz, C. G. Roehrborn, F. Montorsi, K. M. Slawin und S. F. Shariat. Pre-treatment biomarker levels improve the accuracy of post-prostatectomy nomogram for prediction of biochemical recurrence. *Prostate* 69 (2009): 886-94.
- Svatek, R. S., J. A. Karam, C. G. Roehrborn, P. I. Karakiewicz, K. M. Slawin und S. F. Shariat. Preoperative plasma endoglin levels predict biochemical progression after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 14 (2008): 3362-6.
- Symonds, H., L. Krall, L. Remington, M. Saenz-Robles, S. Lowe, T. Jacks und T. Van Dyke. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78 (1994): 703-11.
- Tacu, C., M. Neagu, C. Constantin und M. Sajin. Biomarkers discovery in cancer--up-dates in methodology. *Roum Arch Microbiol Immunol* 69 (2010): 48-55.
- Taira, A., G. Merrick, K. Wallner und M. Dattoli. Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. *Oncology (Williston Park)* 21 (2007): 1003-10.
- Talesa, V. N., C. Antognelli, C. Del Buono, F. Stracci, M. R. Serva, E. Cottini und E. Mearini. Diagnostic potential in prostate cancer of a panel of urinary molecular tumor markers. *Cancer Biomark* 5 (2009): 241-51.
- Tan, S. S., I. Ahmad, H. L. Bennett, L. Singh, C. Nixon, M. Seywright, R. J. Barnetson, J. Edwards und H. Y. Leung. GRP78 up-regulation is associated with androgen receptor status, Hsp70-Hsp90 client proteins and castrate-resistant prostate cancer. *J Pathol* 223 (2011): 81-7.
- Teng, M. W., J. B. Swann, C. M. Koebel, R. D. Schreiber und M. J. Smyth. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol* 84 (2008): 988-93.
- Thompson, I. M., M. S. Lucia und C. M. Tangen. Commentary: the ubiquity of prostate cancer: echoes of the past, implications for the present: "what has been will be again, what has been done will be done again; there is nothing new under the sun." *ECCLESIASTES 1:9. Int J Epidemiol* 36 (2007): 287-9.
- Thompson, I. M., D. K. Pauler, P. J. Goodman, C. M. Tangen, M. S. Lucia, H. L. Parnes, L. M. Minasian, L. G. Ford, S. M. Lippman, E. D. Crawford, J. J. Crowley und C. A. Coltman, Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 350 (2004): 2239-46.
- Thor, A. D., S. M. Edgerton, S. Liu, D. H. Moore, 2nd und D. J. Kwiatkowski. Gelsolin as a negative prognostic factor and effector of motility in erbB-2-positive epidermal growth factor receptor-positive breast cancers. *Clin Cancer Res* 7 (2001): 2415-24.
- Thorpe, A. und D. Neal. Benign prostatic hyperplasia. *Lancet* 361 (2003): 1359-67.
- Thorsen, K., K. D. Sorensen, A. S. Brems-Eskildsen, C. Modin, M. Gaustadnes, A. M. Hein, M. Kruhoffer, S. Laurberg, M. Borre, K. Wang, S. Brunak, A. R. Krainer, N. Topping, L. Dyrsjot, C. L. Andersen und T. F. Orntoft. Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis. *Mol Cell Proteomics* 7 (2008): 1214-24.
- Tian, M., Y. Z. Cui, G. H. Song, M. J. Zong, X. Y. Zhou, Y. Chen und J. X. Han. Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer* 8 (2008): 241.
- Timms, J. F. und R. Cramer. Difference gel electrophoresis. *Proteomics* 8 (2008): 4886-97.
- Tomlins, S. A., R. Mehra, D. R. Rhodes, X. Cao, L. Wang, S. M. Dhanasekaran, S. Kalyana-Sundaram, J. T. Wei, M. A. Rubin, K. J. Pienta, R. B. Shah und A. M. Chinnaiyan. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 39 (2007): 41-51.
- Tonge, R., J. Shaw, B. Middleton, R. Rowlinson, S. Rayner, J. Young, F. Pognan, E. Hawkins, I. Currie und M. Davison. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1 (2001): 377-96.
- Tornblom, M., U. Norming, J. Adolfsson, C. Becker, P. A. Abrahamsson, H. Lilja und O. Gustafsson. Diagnostic value of percent free prostate-specific antigen: retrospective analysis of a population-based screening study with emphasis on men with PSA levels less than 3.0 ng/mL. *Urology* 53 (1999): 945-50.
- Tosoian, J. J., S. Loeb, A. Kettermann, P. Landis, D. J. Elliot, J. I. Epstein, A. W. Partin, H. B. Carter und L. J. Sokoll. Accuracy of PCA3 measurement in predicting short-term biopsy progression in an active surveillance program. *J Urol* 183 (2010): 534-8.
- Tosoian, J. und S. Loeb. PSA and beyond: the past, present, and future of investigative biomarkers for prostate cancer. *ScientificWorldJournal* 10 (2010): 1919-31.

- Tran, N. L., D. G. Adams, R. R. Vaillancourt und R. L. Heimark. Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem* 277 (2002): 32905-14.
- Troyer, D. A., J. Mubiru, R. J. Leach und S. L. Naylor. Promise and challenge: Markers of prostate cancer detection, diagnosis and prognosis. *Dis Markers* 20 (2004): 117-28.
- Uetsuki, H., H. Tsunemori, R. Taoka, R. Haba, M. Ishikawa und Y. Kakehi. Expression of a novel biomarker, EPCA, in adenocarcinomas and precancerous lesions in the prostate. *J Urol* 174 (2005): 514-8.
- Ummanni, R., F. Mundt, H. Pospisil, S. Venz, C. Scharf, C. Barrett, M. Falth, J. Kollermann, R. Walther, T. Schlomm, G. Sauter, C. Bokemeyer, H. Sultmann, A. Schuppert, T. H. Brummendorf und S. Balabanov. Identification of clinically relevant protein targets in prostate cancer with 2D-DIGE coupled mass spectrometry and systems biology network platform. *PLoS One* 6 (2011): e16833.
- Uniprot, Gene Ontology Analysen. <http://www.uniprot.org/uniprot/O60925> ; <http://www.uniprot.org/uniprot/P04183>, <http://www.uniprot.org/uniprot/P0CG48>, <http://www.uniprot.org/uniprot/P41235>. (Dec 2013).
- Uniprot.org. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5R3I4>. (April 16, 2014).
- Unlu, M., M. E. Morgan und J. S. Minden. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18 (1997): 2071-7.
- van Bokhoven, A., M. Varella-Garcia, C. Korch, W. U. Johannes, E. E. Smith, H. L. Miller, S. K. Nordeen, G. J. Miller und M. S. Lucia. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 57 (2003): 205-25.
- van den Brule, F. A., D. Waltregny, F. T. Liu und V. Castronovo. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int J Cancer* 89 (2000): 361-7.
- Van Langenhove, A., C. E. Costello, J. E. Biller, K. Biemann und T. R. Browne. A gas chromatographic/mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of 5,5-diphenylhydantoin (phenytoin), its para-hydroxylated metabolite and their stable isotope labelled analogs. *Clin Chim Acta* 115 (1981): 263-75.
- van Zijl, F., G. Krupitza und W. Mikulits. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 728 (2011): 23-34.
- Varambally, S., S. M. Dhanasekaran, M. Zhou, T. R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M. G. Sanda, D. Ghosh, K. J. Pienta, R. G. Sewalt, A. P. Otte, M. A. Rubin und A. M. Chinnaiyan. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419 (2002): 624-9.
- Veldscholte, J., C. Ris-Stalpers, G. G. Kuiper, G. Jenster, C. Berrevoets, E. Claassen, H. C. van Rooij, J. Trapman, A. O. Brinkmann und E. Mulder. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 173 (1990): 534-40.
- Verhagen, A. P., F. C. Ramaekers, T. W. Aalders, H. E. Schaafsma, F. M. Debruyne und J. A. Schalken. Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. *Cancer Res* 52 (1992): 6182-7.
- Vickers, A. J., M. J. Roobol und H. Lilja. Screening for prostate cancer: early detection or over-detection? *Annu Rev Med* 63 (2012): 161-70.
- Visakorpi, T., E. Hyytinen, P. Koivisto, M. Tanner, R. Keinänen, C. Palmberg, A. Palotie, T. Tammela, J. Isola und O. P. Kallioniemi. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 9 (1995): 401-6.
- Viswanathan, S., M. Unlu und J. S. Minden. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc* 1 (2006): 1351-8.
- Wagener, C. und O. Müller. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. edited by 3Auflage: Georg Thieme Verlag KG, 2010.
- Wang, Q., R. Chaerkady, J. Wu, H. J. Hwang, N. Papadopoulos, L. Kopelovich, A. Maitra, H. Matthaei, J. R. Eshleman, R. H. Hruban, K. W. Kinzler, A. Pandey und B. Vogelstein. Mutant proteins as cancer-specific biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011): 2444-9.
- Wang, Y., P. Nangia-Makker, L. Tait, V. Balan, V. Hogan, K. J. Pienta und A. Raz. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. *Am J Pathol* 174 (2009): 1515-23.
- Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124 (1956): 269-70.
- Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* 123 (1956): 309-14.
- Warburg, O.H. *the metabolism of Tumors: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology*. Auflage London, UK: Arnold Constable, 1930.
- Way, G., N. Morrice, C. Smythe und A. J. O'Sullivan. Purification and identification of secernin, a novel cytosolic protein that regulates exocytosis in mast cells. *Mol Biol Cell* 13 (2002): 3344-54.
- Weinberg, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 49 (1989): 3713-21.
- Weinberg, R. A. Tumor suppressor genes. *Science* 254 (1991): 1138-46.

- Weinberg, R. A. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin* 44 (1994): 160-70.
- Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81 (1995): 323-30.
- Weinberg, R. A. *The Biology of Cancer*. 2. Auflage New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2013.
- Weiss, G., S. Cottrell, J. Distler, P. Schatz, G. Kristiansen, M. Ittmann, C. Haefliger, R. Lesche, A. Hartmann, J. Corman und T. Wheeler. DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 181 (2009): 1678-85.
- Welsch, U. *Lehrbuch Histologie*. 3. Auflage München: Urban und Fischer, 2010.
- Whitman, E. J., J. Groskopf, A. Ali, Y. Chen, A. Blase, B. Furusato, G. Petrovics, M. Ibrahim, S. Elsamanoudi, J. Cullen, I. A. Sesterhenn, S. Brassell, H. Rittenhouse, S. Srivastava und D. G. McLeod. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J Urol* 180 (2008): 1975-8; discussion 78-9.
- Williams, R. D. Human urologic cancer cell lines. *Invest Urol* 17 (1980): 359-63.
- Winston, J. S., H. L. Asch, P. J. Zhang, S. B. Edge, A. Hyland und B. B. Asch. Downregulation of gelsolin correlates with the progression to breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 65 (2001): 11-21.
- Wintersberger, E. Regulation and biological function of thymidine kinase. *Biochem Soc Trans* 25 (1997): 303-8.
- Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin L H. *TNM-Atlas*. 5. Auflage: Springer Verlag, 2005.
- Wolff, J. und J.E. Altwein. *Prostatakarzinom. Grundlagen und Therapie*. 3. Auflage Berlin: Springer Verlag, 2004.
- Wood, S. L., M. A. Knowles, D. Thompson, P. J. Selby und R. E. Banks. Proteomic studies of urinary biomarkers for prostate, bladder and kidney cancers. *Nat Rev Urol* 10 (2013): 206-18.
- Wu, M., X. Bai, G. Xu, J. Wei, T. Zhu, Y. Zhang, Q. Li, P. Liu, A. Song, L. Zhao, C. Gang, Z. Han, S. Wang, J. Zhou, Y. Lu und D. Ma. Proteome analysis of human androgen-independent prostate cancer cell lines: variable metastatic potentials correlated with vimentin expression. *Proteomics* 7 (2007): 1973-83.
- Xin, W., D. R. Rhodes, C. Ingold, A. M. Chinnaiyan und M. A. Rubin. Dysregulation of the annexin family protein family is associated with prostate cancer progression. *Am J Pathol* 162 (2003): 255-61.
- Xu, J., J. A. Stolk, X. Zhang, S. J. Silva, R. L. Houghton, M. Matsumura, T. S. Vedvick, K. B. Leslie, R. Badaro und S. G. Reed. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res* 60 (2000): 1677-82.
- Yamaguchi, H., J. Wyckoff und J. Condeelis. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 17 (2005): 559-64.
- Yang, G., L. D. Truong, T. L. Timme, C. Ren, T. M. Wheeler, S. H. Park, Y. Nasu, C. H. Bangma, M. W. Kattan, P. T. Scardino und T. C. Thompson. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 4 (1998): 1873-80.
- Yang, G., L. D. Truong, T. M. Wheeler und T. C. Thompson. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res* 59 (1999): 5719-23.
- Yang, L., Y. Pang und H. L. Moses. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31 (2010): 220-7.
- Yarden, Y. und A. Ullrich. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57 (1988): 443-78.
- Yoon, S. Y., J. M. Kim, J. H. Oh, Y. J. Jeon, D. S. Lee, J. H. Kim, J. Y. Choi, B. M. Ahn, S. Kim, H. S. Yoo, Y. S. Kim und N. S. Kim. Gene expression profiling of human HBV- and/or HCV-associated hepatocellular carcinoma cells using expressed sequence tags. *Int J Oncol* 29 (2006): 315-27.
- Zaviacic, M. Prostate-specific antigen and history of its discovery. *Bratisl Lek Listy* 98 (1997): 659-62.
- Zielie, P. J., J. A. Mobley, R. G. Ebb, Z. Jiang, R. D. Blute und S. M. Ho. A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostatic secretions. *J Urol* 172 (2004): 1130-3.

7 Anhang

7.1 Anhang zum Material und Methoden Teil

7.1.1 Klinikopathologische Charkateristika der verwendeten Patientenkollektive

Tabelle 7.1: Klinikopathologische Charkateristika der für die 2D-DIGE verwendeten Prostatakarzinomproben

Variable	Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
		n _a	%	n _a	%
MW Alter [Jahre]		60,9 (47 – 75)		62,56 (54 – 70)	
	<62 Jahre	7	58,3	4	36,4
	≥62 Jahre	5	41,7	5	45,5
	K.a.	0	0	2	18,2
Tumorgroße					
	pT2	6	50,0	5	45,5
	pT3	6	50,0	4	36,4
	pX	0	0	2	18,2
Lymphknotenstatus					
	pN0	10	83,3	9	81,8
	pN1	1	8,3	0	0
	pNx	1	8,3	2	18,2
Resektionsrand					
	R0	6	50,0	8	72,7
	R1	2	16,7	0	0
	Rx	4	33,3	3	27,3
Gleason Score					
MW Gleason Score		7,6 (7 – 9)		7,1 (6 – 8)	
	6	0	0	1	9,1
	7	7	58,3	6	54,5
	8	2	16,7	2	18,2
	9	3	25,0	0	0
	K.a.	0	0	2	18,2
PSA					
MW PSA [ng/ml]		16,79 (5,37 – 28,46)		9,98 (1,29 – 22,50)	
	0 – 4 ng/ml	0	0	1	9,1
	4-10 ng/ml	3	25,0	4	36,4
	>10 ng/ml	6	50,0	4	36,4
	k.a.	3	25,0	2	18,2
Follow up					
MW Follow-up Zeit [Monate]		69,4 (35 – 106)		54,2 (9 – 86)	
	0-24 Monate	0	0	1	9,1
	24-60 Monate	5	41,7	7	63,6
	> 60 Monate	7	58,3	3	27,3

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Als Kontrollen wurden korrespondierende, tumorfreie Areale von Prostatektomien von 14 Prostatakarzinompatienten verwendet. Das Durchschnittsalter der hierfür verwendeten Patienten betrug 61,0 Jahre (55 – 69 Jahre), wobei von vier Patienten keine Altersangaben vorlagen. Der initiale

PSA der Patienten betrug im Durchschnitt 13,24 ng/ml (3,39 – 22,50 ng/ml), wobei auch hier von fünf Patienten keine Angaben vorlagen.

Tabelle 7.2: Klinikopathologische Charkateristika des für die Western Blot Analysen von Calponin und Gelsolin verwendeten Patientenkollektivs

Variable			Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
Kategorisierung			n _a	%	n _a	%
MW des Alters			64,33 (60 – 68)		62,33 (54 – 67)	
	<63 Jahre		1	25	1	25
	≥63 Jahre		2	50	2	50
	k.a.		1	25	1	25
Tumorgroße						
	pT2		1	25	1	25
	pT3		2	50	2	50
	pX		1	25	1	25
Lymphknotenstatus						
	pN0		3	75	3	75
	pNx		1	25	1	25
Resektionsrand						
	R0		2	50	3	75
	Rx		2	50	1	25
Gleason Score						
MW Gleason Score			7,0 (7 – 7)		7,0 (6 – 8)	
	6		0	0	1	25
	7		3	75	1	25
	8		0	0	1	25
	k.a.		1	25	1	25
PSA						
MW PSA [ng/ml]			8,77 (4,32 – 16,65)		10,42 (5,43 -13,44)	
	4-10 ng/ml		2	50	1	25
	>10 ng/ml		1	25	2	50
	k.a.		1	25	1	25
Follow up Zeit						
MW Follow-up Zeit [Monate]			64,33 (57 -71)		73,0 (58 – 86)	
	24-60 Monate		1	25	1	25
	> 60 Monate		2	50	2	50
	k.a.		1	25	1	25

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Als Kontrollen wurden tumorfreie Areale der Prostatektomien von acht Prostatakarzinompatienten verwendet. Das Durchschnittsalter der hierfür verwendeten Patienten betrug 58,3 Jahre (55 – 65 Jahre), wobei von einem Patienten keine Altersangaben vorlagen. Der initiale PSA der Patienten betrug im Durchschnitt 11,35 ng/ml (1,29 – 19,46 ng/ml), wobei auch hier von einem Patienten keine Angaben vorlagen.

Tabelle 7.3: Klinikopathologische Charkateristika des für die Western Blot Analysen von Annexin A5, TCP1alpha, Secerin-1 und TTC38 verwendeten Patientenkollektivs

Variable	Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
		n _a	%	n _a	%
MW des Alters		64,5 (56-75)		62,83 (58 – 67)	
	<63 Jahre	2	50	2	33,3
	≥63 Jahre	2	50	4	66,7
Tumorgröße					
	pT2	1	25	4	66,7
	pT3	3	75	2	33,3
Lymphknotenstatus					
	pN0	4	100	5	83,3
	pN1	0	0	1	16,7
Resektionsrand					
	R0	4	100	6	100,0
Gleason Score					
MW Gleason Score		7,33 (7 – 9)		8,25 (7 – 9)	
	7	1	25	5	83,3
	8	1	25	0	0
	9	2	50	1	16,7
PSA					
MW PSA [ng/ml]		7,03 (4,32 – 9,76)		11,59 (1,29 – 22,50)	
	4-10 ng/ml	3	75	2	33,3
	>10 ng/ml	0	0	4	66,7
	k.a.	1	25	0	0
Follow up Zeit					
MW Follow-up Zeit [Monate]		74,5 (66 -85)		53,16 (6-75)	
	0-24 Monate	0	0	1	16,7
	24-60 Monate	0	0	2	33,3
	> 60 Monate	4	100	3	50,0

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Als Kontrollen wurden tumorfreie Areale der Prostatektomien von acht Prostatakarzinompatienten verwendet. Das Durchschnittsalter der hierfür verwendeten Patienten betrug 68,5 Jahre (63 – 75 Jahre). Der initiale PSA der Patienten betrug im Durchschnitt 5,41 ng/ml (0,51 – 12,70 ng/ml).

Tabelle 7.4: Klinikopathologische Charkateristika des für immunhistochemische Analysen von SCRN1 verwendeten Patientenkollektivs aus Dresden

Variable	Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
		n _a	%	n _a	%
MW Alter [Jahre]		62,9 (54,7 – 75,5)		62,8 (54,4 – 71,5)	
	<63 Jahre	7	46,2	7	50,0
	≥63 Jahre	6	53,8	7	50,0
Tumorgröße					
	pT2	5	38,5	5	35,7
	pT3	8	61,5	8	57,1
	pX	0	0	1	7,1
Lymphknotenstatus					
	pN0	11	84,6	10	71,4
	pN1	2	15,4	4	28,6
Resektionsrand					
	R0	9	69,2	12	58,7
	R1	2	15,4	2	14,3
	Rx	2	15,4	0	0
Gleason Score					
MW Gleason Score		7,8 (7 – 9)		7,7 (6 – 9)	
	6	0	0	1	7,1
	7	7	46,2	6	42,9
	8	2	15,4	3	21,4
	9	4	30,8	4	28,6
PSA					
MW PSA [ng/ml]		15,0 (4,32 – 28,64)		10,2 (1,29 – 26,07)	
	< 4 ng/ml	0	0	3	28,6
	4-10 ng/ml	5	38,5	5	35,7
	>10 ng/ml	7	46,2	6	42,9
	k.a.	1	7,7	0	0
Follow up					
MW Follow-up Zeit [Monate]		72,2 (35 – 106)		52,2 (6 – 86)	
	0-24 Monate	0	0	2	14,3
	24-60 Monate	3	23,1	8	57,1
	> 60 Monate	10	76,9	4	28,6

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Als tumorfreie Kontrollen wurden korrespondierende tumorfreie Areale der Prostataektomien von 27 Prostatakarzinompatienten verwendet. Zusätzlich wurden 15 Prostataektomien von BPH Patienten ohne Prostatakrzinom analysiert. Das Durchschnittsalter dieser BPH Patienten betrug 69,7 Jahre. Der initiale PSA der Patienten betrug im Durchschnitt 4,54 ng/ml. Von einem Patienten lagen keine klinischen Daten vor.

Tabelle 7.5: Klinikopathologische Charkateristika des für immunhistochemische Analysen von TTC38 verwendeten Patientenkollektivs aus Dresden

Variable			Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
				n _a	%	n _a	%
MW	des	Alters		61, 8 (54,7 – 68,8)		62,8 (54,4 – 71,5)	
			<63 Jahre	7	58,3	7	50,0
			≥63 Jahre	5	41,7	7	50,0
Tumorgröße							
			pT2	5	41,7	5	35,7
			pT3	7	58,3	8	57,1
			pX	0	0	1	7,1
Lymphknotenstatus							
			pN0	10	83,3	10	71,4
			pN1	2	16,7	4	28,6
Resektionsrand							
			R0	8	66,7	12	85,7
			R1	2	16,7	2	14,3
			Rx	2	16,7	0	0
Gleason Score							
MW	Gleason Score			7,7 (7 – 9)		7,7 (6 – 9)	
			6	0	0	1	7,1
			7	7	58,3	6	42,9
			8	2	16,7	3	21,4
			9	3	25,0	4	28,6
PSA							
MW	PSA [ng/ml]			15,0 (4,32 – 28,46)		10,2 (1,,29 – 26,07)	
			<4 ng/ml	0	0	3	21,4
			4-10 ng/ml	5	41,7	5	35,7
			>10 ng/ml	7	58,3	6	42,9
Follow up Zeit							
MW	Follow-up Zeit [Monate]			72,4 (35 – 106)		52,2 (6 – 86)	
			0-24 Monate	0	0	2	14,3
			24-60 Monate	3	25,0	8	57,1
			> 60 Monate	9	75,0	4	28,6

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Als tumorfreie Kontrollen wurden korrespondierende tumorfreie Areale der Prostataktomien von 26 Prostatakarzinompatienten verwendet. Zusätzlich wurden 15 Prostataktomien von BPH Patienten ohne Prostatakarzinom analysiert. Das Durchschnittsalter dieser BPH Patienten betrug 69,7 Jahre. Der initiale PSA der Patienten betrug im Durchschnitt 4,54 ng/ml. Von einem Patienten lagen keine klinischen Daten vor.

Tabelle 7.6: Klinikopathologische Charakteristika des TMA Patientenkollektives, verwendet für immunhistochemische Analysen von Secernin-1

Variable	Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
		n _a	%	n _a	%
MW Alter [Jahre]		64,8 (47 – 74)		64,9 (51 – 70)	
	<65 Jahre	21	40,4	6	37,5
	≥65 Jahre	31	59,6	10	62,5
Tumorgröße					
	pT2	36	69,2	6	37,5
	pT3	15	28,8	10	62,5
	pT4	1	1,9	0	0
Lymphknotenstatus					
	pN0	48	92,3	15	93,8
	pN1	4	7,7	1	6,3
Resektionsrand					
	R0	30	57,7	7	43,8
	R1	21	40,4	8	50,0
	Rx	1	1,9	0	0
Gleason Score					
MW Gleason Score		6,10 (3 – 9)		7,56 (6 – 9)	
	3	1	1,9	0	0
	4	1	1,9	0	0
	5	15	28,8	0	0
	6	17	32,7	2	12,5
	7	12	23,1	6	37,5
	8	5	9,6	5	31,3
	9	1	1,9	3	18,8
PSA					
MW PSA [ng/ml]		11,10 (1,02 – 163,0)		10,88 (1,51 – 50,7)	
	< 4 ng/ml	7	13,5	0	0
	4-10 ng/ml	32	61,5	4	25,0
	>10 ng/ml	11	21,2	12	75,0
	k.a.	2	3,8	0	0
Follow up					
MW Follow-up Zeit [Monate]		66,2 (32 – 90)		10,13 (42 – 88)	
	24-60 Monate	19	36,5	0	0
	> 60 Monate	33	63,5	4	25,0
	k.a.	0	0	12	75,0

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Das Durchschnittsalter der 49 Patienten mit PIN betrug 64,3 Jahre (45 – 74 Jahre). Der initiale PSA dieser Patienten betrug im Durchschnitt 12,38 ng/ml (1,02 – 163 ng/ml). Von drei Patientenaltern keine klinischen Daten vor. Als tumorfreie Kontrollen wurden tumorfreie Areale von 124 Prostatektomien von Prostatakarzinompatienten verwendet. Das Durchschnittsalter dieser Patienten betrug 64,7 Jahre (45 – 78 Jahre). Der initiale PSA der Patienten betrug im Durchschnitt 13,67 ng/ml (0,98 – 395 ng/ml). Von sechs Patienten lagen keine klinischen Daten vor.

Tabelle 7.7: Klinikopathologische Charkateristika des TMA Patientenkollektives, verwendet für immunhistochemische Analysen von Vinculin

Variable	Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
		n _a	%	n _a	%
MW Alter [Jahre]		65,0 (47 – 74)		64,65 (51 – 71)	
	<65 Jahre	23	41,8	6	37,5
	≥65 Jahre	32	58,2	10	62,5
Tumorgroße					
	pT2	39	70,9	7	43,8
	pT3	15	27,3	9	56,3
	pT4	1	1,8	0	0
Lymphknotenstatus					
	pN0	52	94,5	15	93,8
	pN1	3	5,5	1	6,3
Resektionsrand					
	R0	33	60,0	8	50,0
	R1	21	38,2	7	43,8
	Rx	1	1,8	1	6,3
Gleason Score					
MW Gleason Score		6,09 (4 – 9)		7,25 (4 – 9)	
	4	4	7,3	1	6,3
	5	15	27,3	0	0
	6	18	32,7	2	12,6
	7	14	25,5	5	31,3
	8	3	5,5	5	31,3
	9	1	1,8	3	18,8
PSA					
MW PSA [ng/ml]		8,09 (0,98 – 35,4)		10,39 (1,51 – 50,7)	
	< 4 ng/ml	8	14,5	3	18,8
	4-10 ng/ml	32	58,2	8	50,0
	>10 ng/ml	13	23,6	4	25,0
	k.a.	2	3,6	1	6,3
Follow up					
MW Follow-up Zeit [Monate]		65,78 (12 – 90)		67,15 (25 – 88)	
	0 – 24 Monate	1	1,8	0	0
	24-60 Monate	19	34,5	5	31,3
	> 60 Monate	35	63,6	11	68,8

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Das Durchschnittsalter der 54 Patienten mit PIN betrug 64,4 Jahre (47 – 75 Jahre). Der initiale PSA dieser Patienten betrug im Durchschnitt 16,76 ng/ml (1,02 – 395 ng/ml). Von drei Patienten lagen keine klinischen Daten vor. Als tumorfreie Kontrollen wurden tumorfreie Areale von 116 Prostatektomien von Prostatakarzinompatienten verwendet. Das Durchschnittsalter dieser Patienten betrug 64,7 Jahre (47 – 76 Jahre). Der initiale PSA der Patienten betrug im Durchschnitt 12,62 ng/ml (0,98 – 395 ng/ml). Von sechs Patienten lagen keine klinischen Daten vor.

Tabelle 7.8: Klinikopathologische Charakteristika des TMA Patientenkollektives, verwendet für immunhistochemische Analysen von TTC38

Variable			Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
Kategorisierung			n _a	%	n _a	%
MW des Alters			65,1 (47 – 78)		64,8 (51 – 70)	
	<65 Jahre		26	41,3	7	38,9
	≥65 Jahre		37	58,7	11	61,1
Tumorgröße						
	pT2		45	71,2	8	44,4
	pT3		17	27,0	10	55,6
	pT4		1	1,6	0	0
Lymphknotenstatus						
	pN0		59	93,7	17	94,4
	pN1		4	6,3	1	5,6
Resektionsrand						
	R0		38	60,3	9	50,0
	R1		24	38,1	8	44,4
	Rx		1	1,6	1	5,6
Gleason Score						
MW Gleason Score			6,11 (3 – 9)		7,33 (0 – 9)	
	3		1	1,6	0	0
	4		2	3,2	1	5,6
	5		18	28,6	0	0
	6		19	30,2	2	11,1
	7		15	23,8	7	38,9
	8		7	11,1	5	27,8
	9		1	1,6	3	16,7
PSA						
MW PSA [ng/ml]			10,59 (0,98 – 163)		9,99 (1,51 – 50,70)	
	< 4 ng/ml		9	14,3	3	16,7
	4-10 ng/ml		37	58,7	10	55,6
	>10 ng/ml		15	23,8	4	22,2
	k.a.		2	3,2	1	5,6
Follow up Zeit						
MW Follow-up Zeit [Monate]			66,37 (12 – 90)		67,17 (25 – 88)	
	0 – 24 Monate		1	1,6	0	0
	24-60 Monate		20	31,7	5	27,8
	> 60 Monate		42	66,7	13	72,2

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Das Durchschnittsalter der 53 Patienten mit PIN betrug 64,34 Jahre (45 – 74 Jahre). Der initiale PSA dieser Patienten betrug im Durchschnitt 20,66 ng/ml (1,02 – 163 ng/ml). Von zwei Patienten (Altern keine klinischen Daten vor. Als tumorfreie Kontrollen wurden tumorfreie Areale von 125 Prostatektomien von Prostatakarzinompatienten verwendet. Das Durchschnittsalter dieser Patienten betrug 64,7 Jahre (45 – 78 Jahre). Der initiale PSA der Patienten betrug im Durchschnitt 13,60 ng/ml (0,98 – 395 ng/ml). Von sechs Patienten lagen keine klinischen Daten vor.

Tabelle 7.9: Klinikopathologische Charkateristika der für die Western Blot Analysen von Vinculin im Urin verwendeten Patientenkollektive – Urinkollektiv des Universitätsklinikums Aachen

Variable	Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
		n _a	%	n _a	%
MW Alter [Jahre]		63,4 (42 – 77)		63,1 (50 – 73)	
	<63 Jahre	11	32,4	4	26,7
	≥63 Jahre	22	64,7	11	73,3
	K.a.	1	2,9	0	0
Tumorgroße					
	pT2	23	67,6	6	40,0
	pT3	9	26,5	7	46,7
	pX	2	5,9	2	13,3
Lymphknotenstatus					
	pN0	13	38,2	5	33,3
	pNx	21	61,8	10	66,7
Resektionsrand					
	R0	24	70,6	7	46,7
	R1	6	17,6	6	40,0
	Rx	4	11,8	2	13,3
Gleason Score					
MW Gleason Score		6,8 (5 – 8)		7,3 (6 – 9)	
	5	1	2,9	0	0
	6	9	26,5	2	13,3
	7	19	55,9	8	53,3
	8	3	8,8	0	0
	9	0	0	3	20,0
	K.a.	2	5,9	2	13,3
PSA					
MW PSA [ng/ml]		7,25 (1,14 – 17,00)		14,99 (6,57 – 23,40)	
	0 – 4 ng/ml	2	5,9	0	0
	4-10 ng/ml	13	38,2	1	6,7
	>10 ng/ml	2	5,9	1	6,7
	k.a.	17	50,0	13	86,7
Follow up					
MW Follow-up Zeit [Monate]		39,6 (1 – 84)		51,47 (19 – 74)	
	0-24 Monate	4	11,8	1	6,7
	24-60 Monate	25	73,5	7	46,7
	> 60 Monate	4	11,8	7	46,7
	k.a.	1	2,9	0	0

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

14 Urinproben einer gesunden, männlichen Population mit einem Alter > 40 Jahren dienten als Kontrollen.

Tabelle 7.10: Klinikopathologische Charkateristika der für die MRM-Versuche verwendeten Patientenkollektive - Patientenkollektiv Urin Aachen

Variable			Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
Kategorisierung			n _a	%	n _a	%
MW des Alters			66,8 (60-71)		62,5 (50 -70)	
	<66 Jahre		4	44,4	3	42,3
	≥66 Jahre		5	55,5	4	57,1
Tumorgroße						
	pT2		3	33,3	3	42,3
	pT3		5	55,5	4	57,1
	pX		1	11,1	0	0
Lymphknotenstatus						
	pN0		4	44,4	3	42,3
	pNx		5	55,5	4	57,1
Resektionsrand						
	R0		5	55,5	3	42,3
	R1		2	22,2	4	57,1
	Rx		2	22,2	0	0
Gleason Score						
MW Gleason Score			6,6 (5 – 8)		6,9 (6 – 7)	
	5		1	11,1	0	0
	6		3	33,3	1	14,3
	7		4	44,4	6	58,7
	8		1	11,1	0	0
PSA						
MW PSA [ng/ml]			17,5		6,6	
	4-10 ng/ml		1	11,1	1	14,3
	>10 ng/ml		3	33,3	0	0
	k.a.		5	55,5	6	58,7
Follow up Zeit						
MW Follow-up Zeit [Monate]			54,8 (35 -84)		49,1 (29-74)	
	0-24 Monate					
	24-60 Monate		5	55,5	5	71,4
	> 60 Monate		3	33,3	2	28,6
	k.a.		1	11,1	0	0

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Als Kontrollen wurden vier Patienten mit Harnblasenkarzinomen und drei Patienten ohne Karzinom genutzt. Das Durchschnittsalter der Kontrollpatienten betrug 67,8 Jahre.

Tabelle 7.11: Klinikopathologische Charkateristika der für die MRM-Versuche verwendeten Patientenkollektive - Patientenkollektiv Serum Aachen

Variable			Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
				n _a	%	n _a	%
MW des Alters				66,3 (60-71)		61,4 (50 -70)	
	<66 Jahre			4	50,0	4	50,0
	≥66 Jahre			4	50,0	4	50,0
Tumorgröße							
	pT2			2	25,0	4	50,0
	pT3			5	75,0	4	50,0
	pX			1	12,5	0	0
Lymphknotenstatus							
	pN0			3	37,5	3	37,5
	pNx			5	62,5	5	62,5
Resektionsrand							
	R0			4	50,0	4	50,0
	R1			2	25,0	4	50,0
	Rx			2	25,0	0	0
Gleason Score							
MW Gleason Score				6,63 (5 – 8)		6,75 (6 – 7)	
	5			1	12,5	0	0
	6			2	25,0	2	25,0
	7			4	50,0	6	75,0
	8			1	12,5	0	0
PSA							
MW PSA [ng/ml]				21,4		6,6	
	4-10 ng/ml			0	0	1	12,5
	>10 ng/ml			3	37,5	0	0
	k.a.			5	62,5	7	77,5
Follow up Zeit							
MW Follow-up Zeit [Monate]				53,9 (35 -84)		50,6 (29-74)	
	0-24 Monate						
	24-60 Monate			5	62,5	5	62,5
	> 60 Monate			2	25,0	3	37,5
	k.a.			1	12,5	0	0

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

Als Kontrollen wurden vier Patienten mit Harnblasenkarzinomen und drei Patienten ohne Karzinom genutzt. Das Durchschnittsalter der Kontrollpatienten betrug 67,8 Jahre.

Tabelle 7.12: Klinikopathologische Charkateristika der für die MRM-Versuche verwendeten Patientenkollektive - Patientenkollektiv Serum Bonn

Variable	Kategorisierung	Patienten ohne Rezidiv		Patienten mit Rezidiv	
		n _a	%	n _a	%
MW des Alters		66,13 (53 – 77)		65,89 (54 – 79)	
	<66 Jahre	24	50,0	8	44,4
	≥66 Jahre	24	50,0	10	55,6
Tumorgröße					
	pT2	34	70,8	11	61,1
	pT3	12	25,0	7	3,9
	P4	2	4,2		
Lymphknotenstatus					
	pN0	47	97,9	18	100
	pN1	1	2,1		
Histologischer Grad					
	G1	9	18,8	1	5,6
	G2	29	60,4	14	77,8
	G3	10	20,8	3	16,7
Resektionsrand					
	R0	33	68,8	11	61,1
	R1	15	31,2	7	3,9
Gleason Score					
MW Gleason Score		5,65 (2 - 10)		6,56 (5 –	
	2-6	32	66,7	10	55,6
	7	11	22,9	5	27,8
	8-10	5	10,4	3	16,7
PSA					
MW PSA [ng/ml]		10,6 (2 – 54)		15,7 (4 – 56)	
	0-4 ng/ml	6	12,5	2	11,1
	4-10 ng/ml	25	52,1	8	44,4
	>10 ng/ml	16	33,3	8	44,4
	k.a.	1	2,1		
Follow up Zeit					
MW Follow-up Zeit [Monate]		57,12 (3 - 118)		25,55 (3 - 84)	
	0-24 Monate	6	12,5	11	61,1
	24-60 Monate	23	47,9	6	33,3
	> 60 Monate	19	39,6	1	5,6

MW= Mittelwert, PSA=Prostata spezifisches Antigen, n_a= Anzahl, k.a.=keine Angabe

7.1.2 Multiple Reaction Monitoring

Tabelle 7.13: 27 neu am Genome BC Proteomics Center etablierte und noch nicht veröffentlichte Peptide des 72 Peptide umfassender SIS-Peptide Mix zur vergleichenden MRM Messung von Urinaufarbeitungs- und tryptischen Verdau-Methoden

Protein/ Peptid	Quantifier				Qualifier 1				Qualifier 2			
	Ion	Precursor Ion	Product Ion	CE [V]	Ion	Precursor Ion	Product Ion	CE [V]	Ion	Precursor Ion	Product Ion	CE [V]
Fibrinopeptide AADSGEGDFLAEGGGVR	y7	768,9	645,3	29	y5	768,9	445,3	21	y14++	768,9	675,8	17
Alpha-2-HS-glycoprotein APHGPGLIYR	y7	540,8	775,5	25	y6	540,8	718,4	21	b3	540,8	306,2	17
Histidine-rich glycoprotein DGYLFQLLR	b3	562,8	336,1	9	y5	562,8	676,4	17	y4	562,8	529,4	13
Transferrin EGYYGYTGAFR	y7	642,3	771,4	17	b3	642,3	350,1	17	y5	642,3	551,3	17
C-reactiveprotein (CRP) ESDTSYVSLK	y3	564,8	347,3	13	y6	564,8	696,4	17	y4	564,8	446,3	13
Thrombospondin-1 FVFGTTPEDILR	y10++	697,9	574,8	17	y6	697,9	742,4	21	y3	697,9	401,3	37
Aspartateaminotransferase FVTVQTISGTGALR	b3	725,4	348,2	25	y7	725,4	661,4	25	y10	725,4	1003,6	29
Glialfibrillaryacidicprotein HLQEYQDLLNVK	b4	500,6	508,3	13	b6++	500,6	400,2	5	y6	500,6	701,4	9
Transferrin HSTIFENLANK	b4	425,2	439,2	5	y3	425,2	332,2	5	y7++	425,2	418,2	9
Alpha-2-HS-glycoprotein HTLNQIDEVK	3y4	399,6	490,3	9	b5	399,6	594,3	9	y4	598,8	490,3	25
Adiponectin (ADPN)IFYNQNHGSGTGK	3y13++	591,3	756,3	17	y14++	591,3	829,9	13	y4	886,4	392,2	53
Von Willebrand Factor ILAGPAGDSNVVK	y9++	620,9	443,8	21	y11++	620,9	507,8	17	y10++	620,9	472,3	21
Apolipoprotein D IPTTFENGR	y8++	517,8	461,2	17	y7	517,8	824,4	21	y6	517,8	723,4	25
Alpha-1-Anti-trypsin (AAT) ITPNLAEFASLYR	y12++	821,4	714,4	21	3y12++	548,0	714,4	9	y9	821,4	1103,6	33
Creatinekinase B-type LAVEALSSLDGDLAGR	y4	793,9	416,3	41	y7	529,6	703,4	13	b5	793,9	484,3	25
Angiotensin- convertingenzyme (ACE)	y11++	706,4	679,9	21	y15 3+	706,4	619,7	13	y12++	706,4	743,9	13
Complement C1 inactivator LLDSLPSDTR	y5	558,8	575,3	17	y8	558,8	890,4	17	b5	558,8	542,3	9
CD105 (endoglin) LPDTPQGGLGEAR	y12++	683,9	627,3	25	y9++	683,9	470,8	25	y4	456,3	432,2	5
Alpha-1-Anti-trypsin (AAT) LSITGTYDLK	y7	555,8	797,4	17	y8++	555,8	455,8	13	y6	555,8	696,4	17
Complement C9 LSPINLVVPV	y9++	621,9	521,8	13	y3	621,9	343,3	17	y7	621,9	832,5	21
Tropomyosin 1alpha-chain LVIIESDLER	y8++	593,8	487,8	13	y6	593,8	748,4	21	b3	593,8	326,2	13
Coagulation Factor XIII A chain	y6	663,9	712,5	17	b3	663,9	288,2	17	b4	663,9	401,2	13
alpha-2-macroglobulin (alpha2M)	y3	558,3	357,3	17	b9++	558,3	535,7	9	b7++	558,3	406,7	9
AldolaseC TPSALAILENANVLAR	b6	551,7	541,3	5	y3	551,7	359,3	17	y5	551,7	572,4	13
Fibrinopeptide A VPGTSTSATLTGLTR	y14++	731,4	681,9	29	y4	731,4	446,3	33	y13	731,4	1265,7	33
Apolipoprotein L1 VTEPISAESEGEQVER	y12++	815,9	651,3	25	y13++	815,9	715,9	25	y7++	544,3	402,7	9
Fibrinogen gamma-chain YEASILTHDSSIR	y11++	497,9	600,3	13	y12++	497,9	664,9	13	y10++	497,9	564,8	13

7.2 Anhang zum Ergebnisteil

7.2.1 2D-DIGE und MS Analysen

Tabelle 7.14: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (RSD), Ratio von tumorfreiem (Tf) und Tumorgewebe (Tu) sowie p-Werte der einzelnen zwischen Tumoren und tumorfreien Geweben

Spot	Tumor		Tumor + Rezidiv		Tumor - Rezidiv		Tumorfrei		Ratio Tf vs Tu	p-Wert (T-Test) Tf vs Tu	p-Wert (U-Test) Tf vs Tu
	MW	RSD	MW	RSD	MW	RSD	MW	RSD			
down 01	200,2	126,7	215,7	80,6	183,3	165,6	4349,3	206,7	21,8	95,7	0,035
down 02	126,1	49,3	133,1	47,2	121,8	48,3	216,5	89,2	1,7	94,7	0,024
down 03	137,0	56,0	127,6	68,7	138,9	46,5	216,2	69,5	1,6	96,1	0,110
down 04	183,5	77,0	148,2	71,9	206,1	77,8	676,8	155,9	3,8	96,3	0,012
down 05	191,7	76,1	164,1	70,8	206,2	79,8	2929,6	300,9	15,7	84,4	0,024
down 06	211,8	95,3	160,8	68,4	246,6	100,7	1866,1	233,5	9,1	91,5	0,009
down 07	119,3	115,8	97,4	38,2	136,1	133,8	317,9	130,5	2,7	95,5	0,009
down 08	170,1	66,4	177,3	58,7	157,0	74,7	474,4	107,0	2,8	99,0	0,019
down 09	180,4	63,8	180,9	62,6	174,7	65,0	523,7	138,1	2,9	96,5	0,042
down 10	172,7	65,0	182,8	58,5	156,9	71,9	498,7	107,6	2,9	99,1	0,020
down 11	70,2	129,5	52,7	79,2	82,3	140,3	149,9	137,8	2,2	88,5	0,026
up 01	220,2	116,4	321,4	78,5	127,4	174,7	91,5	160,6	-2,4	89,6	0,042
up 02	1736,6	422,5	3556,3	289,7	68,5	126,2	37,2	102,7	-46,7	59,5	0,049
up 03	568,8	120,5	890,1	89,8	274,4	133,3	152,1	128,6	-3,7	96,2	0,033

Tabelle 7.15: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (RSD), Ratio von Tumoren mit Rezidiv (+) und Tumoren ohne Rezidiv (- Rez) sowie p-Werte der einzelnen zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv deregulierten Spots.

Spot	Tumorfrei		Tumor gesamt		Tumor - Rezidiv		Tumor + Rezidiv		Ratio + vs - Rez	p-Wert (T-Test) + vs - Rez	p-Wert (U-Test) + vs - Rez
	MW	RSD	MW	RSD	MW	RSD	MW	RSD			
down 01	100,6	96,8	587,0	332,6	1005,1	255,6	83,7	94,8	-12,0	73,1	0,031
down 02	25,5	41,1	40,5	153,8	59,0	133,7	16,8	76,5	-3,5	89,1	0,019
down 03	20,8	81,0	31,4	180,4	49,4	145,4	9,2	58,7	-5,3	90,8	0,023
down 04	17,3	184,5	24,5	276,0	40,0	220,9	5,4	82,3	-7,5	77,2	0,012
down 05	398,2	184,7	171,4	121,7	249,0	101,5	77,2	69,5	-3,2	95,3	1,169
down 06	107,7	195,5	118,2	97,3	162,9	79,1	63,1	94,6	-2,6	96,4	0,023
down 07	118,1	151,9	78,6	77,6	96,4	61,0	57,8	93,4	-1,7	86,7	0,036
down 08	37,3	166,8	74,8	227,9	119,2	185,2	21,4	74,5	-5,6	82,4	0,031
down 09	86,6	168,7	57,0	112,0	76,9	78,7	35,4	161,4	-2,2	87,8	0,049
down 10	27,5	113,6	16,1	63,9	20,7	52,1	10,7	56,0	-1,9	98,2	0,031
down 11	113,3	52,3	104,1	97,7	125,1	97,8	75,4	77,4	-1,7	74,5	0,036
down 12	293,0	105,8	1268,0	193,4	2029,9	148,1	228,2	177,7	-8,9	91,2	0,044
down 13	378,3	298,9	6149,5	416,8	11152,3	302,6	40,7	130,4	-274,3	66,6	0,041
down 14	184,3	243,6	134,0	111,8	186,3	87,9	79,1	124,7	-2,4	91,3	0,036
down 15	1530,6	336,1	86,9	145,7	114,2	134,4	49,5	139,6	-2,3	76,7	0,014
down 16	800,1	185,0	387,8	222,0	582,9	192,4	170,3	162,2	-3,4	72,8	0,033
up 01	184,3	97,5	77,6	85,1	49,8	76,1	109,5	66,6	2,2	97,3	0,031
up 02	91,5	160,6	202,9	122,5	127,4	174,7	321,4	78,5	2,5	92,5	0,049
up 03	180,3	151,9	84,3	97,8	50,3	63,6	126,4	78,0	2,5	97,5	0,036
up 04	100,4	138,8	124,4	180,5	46,0	119,3	226,6	127,5	4,9	94,5	0,027
up 05	241,6	194,7	104,2	72,3	74,7	74,7	136,2	56,8	1,8	95,2	0,056
up 06	352,7	269,9	511,5	325,7	141,0	228,3	896,0	253,1	6,4	71,2	0,042
up 07	37,2	102,7	1814,3	412,9	68,5	126,2	3556,3	289,7	51,9	72,5	0,031
up 08	392,3	106,8	228,3	53,3	247,5	63,3	214,3	24,3	1,2	47,1	0,951
up 09	197,3	75,8	213,4	151,9	124,5	82,3	324,7	129,0	2,6	84,2	0,045
up 10	589,4	174,3	359,2	71,9	294,8	84,9	432,5	54,3	1,5	79,1	0,042
up 11	126,6	59,3	255,2	82,4	163,1	66,8	524,4	105,7	3,2	95,3	0,042
up 12	152,1	128,6	523,7	127,2	274,4	133,3	890,1	89,8	3,2	96,8	0,074
up 13	699,5	111,3	1196,4	148,4	418,7	204,8	2065,4	97,9	4,9	97,8	0,004

Tabelle 7.16: Identifikation potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom. Dargestellt sind alle zwischen Prostatakarzinomen und tumorfreiem Gewebe differentiell exprimierten und identifizierten Proteine. Proteine mit einer positiven Ratio sind in Prostatakarzinomen im Vergleich zu tumorfreien Proben heraufreguliert, Proteine mit einer negativen Ratio sind entsprechend herunterreguliert.

Spot	Acc. Nr.	Protein-Name	Gerät / Messung	MS				MS/MS			MW	pI
				Score	SC	Peptide	ppm	Score	SC	ppm		
down 01	P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	UTX Bochum	148	42.2						37,4	9,3
down 02	P08670	Vimentin	UTX Bochum	114	37.1						53,6	4,9
down 03	P17661	Desmin	UTX Bochum	269	66.6						53,5	5,1
down 04	P17661	Desmin	UTX Bochum	325	83.8						53,5	5,1
down 05	P17661	Desmin	UTX Bochum	314	81.1						53,5	5,1
down 06	P17661	Desmin	UTX Bochum	316	83.0						53,5	5,1
down 07	P12277	Creatine kinase B-type	UTX Bochum	123	47.8						42,6	5,2
down 08	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	UTX Bochum	106	51.1						32,7	4,5
down 09	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	UTX Bochum	73	25.0						32,7	4,5
down 10	P09493	Tropomyosin alpha-1 chain	UTX Bochum	153	53.2						32,7	4,5
down 11	Q05682	Caldesmon	UTX Bochum	76	22.6						93,2	5,5
up 01	COEA1	Collagen alpha-1(XIV) chain	MALDI Aachen	65	10		50				193,4	5,0
up 02	TCPA	T-complex protein 1 subunit alpha	MALDI Aachen	70	19		50				60,3	6,0
up 03 *	ANXA5	Annexin A5	MALDI Aachen	74	35		80				35,9	4,6
	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	MALDI Aachen	85	26		100	32	3	80	542,4	5,5
	P04217	Alpha-1B-glycoprotein	MaXis Bochum	156	10.9	5	2				54,2	5,5

* = Mix, MW = Molekulargewicht, pI = isoelektrischer Punkt der Proteine, SC = sequenz coverage (Sequenzabdeckung)

Tabelle 7.17: Identifikation potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom. Dargestellt sind alle zwischen Prostatakarzinomen mit Rezidiv und Prostatakarzinomen ohne Rezidiv differentiell exprimierten und identifizierten Proteine. Proteine mit einer positiven Ratio sind in Prostatakarzinomen mit Rezidiv in Vergleich zu Karzinomen ohne Rezidiv heraufreguliert, Proteine mit einer negativen Ratio sind entsprechend herunterreguliert.

Spot	Acc. Nr.	Proteinname	Gerät / Messung	MS				MS/MS			MW	pI
				Score	SC	Pep- tide	ppm	Score	SC	ppm		
down 01	FLNA	Filamin-A	MALDI Aachen	89	13		50	56	0	50	280,6	5,7
down 01	P21333	Filamin-A	MaXis Bochum	457	6.0	15	3				280,6	5,7
down 02	P06396	Gelsolin precursor	MaXis Bochum	348	17.1	13	2				85,6	5,9
down 03	P06396	Gelsolin precursor	MaXis Bochum	139	6.8	6	3				85,6	5,9
down 04	O95394	Phosphoacetylglucosamine mutase	MaXis Bochum	136	8.3	5	512				59,8	5,8
down 05	PTGR2	Prostaglandin reductase 2	MALDI Aachen	69	18		50	58	2	50	38,5	5,1
down 06	LMNA	Lamin-A/C	MALDI Aachen	164	33		20	165	7	20	74,1	7,0
down 07	LMNA	Lamin-A/C	MALDI Aachen	116	37		50				74,1	7,0
down 08	PYGB	Glycogen phosphorylase, brain form	MALDI Aachen	182	39		25				96,6	6,8
down 09	P16870	Carboxypeptidase E precursor	MaXis Bochum	104	6.3	3	3				53,1	4,9
down 10	CO6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	MALDI Aachen	98	12		50				108,5	5,9
down 11	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	MALDI Aachen	128	26		50				59,2	6,8
		Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	LTQ Bochum	47							59,2	6,8
down 12	SCRN1	Secernin-1	MALDI Aachen	140	38		25	33	2	25	46,4	4,4
down 13	P01857	Ig gamma-1 chain C region	MaXis Bochum	91	8.2	3	3				36,1	9,4
down 14	TTC38	Tetratricopeptide repeat protein 38	MALDI Aachen	79	22		30	33	2	10	52,8	5,8
down 15*	MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MALDI Aachen	124	54		80				35,5	8,9
	P51911	Calponin-1	MaXis Bochum	443	29.0	10	3				33,1	9,7
down 16	LEG3	Galectin-3	MALDI Aachen	105	34		50	74	10	30	26,1	8,8
		Galectin-3	LTQ Bochum		39		8,8					26,1
up 01	VINC	Vinculin	MALDI Aachen	74	14		80	91	1	25	123,7	5,3
up 02	COEA1	Collagen alpha-1(XIV) chain	MALDI Aachen	65	10		50				193,4	5,0
up 03	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	MALDI Aachen	65	23		80				72,3	5,1
up 04	SYNEM	Synemin	MALDI Aachen	82	11		80				172,7	5,0
up 05	PAPP	Prostatic acid phosphatase	MALDI Aachen	73	20		120				44,5	6,2
up 06	ANXA4	Annexin A4	MALDI Aachen	58	22		30				35,9	5,8
up 07	TCPA	T-complex protein 1 subunit alpha	MALDI Aachen	70	19		50				60,3	6,0
up 08*	Q9UBR2	Cathepsin Z precursor	MaXis Bochum	137	9.6	3	2				33,8	6,9
	P20774	Mimecan precursor	MaXis Bochum	128	11.4	4	1				33,9	5,3
up 09	KCD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	MALDI Aachen	94	43		80				35,7	5,3
up 10	CAZA1	F-actin-capping protein subunit alpha-1	MALDI Aachen	114	57		50				32,9	5,5
up 11	GLO2	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	MALDI Aachen	62	28		50				33,8	9,3
up 12*	ANXA5	Annexin A5	MALDI Aachen	74	35		80				35,9	4,6
	A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	MALDI Aachen	85	26		100	32	3	80	542,4	5,5
	P04217	Alpha-1B-glycoprotein	MaXis Bochum	156	10.9	5	2				54,2	5,5
up 13	PRDX4	Peroxiredoxin-4	MALDI Aachen	89	30		50				30,5	6,2
up 13	Q13162	Peroxiredoxin-4	MaXis Bochum	182	22.9	6	2				30,5	5,8

* = Mix, MW = Molekulargewicht, pI = isoelektrischer Punkt der Proteine, SC = sequenz coverage (Sequenzabdeckung)

7.2.2 IPA Analysen

Tabelle 7.18: IPA Tabelle alle Proteinabkürzungen die in der Abbildung 4.6 „IPA Analysen der in tumorfreien Geweben und Prostatakarzinomen deregulierten Proteine“ verwendet wurden.

Symbol	Entrez Genname
A1BG	alpha-1-B glycoprotein
ANXA5	annexin A5
Ap3b2	adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit
BFSP1	beaded filament structural protein 1, filensin
CALD1	caldesmon 1
CAPN8	calpain 8
CKB	creatine kinase, brain
COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1
Creatine Kinase 2	--
Cytokeratin	--
DES	desmin
HNRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
HNRPA1-HNRPA2B1-POT1-TERF1-TERF2	--
MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)
METTL18	methytransferase like 18
mir-138	microRNA 138-2
miR-138-1-3p (miRNAs w/seed CUACUUC)	--
miR-138-1-3p (miRNAs w/seed GGCUACU)	--
miR-138-2-3p (miRNAs w/seed CUAUUUC)	--
MOCOS	molybdenum cofactor sulfurase
molybdenum cofactor sulfurtransferase	--
MRPL13	mitochondrial ribosomal protein L13
MTBP	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse) binding protein, 104kDa
NACAD	NAC alpha domain containing
Neb	nebulin
RIBC2	RIB43A domain with coiled-coils 2
RPL39	ribosomal protein L39
SLC25A33	solute carrier family 25 (pyrimidine nucleotide carrier), member 33
SPAG4	sperm associated antigen 4
TCP1	t-complex 1
TMOD4	tropomodulin 4 (muscle)
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)
Tropomyosin	--
VIM	vimentin
YAE1D1	Yae1 domain containing 1

Tabelle 7.19: IPA Tabelle alle Proteinabkürzungen die in der Abbildung 4.7 „IPA Analysen der zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine“ verwendet wurden.

Symbol	Entrez Genname
(6S)-hydroxyhyoscyamine	--
6-aminonicotinamide	--
9130221H12Rik	RIKEN cDNA 9130221H12 gene
A1BG	alpha-1-B glycoprotein
ACPP	acid phosphatase, prostate
Actin-Actn-Ptk2-Pxn-Vcl	--
AF366264 (includes others)	cDNA sequence AF366264
Ang3	angiogenin, ribonuclease A family, member 3
ANXA4	annexin A4
ANXA5	annexin A5
beta-galactosyl(1-3)-N-acetylgalactosamine	--
CAPZA1	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1
chlordecone	--
CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle
COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1
COL6A2	collagen, type VI, alpha 2
Col6a4	collagen, type VI, alpha 4
collagenase clostridium histolyticum	--
CPE	carboxypeptidase E
crocin	--
CTSLP2	cathepsin L pseudogene 2
CTSLP8	cathepsin L pseudogene 8
CTSZ	cathepsin Z
Ddx17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 17
DNAJC1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1
epiallopregnanolone	--
FLNA	filamin A, alpha
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
GLA	galactosidase, alpha
glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	--
Gm5414	predicted gene 5414
Gm15032	predicted gene 15032
GSN	gelsolin
GSN-PI3K-PIP2-Src	--
HAGH	hydroxyacylglutathione hydrolase
HIST1H4G	histone cluster 1, H4g
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
hydroxyacylglutathione hydrolase	--
IGHG1	immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)
Igkv3-4	immunoglobulin kappa variable 3-4
Iglv1	immunoglobulin lambda variable 1
inositol 4,5-bisphosphate	--
iopanoic acid	--
KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12

KIAA0196	KIAA0196
LGALS2	lectin, galactoside-binding, soluble, 2
LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
LMNA	lamin A/C
malate dehydrogenase (NADP)	--
MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
miR-424-3p (miRNAs w/seed AAAACGU)	--
monorden	--
MTNR1A	melatonin receptor 1A
N-acetyllactosamine	--
Nebi	nebulette
OGN	osteoglycin
OSW-1	--
PD 151746	--
penicillamine	--
PGM3	phosphoglucomutase 3
phenylpyruvic acid	--
phosphoacetylglucosamine mutase	--
PRDX4	peroxiredoxin 4
PTGR2	prostaglandin reductase 2
PYGB	phosphorylase, glycogen; brain
S-(2-hydroxyacyl)glutathione	--
S-lactoylglutathione	--
satratoxin G	--
SCRN1	secernin 1
SLN	sarcolipin
SUMO4	small ubiquitin-like modifier 4
SYNM	synemin, intermediate filament protein
TCP1	t-complex 1
tipranavir	--
Tor1aip1	torsin A interacting protein 1
TTC38	tetratricopeptide repeat domain 38
VCL	vinculin
Zfp157	zinc finger protein 157
Zfp568	zinc finger protein 568
Zfp229/Zfp760	zinc finger protein 760

Tabelle 7.20: IPA Tabelle alle Proteinabkürzungen die in der Abbildung 4.8 „IPA Netzwerk, welches für Zelltod und Überleben, Krebs und zelluläre Entwicklung verantwortlich ist“ verwendet wurden.

Symbol	Entrez Genname
Akt	--
AXL	AXL receptor tyrosine kinase
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CLCA2	chloride channel accessory 2
DES	desmin
FLII	flightless I homolog (Drosophila)
FSH	--
GATA4	GATA binding protein 4
HAND2	heart and neural crest derivatives expressed 2
IL8	interleukin 8
ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
KCNJ4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4
KSR2	kinase suppressor of ras 2
let-7	microRNA let-7a-1
let-7a-5p (and other miRNAs w/seed GAGGUAG)	--
Lh	--
mir-21	microRNA 21
MYO1E	myosin IE
MYOCD	myocardin
NFkB (complex)	--
NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
P38 MAPK	--
PARK2	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase
PPP2CA	protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme
PTTG1	pituitary tumor-transforming 1
TBX5	T-box 5
TCP1	t-complex 1
TGFB1	transforming growth factor, beta 1
TNFSF11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
TP53	tumor protein p53
TP63	tumor protein p63
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)
VIM	vimentin

Tabelle 7.21: IPA Tabelle alle Proteinabkürzungen die in der Abbildung 4.9 „Einordnung der zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine in IPA Netzwerke“ verwendet wurden.

Symbol	Entrez Genname
26s Proteasome	--
ACPP	acid phosphatase, prostate
ACTB	actin, beta
Actin	--
Alpha Actinin	--
ANXA5	annexin A5
Arp2/3	--
BMP4	bone morphogenetic protein 4
CAPZA1	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
CD80	CD80 molecule
CD83	CD83 molecule
CD86	CD86 molecule
CDC42	cell division cycle 42
CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle
CTSZ	cathepsin Z
F Actin	--
FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
FLNA	filamin A, alpha
FSH	--
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
GSN	gelsolin
Histone h3	--
Histone h4	--
HLA-DR	--
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)
IgG	--
IL13	interleukin 13
IL2	interleukin 2
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
KAT5	K(lysine) acetyltransferase 5
LDL	--
LEP	leptin
LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1
LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3
Lh	--
LILRB2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2
LMNA	lamin A/C
MBD2	methyl-CpG binding domain protein 2
MDH2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
MUC1	mucin 1, cell surface associated
NFkB (complex)	--

OGN	osteoglycin
P38 MAPK	--
PARK2	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase
PDGF BB	--
PI3K (complex)	--
PLG	plasminogen
PRL	prolactin
PTK2	protein tyrosine kinase 2
Rac	--
RB1	retinoblastoma 1
SCNN1A	sodium channel, non-voltage-gated 1 alpha subunit
SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
SPHK1	sphingosine kinase 1
SRC (family)	--
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1
SYNM	synemin, intermediate filament protein
TCP1	t-complex 1
TCR	--
TGFB1	transforming growth factor, beta 1
TNF	tumor necrosis factor
VCL	vinculin
VIM	vimentin

7.2.3 Multiple Reaction Monitoring

Tabelle 7.22: detaillierte Auflistung aller Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte aller durchgeführten MRM Messungen

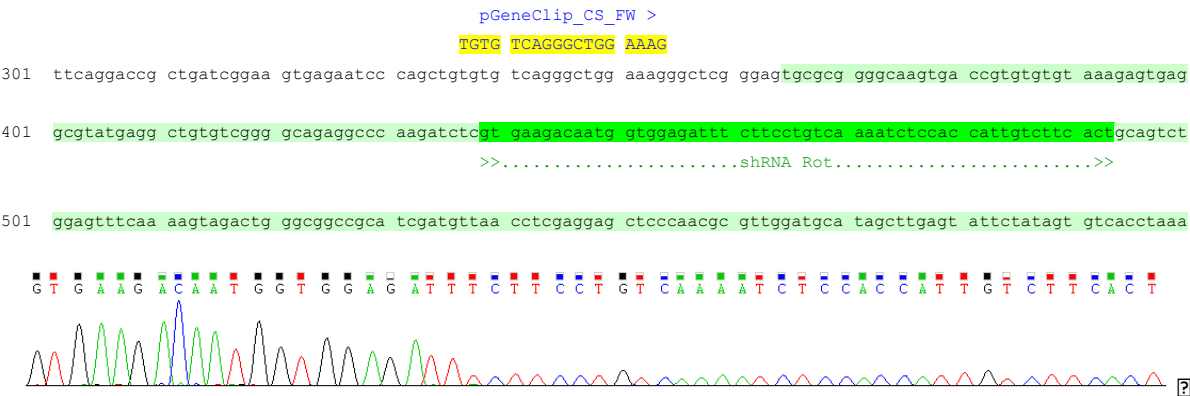
Protein Peptid Patientenkollektiv	MW K	SA K	MW PCA	SA PCA	MW -R	SA -R	MW +R	MW -R	p (K vs PCA)	p (K vs -R)	p (K vs +R)	p (-R vs +R)
Alpha-1B-Glycoprotein GVTFLLR Serum gesamt *	3,184	1,332	1,529	0,676	1,398	0,620	1,805	0,717	<0,001	<0,001	0,004	0,061
Alpha-1B-Glycoprotein GVTFLLR Serum Aachen *	3,184	1,332	2,277	0,820	1,922	0,768	2,632	0,750	0,090	0,028	0,439	0,046
Alpha-1B-Glycoprotein GVTFLLR Serum Bonn *	-	-	1,345	0,489	1,309	0,553	1,438	0,244	-	-	-	0,066
Alpha-1B-Glycoprotein GVTFLLR Urin Aachen **	10,640	10,853	24,965	39,497	39,205	48,328	6,657	9,529	0,376	0,157	1,000	0,017
Gelsolin HVVPEVVQR Serum gesamt *	0,973	0,439	0,522	0,219	0,484	0,204	0,603	0,232	0,002	0,001	0,014	0,019
Gelsolin HVVPEVVQR Serum Aachen *	0,973	0,439	0,775	0,257	0,698	0,264	0,852	0,241	0,407	0,245	0,699	0,248
Gelsolin HVVPEVVQR Serum Bonn *	-	-	0,460	0,157	0,447	0,170	0,492	0,116	-	-	-	0,107
Gelsolin HVVPEVVQR Urin Aachen **	12,398	24,742	2,547	2,671	3,595	3,161	1,199	0,866	0,658	0,906	0,475	0,039
GRP78 ITPSYVAFTPEGER Serum gesamt *	0,011	0,005	0,005	0,003	0,005	0,003	0,006	0,003	0,001	0,001	0,002	0,487
GRP78 ITPSYVAFTPEGER Serum Aachen *	0,011	0,005	0,008	0,003	0,007	0,002	0,008	0,004	0,076	0,120	0,120	0,958
GRP78 ITPSYVAFTPEGER Serum Bonn *	-	-	0,005	0,002	0,005	0,003	0,005	0,002	-	-	-	0,971
GRP78 ITPSYVAFTPEGER Urin Aachen **	1,204	2,806	0,357	0,350	0,523	0,376	0,143	0,155	0,122	0,045	0,568	0,005
Vinculin SLGEISALTSK Serum gesamt *	0,003	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001	0,003	0,002	0,148	0,075	0,655	0,007
Vinculin SLGEISALTSK Serum Aachen *	0,003	0,002	0,003	0,002	0,002	0,001	0,004	0,002	0,707	0,156	0,471	0,012
Vinculin SLGEISALTSK Serum Bonn *	-	-	0,002	0,001	0,002	0,001	0,003	0,002	-	-	-	0,236
Vinculin SLGEISALTSK Urin Aachen **	0,099	0,089	0,168	0,167	0,200	0,201	0,128	0,111	0,438	0,479	0,520	0,426
Annexin A5 GTVTDFPGFDER Urin Aachen **	1,291	1,968	1,246	0,635	1,472	0,716	0,955	0,386	0,185	0,157	0,391	0,186
TTC38 IVQLGGSNAQR Urin Aachen **	0,045	0,059	0,057	0,050	0,079	0,055	0,029	0,025	0,282	0,125	0,825	0,034

Galectin-3 IALDFQR Urin Aachen **	1,287	2,519	0,447	0,432	0,625	0,495	0,217	0,170	0,658	0,389	0,617	0,017
PPAP FVTLVFR Urin Aachen **	1,535	1,578	11,529	13,186	15,665	15,494	6,212	7,480	0,012	0,010	0,101	0,223

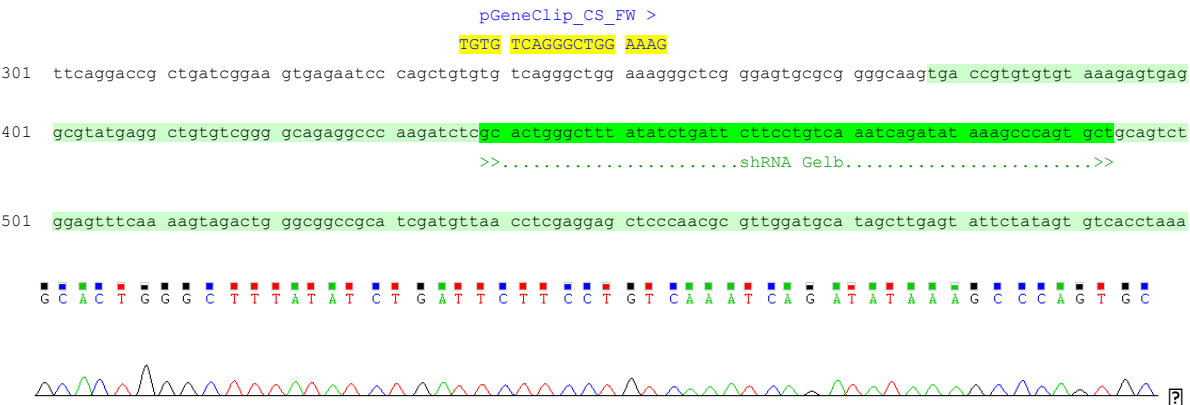
* Einheiten Serum [nmol/ml], ** Einheiten Urin [pmol/mg]

7.2.4 funktionelle Analysen

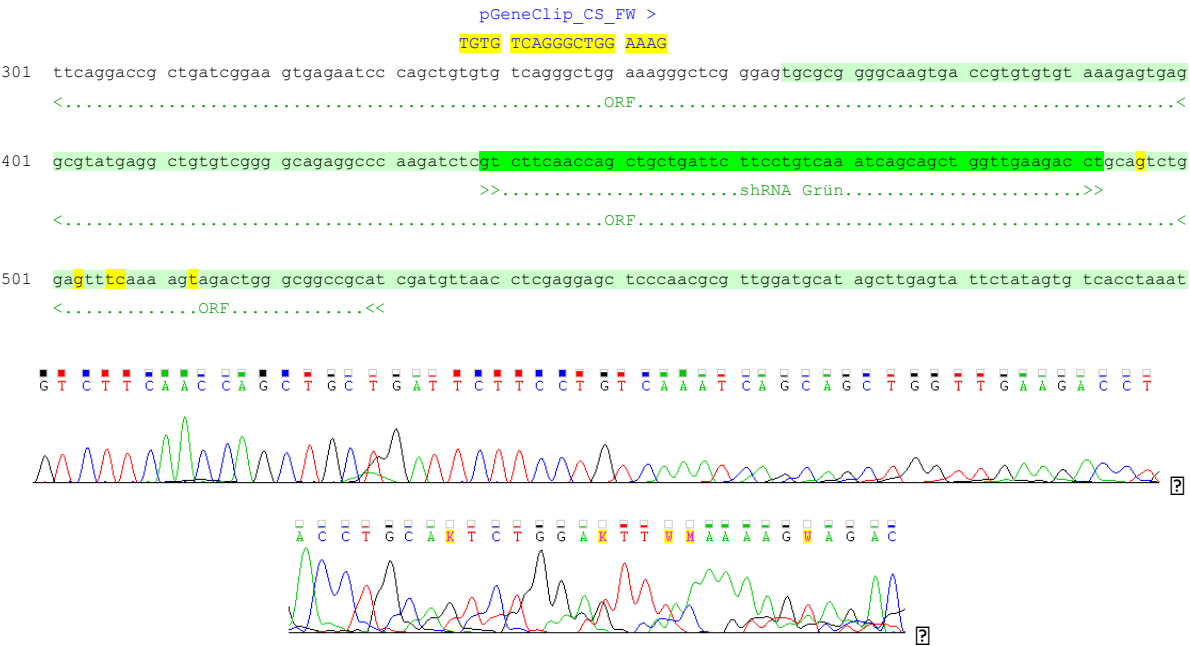
A)



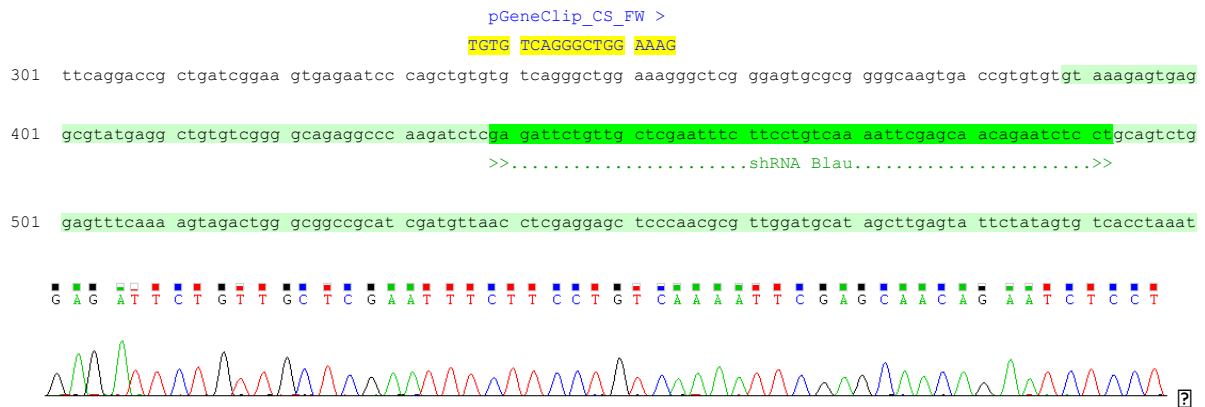
B)



C)



D)



E)

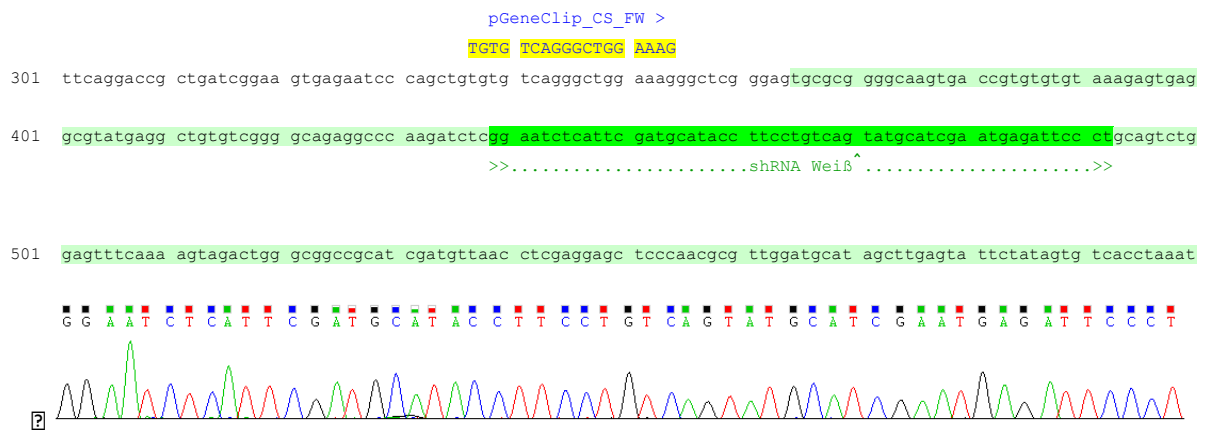


Abbildung 7.1: Ergebnisse der Sequenzierung der shRNA-Plasmide (SureSilencing shRNA Plasmid for Human TTC38, Qiagen, Hilden, Deutschland) nach der Amplifikation in *E. Coli* JM101. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Sequenz des Plasmides an der Stelle der eingefügten shRNA. Die Zahl vor der Sequenz gibt die Position im Plasmid wieder. Die Nummerierung orientiert sich hierbei an der Kartierung des grundlegenden Vektors „pGeneClip“. Im Bereich 337 bp bis 354 bp bindet der verwendete Sequenzierungsprimer. Hellgrün markiert sind per Sequenzierung verifizierte Abschnitte. Grün markiert ist die shRNA-Sequenz. Das Elektropherogramm der shRNA-Sequenz ist unterhalb der Sequenz abgebildet. Die shRNA-Sequenz wurde immer vollständig verifiziert. **A)** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Sequenzierung des shRNA-Plasmides Rot (Knockdown). **B)** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Sequenzierung des shRNA-Plasmides Gelb (Knockdown). **C)** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Sequenzierung des shRNA-Plasmides Grün (Knockdown). **D)** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Sequenzierung des shRNA-Plasmides Blau (Knockdown). Keiner der sequenzierten Bereiche der Plasmide weist Mutationen auf. Die Sequenzierung, Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch Herrn Michael Moll im Rahmen seiner Masterarbeit unter Anleitung von Frau Cordelia Geisler (Moll, 2012).

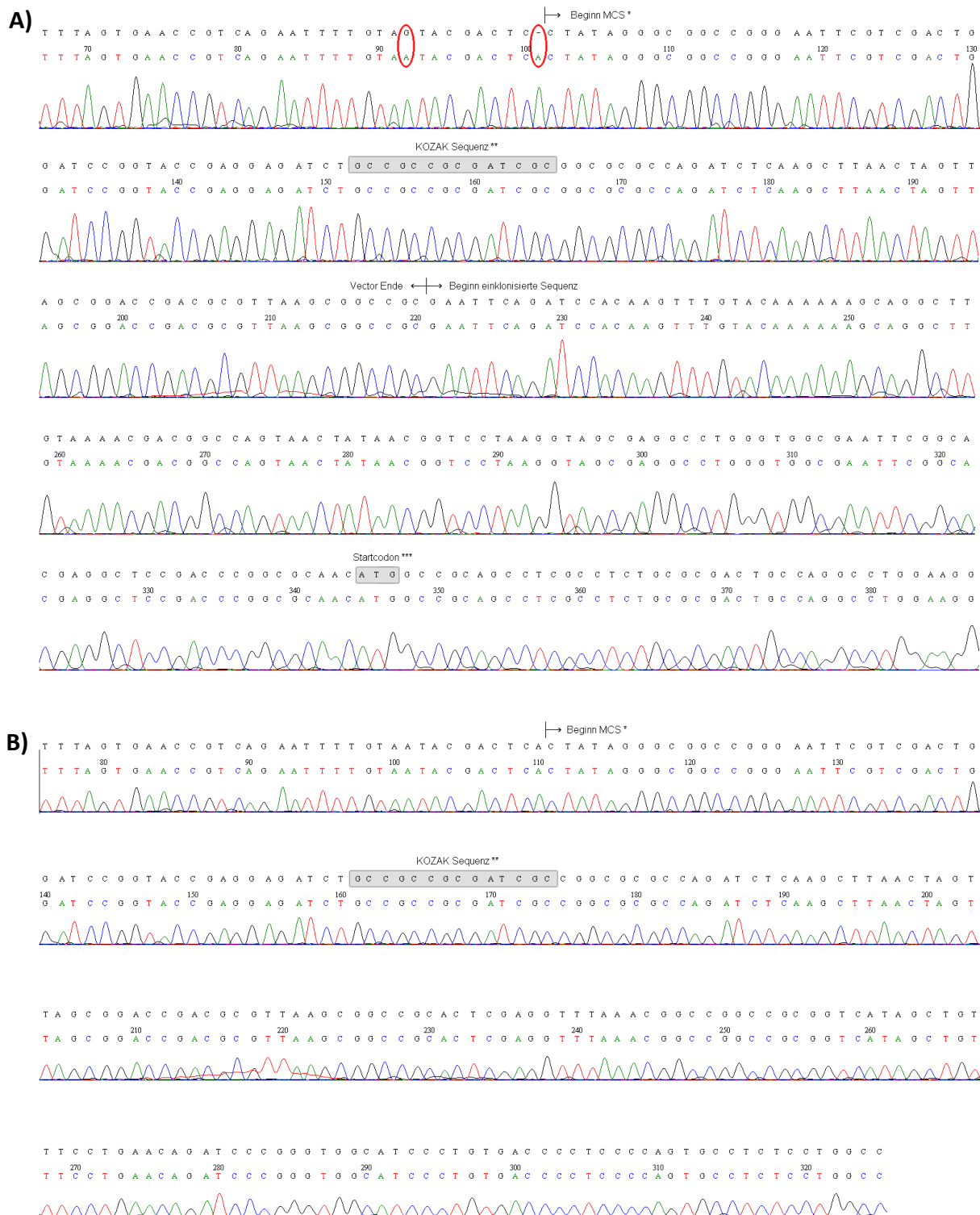


Abbildung 7.2: Ergebnisse der Sequenzierung des TTC38 Überexpressionsvektors sowie des zugehörigen Kontrollvektors pCMV6-AC (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) nach der Amplifikation in *E. Coli* JM101. Dargestellt sind Ausschnitte der Sequenz des Plasmides an der Stelle der eingefügten TTC38 cDNA. **A)** Vollvektor mit eingefügter TTC38 cDNA. **B)** Leervektor, der zur Herstellung von Kontrollklonen diente. Der Vollvektor weist eine Inversion und eine Mutation im nicht-codierenden Sequenzbereich auf. Mutationen im codierenden Bereich liegen in den sequenzierten Teilabschnitten nicht vor. * Multiple Cloning Site; ** Konsensussequenz, die für den Start Translation im Rahmen der Proteinbiosynthese benötigt wird; *** erstes Codon des Open Reading Frames (offener Leserahmen).

Tabelle 7.23: Ergebnisse der LC-MS Analysen von TTC38 Knockdown und Überexpressionsklonen zur Identifikation von Proteinen, welche in den TTC3-Knockdown und Überexpressionsklonen dereguliert vorliegen und mit der TTC38 Expression korrelieren.

Accession No.	Proteinname	Peptid Anzahl	Peptide zur Quantifizierung	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
Q5R3I4	Tetratricopeptide repeat protein 38	1	1	54,35	0,00E+00		1	
B4DRN7	C2 domain-containing protein 5	2	1	83,33	7,95E-05	10,11	0,692	<0,01
O75787	Renin receptor	1	1	41,92	5,44E-06	9,08	0,732	<0,01
P35251	Replication factor C subunit 1	2	2	118,71	2,77E-13	8,63	0,645	<0,01
Q5C9Z4	Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1	1	1	83,96	7,61E-10	6,18	0,523	<0,01
Q12789	General transcription factor 3C polypeptide 1	1	1	32,19	3,76E-05	5,87	0,634	<0,01
E9PFK5	Nucleolar protein 14	1	1	31,55	4,05E-04	5,66	0,531	<0,01
Q92581	Sodium/hydrogen exchanger 6	1	1	71,58	7,05E-05	4,73	0,674	<0,01
Q9P270	SLAIN motif-containing protein 2	1	1	35,26	1,65E-03	4,63	0,552	<0,01
O94761	ATP-dependent DNA helicase Q4	1	1	42,51	1,56E-03	4,29	0,677	<0,01
Q14692	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	4	4	212,99	2,96E-12	4,23	0,608	<0,01
H0YCE8	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog (Fragment)	1	1	76,63	1,57E-02	4,22	0,512	<0,01
Q3KQU3	MAP7 domain-containing protein 1	1	1	88,35	9,17E-08	4,13	0,562	<0,01
Q9NTI5	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	1	1	36,95	4,07E-05	3,96	0,606	<0,01
O14981	TATA-binding protein-associated factor 172	1	1	59,67	2,27E-04	3,92	0,601	<0,01
Q9Y2L1	Exosome complex exonuclease RRP44	2	1	107,95	7,04E-09	3,70	0,623	<0,01
Q8NDT2	Putative RNA-binding protein 15B	1	1	36,97	1,11E-16	3,44	0,579	<0,01
F8WEZ4	Tetratricopeptide repeat protein 26	1	1	31,53	2,63E-07	3,33	0,520	<0,01
Q8I WV7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR1	1	1	56,53	1,03E-03	3,29	0,519	<0,01
F5GX05	Band 4.1-like protein 3	10	8	562,92	3,55E-03	3,29	0,521	<0,01
Q9UJX5	Anaphase-promoting complex subunit 4	1	1	30,22	1,24E-03	3,28	0,620	<0,01
Q13751	Laminin subunit beta-3	2	2	98,27	3,90E-02	3,24	0,651	<0,01
Q8NI27	THO complex subunit 2	4	4	232,02	3,58E-13	3,13	0,564	<0,01
Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B	1	1	35,76	6,44E-08	3,07	0,650	<0,01
Q6ZXV5	Transmembrane and TPR repeat-containing protein 3	1	1	38,46	2,20E-06	3,03	0,594	<0,01
A6NIT2	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform	1	1	74,92	1,98E-03	2,96	0,561	<0,01
Q02880	DNA topoisomerase 2-beta	9	8	511,7	9,84E-12	2,93	0,500	<0,01
G3V1C4	Cell division cycle 27, isoform CRA_b	2	1	80,96	1,28E-08	2,85	0,546	<0,01
J9JIE6	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	1	1	57,29	2,92E-11	2,82	0,545	<0,01
B4DVG8	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	1	1	63,84	1,26E-09	2,77	0,573	<0,01
O60287	Nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1	2	2	106,52	5,23E-09	2,71	0,588	<0,01
O14802	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	1	1	85,63	1,58E-05	2,69	0,504	<0,01
Q9P260	LisH domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468	3	3	235,18	4,60E-04	2,62	0,559	<0,01
Q6ZRS2	Helicase SRCAP	1	1	45,61	6,73E-05	2,49	0,525	<0,01
P46934	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	2	1	89,64	5,29E-03	2,48	0,510	<0,01
O15040	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 2	1	1	41,28	1,06E-02	2,41	0,547	<0,01
P03915	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	1	1	98,1	2,68E-05	2,41	0,503	<0,01
Q9BQK8	Phosphatidate phosphatase LPIN3	1	1	49,04	1,04E-04	2,40	0,509	<0,01
Q14690	Protein RRP5 homolog	9	9	544,66	4,25E-08	2,40	0,547	<0,01
B1AN89	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	1	1	32,75	2,95E-04	2,38	0,601	<0,01
H3BSH7	Cirhin (Fragment)	1	1	72,56	1,38E-08	2,36	0,587	<0,01

Q15058	Kinesin-like protein KIF14	1	1	42,41	2,89E-05	2,36	0,646	<0,01
Q9BQG0	Myb-binding protein 1A	20	19	1230,61	1,11E-12	2,36	0,505	<0,01
Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1	9	9	518,91	5,10E-11	2,34	0,644	<0,01
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	90	85	5548	2,68E-09	2,25	0,559	<0,01
O75165	DnaJ homolog subfamily C member 13	3	2	172,2	1,44E-07	2,24	0,614	<0,01
F5GZJ1	Condensin complex subunit 1	4	4	282,42	2,58E-07	2,20	0,639	<0,01
Q9ULH1	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	2	1	110,47	5,17E-10	2,20	0,586	<0,01
Q460N5	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	3	3	161,28	5,06E-06	2,18	0,651	<0,01
P48651	Phosphatidylserine synthase 1	2	2	118,76	8,17E-07	2,15	0,522	<0,01
Q6N021	Methylcytosine dioxygenase TET2	1	1	35,72	6,43E-06	2,13	0,504	<0,01
F5GWX5	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	21	15	1226,44	2,99E-05	2,09	0,540	<0,01
P26358	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	6	6	371,59	2,56E-06	2,08	0,704	<0,01
B9ZVN9	DNA-directed RNA polymerase	4	4	244,68	6,43E-04	2,08	0,676	<0,01
P18827	Syndecan-1	4	4	348,81	4,07E-03	2,04	0,791	<0,01
Q96P70	Importin-9	8	8	625,19	4,08E-06	2,04	0,656	<0,01
O60524	Nuclear export mediator factor NEMF	5	5	245,98	2,15E-07	2,03	0,728	<0,01

Tabelle 7.24: Ergebnisse der LC-MS Analysen der TTC38 Knockdown und Überexpressionsklone. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der in den klonen dereguliert vorliegenden Proteine, welche außerdem mit der TTC38-Expression korrelieren.

Accession No.	Proteinname	Korrelations-koeffizient	MW TTC38 Knockdown-klone blau	SA TTC38 Knockdown-klone blau	MW Kontroll-klone weiß	SA Kontroll-klone weiß	MW Kontroll-klone TTC38 Überexpression	SA Kontroll-klone TTC38 Überexpression	MW TTC38 Überexpressions-klone	SA TTC38 Überexpressions-klone
Q5R3I4	Tetratricopeptide repeat protein 38	1	0,0	0,0	90,4	70,4	248,3	70,0	2187,8	3148,3
B4DRN7	C2 domain-containing protein 5	0,692	206,7	311,3	812,8	536,1	525,5	470,7	2089,3	1022,5
O75787	Renin receptor	0,732	351,9	202,9	528,4	325,3	1085,4	581,6	2643,9	1043,7
P35251	Replication factor C subunit 1	0,645	559,9	358,5	751,6	214,0	2650,1	876,5	3555,1	1143,2
Q5C9Z4	Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1	0,523	192,4	90,5	246,4	159,0	432,6	164,8	682,0	150,9
Q12789	General transcription factor 3C polypeptide 1	0,634	355,8	123,0	489,2	346,6	1061,9	814,5	2089,0	720,9
E9PFK5	Nucleolar protein 14	0,531	1242,9	635,6	1449,9	836,4	1994,5	1084,5	3954,5	965,2
Q92581	Sodium/hydrogen exchanger 6	0,674	631,9	250,5	729,7	617,8	1308,8	1249,4	2800,7	1189,3
Q9P270	SLAIN motif-containing protein 2	0,552	160,2	163,1	223,9	291,6	232,2	146,7	741,7	384,9
O94761	ATP-dependent DNA helicase Q4	0,677	284,4	264,1	327,3	179,9	614,6	444,1	807,9	608,7
Q14692	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	0,608	6281,5	2502,9	5944,8	2251,6	1,0E04	2103,9	1,5E04	4719,6
H0YCE8	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog (Fragment)	0,512	163,4	81,6	264,3	272,4	132,0	93,7	557,2	180,7
Q3KQU3	MAP7 domain-containing protein 1	0,562	1227,5	644,7	1790,4	922,9	2016,9	730,7	5073,4	930,1
Q9NTI5	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	0,606	1200,0	737,6	1254,8	464,9	2863,5	995,0	3472,4	1235,9
O14981	TATA-binding protein-associated factor 172	0,601	285,6	207,3	340,3	278,2	480,1	193,0	1040,5	573,4
Q9Y2L1	Exosome complex exonuclease RRP44	0,623	2269,4	726,0	2210,2	578,4	3537,3	1744,9	5896,5	1570,5
Q8NDT2	Putative RNA-binding protein 15B	0,579	1507,0	203,0	1348,4	396,7	2664,9	621,4	3068,7	694,2
F8WEZ4	Tetratricopeptide repeat protein 26	0,520	188,6	66,1	181,8	159,0	296,8	133,6	599,8	116,5
Q8I WV7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR1	0,519	200,1	94,9	146,4	207,4	272,8	161,1	481,4	228,1
F5GX05	Band 4.1-like protein 3	0,521	2,5E04	1,4E04	2,7E04	2,3E04	2,8E04	1,8E04	8,2E04	3,9E04
Q9UJX5	Anaphase-promoting complex subunit 4	0,620	136,0	114,4	173,0	133,9	243,7	79,1	446,4	183,2
Q13751	Laminin subunit beta-3	0,651	1375,2	840,4	1520,7	1110,5	1093,5	1404,8	2165,1	1820,5
Q8NI27	THO complex subunit 2	0,564	5619,6	1171,8	5643,0	1863,3	9795,2	2875,0	1,3E04	3840,2
Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B	0,650	867,7	473,9	817,8	375,2	1712,8	466,8	2514,6	990,4
Q6ZXV5	Transmembrane and TPR repeat-containing protein 3	0,594	307,5	141,7	259,6	131,6	574,5	186,2	787,1	306,2
A6NIT2	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform	0,561	553,1	382,1	821,3	746,8	626,2	303,6	1635,1	635,9
Q02880	DNA topoisomerase 2-beta	0,500	1,7E04	6453,3	2,4E04	1,1E04	4,9E04	7624,4	5,0E04	1,1E04

G3V1C4	Cell division cycle 27, isoform CRA_b	0,546	350,3	104,6	247,3	82,8	592,0	190,2	704,2	231,2
J9JIE6	Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 1	0,545	3397,2	686,2	3815,7	1226,6	6218,6	2304,0	9433,4	2678,9
B4DVG8	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16	0,573	443,4	136,3	589,9	213,5	886,3	233,1	1139,8	433,8
O60287	Nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1	0,588	795,8	279,6	909,0	275,4	1278,7	447,0	1711,3	457,6
O14802	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1	0,504	949,2	420,6	902,8	303,4	1367,3	650,7	1788,4	592,1
Q9P260	LisH domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468	0,559	2079,2	1490,8	2864,9	2036,1	2080,2	1126,4	5450,6	1803,2
Q6ZRS2	Helicase SRCAP	0,525	279,1	153,0	302,2	161,1	531,4	76,1	664,0	167,6
P46934	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	0,510	431,0	225,5	675,2	322,5	409,4	347,4	1014,0	392,4
O15040	Tectonin beta-propeller repeat-containing protein 2	0,547	512,0	227,7	473,8	278,1	296,3	206,1	715,2	376,8
P03915	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	0,503	1844,4	701,6	2372,5	828,2	2561,4	1538,3	4446,7	1004,6
Q9BQK8	Phosphatidate phosphatase LPIN3	0,509	684,7	343,1	695,4	275,8	739,8	411,9	1328,1	275,3
Q14690	Protein RRP5 homolog	0,547	1,6E04	4640,2	1,9E04	4023,9	2,9E04	6663,4	3,1E04	9503,2
B1AN89	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	0,601	605,7	195,4	603,7	306,2	795,4	323,6	1176,4	328,5
H3BSH7	Cirhin (Fragment)	0,587	5029,5	1539,0	5422,3	1431,9	7167,8	1917,2	9643,1	2315,8
Q15058	Kinesin-like protein KIF14	0,646	292,0	106,3	313,0	159,2	464,3	101,5	688,8	248,2
Q9BQG0	Myb-binding protein 1A	0,505	8,4E04	1,8E04	8,6E04	1,7E04	1,3E05	1,8E04	1,5E05	3,2E04
Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1	0,644	1,9E04	5408,9	2,3E04	6006,1	2,5E04	4649,5	3,9E04	8420,0
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	0,559	7,4E05	2,4E05	7,7E05	1,5 E05	1,2E06	1,5E05	1,3E06	2,9E05
O75165	DnaJ homolog subfamily C member 13	0,614	2022,8	1049,1	3064,2	1197,5	3290,9	461,4	4540,9	1289,2
F5GZJ1	Condensin complex subunit 1	0,639	7466,4	3820,2	1,3E04	4055,0	1,0E04	2308,3	1,6E04	5192,5
Q9ULH1	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	0,586	1009,0	393,2	1212,6	168,2	1753,8	535,5	2215,5	433,9
Q460N5	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	0,651	2342,2	608,4	2443,0	556,8	3291,6	926,2	5105,9	1714,1
P48651	Phosphatidylserine synthase 1	0,522	8420,4	3120,5	7731,8	1655,5	9878,1	2820,7	1,6E04	3813,1
Q6N021	Methylcytosine dioxygenase TET2	0,504	2378,1	296,4	2851,8	1077,8	1880,9	778,3	4005,1	728,5
F5GWX5	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	0,540	4,0E04	1,6E04	3,8E04	1,5E04	6,3E04	8093,1	7,5E04	1,8E04
P26358	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	0,704	2,3E04	9008,2	2,2E04	6662,1	3,7E04	6369,8	4,0E04	1,6E04
B9ZVN9	DNA-directed RNA polymerase	0,676	4130,8	1079,3	4867,2	2096,3	5954,1	1411,6	7663,6	3055,1
P18827	Syndecan-1	0,791	1,2E05	2,7E04	1,0E05	4,0E04	1,1E05	4,6E04	1,5E05	1,0E05
Q96P70	Importin-9	0,656	1,8E04	4109,6	2,3E04	3392,1	1,9E04	6731,6	3,7E04	1,0E04
O60524	Nuclear export mediator factor NEMF	0,728	1,4E04	4367,6	1,3E04	5347,7	1,9E04	3283,5	2,8E04	8250,8

MW= Mittelwert, SA=Standardabweichung

Tabelle 7.25: Funktion der mit TTC38 assoziierten Proteine, ihre Lokalisation, Funktion und Assoziation mit verschiedenen Krebsarten.

Accession Nr.	Symbol	Proteinname	Lokalisation
	Typ	assoziiert mit...	Funktion
Q9UJX5	ANAPC4 Enzym	anaphase promoting complex subunit 4 Adenokarzinom, Kolonkarzinom, Klarzelladenokarzinom	Nukleus 1
Q9ULH1	ASAP1 andere	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1 Adenokarzinom, Kolonkarzinom	Plasmamembran 2, 9
O75787	ATP6AP2 Transporter	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2	Zytoplasma 10
Q14692	BMS1 andere	BMS1 ribosome biogenesis factor Adenokarzinom	Nukleus 10
O14981	BTAF1 Transkriptions- regulator	BTAF1 RNA polymerase II, B-TFIID transcription factor-associated, 170kDa Adenokarzinom, Klarzelladenomkarziom	Nukleus 5
Q86YS7	C2CD5 andere	C2 calcium-dependent domain containing 5 Adenokarzinom, Kolonkarzinom, endometrioides Karzinom	Zytoplasma 10
P30260	CDC27 andere	cell division cycle 27 Adenokarzinom, Kolonkarzinom, Klarzelladenokarzinom, Brustkrebs, Prostatakarzinom, endometrioides Karzinom	Nukleus 1
Q14839	CHD4 Enzym	chromodomain helicase DNA binding protein 4 Adenokarzinom, endometrioides Karzinom	Nukleus 5, 9
Q969X6	CIRH1A Andere	cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin) Adenokarzinom, Brustkrebs	Nukleus 5
Q6PD62	CTR9 andere	CTR9, Paf1/RNA polymerase II complex component Adenokarzinom, Kolonkarzinom	Nukleus 10
Q92620	DHX38 Enzym	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 38 endometrioides Karzinom	Nukleus 10
Q9Y2L1	DIS3 Enzym	DIS3 mitotic control homolog (S. cerevisiae) endometrioides Karzinom	Nukleus 10
O75165	DNAJC13 andere	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13 endometrioides Karzinom	Zytoplasma 10
P26358	DNMT1 Enzym	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1 Adenokarzinom, Kolonkarzinome, Hodenkrebs, myeloide Neoplasien, refraktäre Anämien, chronisch myeloische Leukämie, myeloplastisches Syndrom, Prostatakarzinom, endometrioides Karzinom, akute myeloische Leukämie	Nukleus 1, 2, 3, 5
B1AN89	EIF4G3 Translations- regulator	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 Adenokarzinom	Zytoplasma 5
Q9Y2J2	EPB41L3 andere	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 Adenokarzinom, Kolonkarzinom, Metastasierung	Plasmamembran 10
Q53EP0	FNDC3B andere	fibronectin type III domain containing 3B Adenokarzinom	Zytoplasma 10
Q12789	GTF3C1 Transkriptions- regulator	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa Adenokarzinom, Kolonkarzinom	Nukleus 5
Q6P664	HEATR1 andere	HEAT repeat containing 1 Brustkrebs	Nukleus 5
Q96P70	IPO9 Transporter	importin 9 endometrioides Karzinom	Nukleus 10

Q9P260	KIAA1468 andere	KIAA1468 Adenokarzinom, Klarzelladenomkarziom	andere 10
Q15058	KIF14 andere	kinesin family member 14 Adenokarzinom, Kolonkarzinom, endometrioides Karzinom, Reteinoblastom, Catecholamin-sekretierendem Tumor,	Zytoplasma 1, 2, 3
Q13751	LAMB3 Transporter	laminin, beta 3 Adenokarzinom, Brustkrebs, endometrioides Karzinom, Metastasierung	Extrazellulärraum 10
Q9BQK8	LPIN3 Phosphatase	lipin 3	Nukleus 10
Q3KQU3	MAP7D1 andere	MAP7 domain containing 1 Adenokarzinom	andere 10
P03915	MT-ND5 Enzym	NADH dehydrogenase, subunit 5 (complex I) Adenokarzinom, Klarzelladenokarzinom, Brustkrebs, endometrioides Karzinom, myeloplastisches Syndrom	Zytoplasma 10
Q9BQG0	MYBBP1A Transkriptions-regulator	MYB binding protein (P160) 1a	Nukleus 5
Q15021	NCAPD2 andere	non-SMC condensin I complex, subunit D2 Adenokarzinom, Kolonkarzinom	Nukleus 1, 2, 3
P46934	NEDD4 Enzym	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4, E3 ubiquitin protein ligase Karzinom	Zytoplasma 6
O60524	NEMF andere	nuclear export mediator factor	Nukleus 10
Q5C9Z4	NOM1 andere	nucleolar protein with MIF4G domain 1	Nukleus 10
P78316	NOP14 andere	NOP14 nucleolar protein endometrioides Karzinom	Nukleus 10
Q460N5	PARP14 andere	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14 Adenokarzinom, Kolonkarzinom	Zytoplasma 10
Q14690	PDCD11 andere	programmed cell death 11 Karzinomen	Nukleus 10
Q9NTI5	PDS5B andere	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B (S. cerevisiae) Adenokarzinom, Kolonkarzinom, Brustkrebs, endometrioides Karzinom	Nukleus 2
P46020	PHKA1 kinase	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle) Adenokarzinom, Kolonkarzinom	Zytoplasma 10
O95602	POLR1A Enzym	polymerase (RNA) I polypeptide A, 194kDa	Nukleus 10
O14802	POLR3A Enzym	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A, 155kDa Adenokarzinom, endometrioides Karzinom	Nukleus 10
P78527	PRKDC Kinase	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide Adenokarzinom, Kolonkarzinom, endometrioides Karzinom, Radioresistenz von Tumoren	Nukleus 1, 3, 5
P48651	PTDSS1 Enzym	phosphatidylserine synthase 1 Adenokarzinomen, Kolonkarzinomen	Zytoplasma 10
Q8NDT2	RBM15B andere	RNA binding motif protein 15B Adenokarzinom, Kolonkarzinom, endometrioides Karzinom	Nukleus 10
O94761	RECQL4 Enzym	RecQ protein-like 4	Nukleus 10

P35251	RFC1 Transkriptions- regulator	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa Adenokarzinom, Kolonkarzinom	Nukleus 10
P18827	SDC1 Enzym	syndecan 1 Kolonkarzinom, Brustkrebs, Metastasierung	Plasmamembran 10
Q9P270	SLAIN2 andere	SLAIN motif family, member 2	Zytoplasma 10
Q92581	SLC9A6 Transporter	solute carrier family 9, subfamily A (NHE6, cation proton antiporter 6), member 6	Plasmamembran 10
Q6ZRS2	SRCAP Transkriptions- regulator	Snf2-related CREBBP activator protein Adenokarzinom, Kolonkarzinom, Prostatakarzinom	Zytoplasma 5
O15040	TECPR2 andere	tectonin beta-propeller repeat containing 2 Karzinomen	andere 10
Q6N021	TET2 andere	tet methylcytosine dioxygenase 2 myeloide Neoplasie, chronische myeloische Leukmie, akute myeloische Leukämie, myeloplastisches Syndrom, Brustkrebs, Mastozytose	andere 4, 7, 8
Q8NI27	THOC2 andere	THO complex 2	Nukleus 10
Q9UM00	TMCO1 andere	transmembrane and coiled-coil domains 1 Adenokarzinom, Kolonkarzinom, Brustkrebs	andere 10
Q6ZXV5	TMTC3 andere	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3 Adenokarzinom, Kolonkarzinom	andere 10
Q02880	TOP2B Enzym	topoisomerase (DNA) II beta 180kDa Adenokarzinom, Kolonkarzinom, Hodenkrebs, akute myeloische Leukämie, Kaposi Sarkom, intracranial Ependymom, Kleinzelliges Lungenkarzinom, neuroektodermaler Tumor, Brustkrebs, Prostatakarzinom, Gliom, urotheliale Blasenkarzinome, endometrioides Karzinom, catecholamin-sekretierende Tumore, Metastasierung	Nukleus 1, 2, 3
Q96CU4	TTC26 andere	tetratricopeptide repeat domain 26	Extrazellulärraum 10
Q5R3I4	TTC38 andere	tetratricopeptide repeat domain 38 Kolonkarzinom, Brustkrebs	andere 10
Q8IWW7	UBR1 Enzym	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1	Zytoplasma 10
O60287	URB1 andere	URB1 ribosome biogenesis 1 homolog (S. cerevisiae)	Nukleus 10

* **Molekulare und zelluläre Funktion:** 1) Zellzyklus, 2) zelluläres Assembling und Organisation, 3) DNA Replikation, Rekombination und Reparatur, 4) zelluläre Entwicklung, 5) Genexpression; **Entwicklung und Funktion des physiologischen Systems:** 6) Entwicklung des Organismus, 7) Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems, 8) Hämatopoese, 9) Entwicklung und Funktion des reproduktiven Systems;
10) andere

Abkürzungsverzeichnis

- Rez	Prostatakarzinom ohne Rezidiv
+ Rez	Prostatakarzinom mit Rezidiv
2D-DIGE	Zwei-dimensionale <i>Difference in Gel electrophoresis</i> , Zwei-dimensionale Differenz in Gel Electrophorese
Acc. Nr	Accession Nummer
ACQ	6-Aminoquinoyl-N-hydroxy-succinimidyl-carbamat
AMACR	Alpha-methylacyl-CoA Racemase
ANXA5	Annexin A5
AR	Androgenrezeptor
ASA	Aminosäurenanalyse
ASPN	Asporin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaar
BPH	Benigne Prostata Hyperplasie
BRCA	<i>breast cancer gene</i> , Brustkrebs Gen
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinder Serumalbumin
Bsp.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CDC27	<i>cell division cycle 27</i>
CDKs	cyclin-abhängigen Kinasen
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CFA	<i>Colony formation Assay</i> , Kolonienbildungsassays
CFH	Complement Factor H
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHCA	<i>Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> , Alpha-Cyano-4-Hydroxyzimtsäure
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CNN1	Calponin-1
CREB	cAMP responsive element binding protein
CREBBP	CREB Binding Protein
CT	<i>Cycle-Threshold</i>
CTSD	Cathespin D

CTSZ	Cathepsin Z
CV	<i>Coeffizient of variation</i> , relative Standardabweichung
d.h.	das heißt
DD3	Prostata spezifisches Antigen-3, PCA-3
ddNTP	Didesoxynukleotide
DEPC	Diethyldicarbonat
DES	Desmin
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase
dNTP's	Desoxynukleotide
DRE	digital-rektalen Untersuchung
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , EGFR
EK	Ethikkommission
ELAC2	ElaC Ribonuclease Z 2
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPCA	<i>Early Prostate Cancer</i> Antigen
EPS	<i>Expressed prostatic secretions</i>
ER	Östrogenrezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERBB2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> , epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
ERG	<i>ETS (erythroblast transformation- specific)- related gene</i>
ERSPC	<i>European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer</i>
ESI	Elektrosprayionisierung
et. al.	<i>et alii</i> , und andere
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FCS	Fötales Kälberserum

FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FFPE	Formalinfixiert und Paraffineingebettet
FT-MS	<i>Quadrupol und Fourier Transform ion cyclotron</i>
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> , Breite des Peaks bei 50% der Gesamthöhe
G	Differenzierungsgrad des Tumors
g	Gravitationsfaktor
G6PD	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GAPDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GIST	gastrointerstinale Stromtumore
GRP78	78 kDa Glucose-regulated Protein
GSN	Gelsolin
GSTP1	Glutathione S-transferase P1
HCl	Hydrogenchlorid
HG PIN	<i>High grade</i> intraepitheliale Neoplasie
HNF4alpha	Hepatozyten Nuclearer Faktor 4 alpha
HNRNPA2B1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
HOXC6	Homeobox Protein Hox-C6
HPC	<i>Hereditary Prostate Cancer</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
HSPA1A	<i>Heat shock protein 70 kDa 1A/1B</i>
HSPA5	<i>Heat shock 70 kDa protein 5</i>
HYOU1	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>
ID	Identifikationsnummer
ID-MS	<i>Isotope diluted mass spectrometry</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IGHG1	<i>Ig gamma-1 chain C region</i>
IH	Immunhistochemie
IIRB	<i>Institutional Review Board</i>
IL-6	Interleukin-6
IPA	<i>Ingenuity Pathway</i> Analysen
IPTR3	Insotiol Triphosphat Receptor 3
kbp	Kilobasenpaar

KCTD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12 (Potassium channel tetramerisation domain containing 12)
kDa	Kilo Dalton
KI	Klon
kV	kilo Volt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Amp	Ampicillin
LC-MS	<i>Liquid-Chromatography</i> (Flüssigchromatographie) Massenspektrometrie
LGALS2	Galectin-2
LGALS3	Galectin-3
LID	<i>Laser induced dissociation</i>
LMNA	Lamin A
log	Logarithmus
LRP-1	<i>Prolow-density Lipoprotein receptor-related protein 1</i>
M	Fernmetastasen
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
Min	Minute(n)
Mio	Millionen
Mm	Millimeter
MME	Membran Metallo-Endopeptidase
MPC Bochum	Medizinsches Proteom-Center Bochum
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MSR1	<i>Macrophage scavenger receptor 1</i>
MTA1	<i>metastasis-associated protein 1</i>
Muc1	Mucin 1
MW	Mittelwert
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-off</i>
N	Nodal-Status
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>

nm	Nanometer
NSCLC	<i>Non-smallcell lung cancer</i> , nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OLFM4	Olfactomedin-4
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAP	Prostata-spezifische saure Phosphatase
PARK7	Parkinson Protein 7
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCA	<i>Principal component analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
PCA-3	Prostata spezifisches Antigen-3, DD3
PCAP	<i>Predisposing For Prostate Cancer</i>
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDGFR β	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor β</i>
PDIA4	Protein disulfid Isomerase A4
PFDN1	Prefoldin Subunit 1
PGK1	Phosphoglycerat Kinase 1
PI3K	Phosphatidol-Inositol-3-Kinase
PI3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PIN	Intraepitheliale Neoplasie
PITX2	<i>Paired-like homeodomain 2</i>
PLOC	<i>US Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial</i>
PMF	Peptid Mass Fingerprint
pRB	Retinoblastom-Protein
PSA	prostata-spezifisches Antigen
PSM	<i>Peptide Spectrum Match</i>
QQQ	Triple Quadrupol
R0	negative (tumorfreie) Resektionsränder
R1	positive Resektionsränder mit mikroskopischem Tumorrest im Patienten
R2	positive Resektionsränder mit makroskopischem Tumorrest im Patienten
Rb	Retinoblastomgen
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RR	<i>Response Ratio</i>
RSD	relative Standardabweichung, CV

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SA	Standardabweichung
SCRN-1	Secernin-1
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Sec	Sekunde(n)
SFM	Serum freies Medium
SFN	Stratifin
shRNA	<i>Small hairpin</i> RNA
SIS-Peptide	stabile isotoopen-gelabelte Standard-Peptide
SOC Medium	SOB (Super Optimal Broth) Medium mit Glucose
Sog.	So genannt
SRCAP	Snf2-Related CREBBP Activator Protein
SRM	Selected Reaction Monitoring
T	Tumorgröße
TA[°C]	Schmelztemperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCP1	T-complex protein 1 subunit alpha, TCP1alpha
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tf	Tumor frei
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> , Transformierender Wachstumsfaktor
TGM4	Transglutaminase 4
THBS1	Thrombospondin-1
TIMP1	Metalloproteinase Inhibitor 1
TK1	Thymidinkinase 1
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
TMPRSS2	Transmembran Protease, serine 2
TMPRSS2-ERG Fusion	Fusion der Gene TMPRSS2 und ERG
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	time-of-flight
TOP2B	DNA topoisomerase 2-beta
TPM1	Tropomyosin 1
TPR Motive	Tetratricopeptide repeat Motiv
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TTC38	Tetratricopeptide Repeat Domain Protein 38
Tu	Tumor
U	<i>Unit</i> , Einheit
u.a.	unter anderem
UBC	Ubiquitin C
UICC	<i>Union Internationale contre le Cancer, International Union against Cancer</i>
U-Test	2-seitiger Mann-Whitney U-Test
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIM	Vimentin
VIN-/-	F9 vinculin-null Zellen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp Zelllinie
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid)

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Klassifikation des Prostatakarzinoms nach dem TNM-System (Gumpp und Henß, 2010). ...	12
Tabelle 3.1: LC-MRM-MS-Proteine und die ausgewählten und verwendeten Markerpeptide.....	62
Tabelle 3.2: Quantifier und Qualifier des 21 Peptide-Mixes zur Etablierung potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom mittels LC-MRM-MS	66
Tabelle 3.3: Konzentrationen und Molekulargewichte der eingesetzten SIS-Peptide	68
Tabelle 3.4: erst-Antikörperbedingungen.....	71
Tabelle 3.5: Inkubationsbedingungen der in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper ...	72
Tabelle 3.6: Reaktionsansatz der reversen Transkription von RNA in cDNA	74
Tabelle 3.7: Verwendete Real-time PCR Primer	75
Tabelle 3.8: Verwendete humane Zelllinien und ihr Ursprungsgewebe	79
Tabelle 3.9: Verwendete humane Zelllinien und Medien	80
Tabelle 3.10: Eingesetzte shRNA Sequenzen zum Knockdown der TTC38 Expression in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3.....	82
Tabelle 3.11: Ratio von serumfreiem Medium (SFM), Fugene HD und Plasmid-DNA für die Transfektion der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3	83
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der zwischen Prostatakomieproben mit und ohne Rezidiv differentiell regulierten Spots der Vorversuche der 2D-DIGE, identifiziert mittels MALDI-TOF-MS.	91
Tabelle 4.2: Identifikation potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom.....	94
Tabelle 4.3: Identifikation potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom.....	95
Tabelle 4.4: „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der mittels 2D-DIGE und MS als dereguliert identifizierten Proteine.	99
Tabelle 4.5: „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der mittels 2D-DIGE und MS als dereguliert identifizierten Proteine.	101
Tabelle 4.6: Secernin-1 Expression im Gewebe von 52 Patienten ohne Rezidiv, 16 Patienten mit Rezidiv, 49 PIN Läsionen und 124 korrespondierenden tumorfreie Gewebe.....	110
Tabelle 4.7: Vinculinexpression in 116 tumorfreien Geweben, 54 PIN-Läsionen, 55 Prostatakarzinomen ohne Rezidiv und 16 Prostatakarzinomen mit Rezidiv.....	113
Tabelle 4.8: TTC38 Expression in 125 tumorfreien Geweben, 53 PIN-Läsionen, 63 Prostatakarzinomen ohne Rezidiv und 18 Prostatakarzinomen mit Rezidiv.....	121
Tabelle 4.9: Zusammenfassender Überblick über alle LC-MRM-MS Ergebnisse	130
Tabelle 4.10: Zeitpunkte des Zuwachsens der TTC38 knockdown und Kontrollklone im Wundheilungsassay.....	138
Tabelle 4.11: Zeitpunkte des Zuwachsens der TTC38 Überexpressionsklone sowie der zugehörigen Kontrollklone im Wundheilungsassay.	140

Tabelle 4.12: Deregulierte Proteine zwischen TTC38 knockdown- und TTC38 Überexpressionsklonen, detektiert und identifiziert mittels LC-MS.....	145
Tabelle 7.1: Klinikopathologische Charkateristika der für die 2D-DIGE verwendeten Prostatakarzinomproben.....	187
Tabelle 7.2: Klinikopathologische Charkateristika des für die Western Blot Analysen von Calponin und Gelsolin verwendeten Patientenkollektivs.....	188
Tabelle 7.3: Klinikopathologische Charkateristika des für die Western Blot Analysen von Annexin A5, TCP1alpha, Secerin-1 und TTC38 verwendeten Patientenkollektivs.....	189
Tabelle 7.4: Klinikopathologische Charkateristika des für immunhistochemische Analysen von SCRIN1 verwendeten Patientenkollektivs aus Dresden.....	190
Tabelle 7.5: Klinikopathologische Charkateristika des für immunhistochemische Analysen von TTC38 verwendeten Patientenkollektivs aus Dresden.....	191
Tabelle 7.6: Klinikopathologische Charkateristika des TMA Patientenkollektives, verwendet für immunhistochemische Analysen von Secernin-1.....	192
Tabelle 7.7: Klinikopathologische Charkateristika des TMA Patientenkollektives, verwendet für immunhistochemische Analysen von Vinculin	193
Tabelle 7.8: Klinikopathologische Charakteristika des TMA Patientenkollektives, verwendet für immunhistochemische Analysen von TTC38	194
Tabelle 7.9: Klinikopathologische Charkateristika der für die Western Blot Analysen von Vinculin im Urin verwendeten Patientenkollektive – Urinkollektiv des Universitätsklinikums Aachen	195
Tabelle 7.10: Klinikopathologische Charkateristika der für die MRM-Versuche verwendeten Patientenkollektive - Patientenkollektiv Urin Aachen.....	196
Tabelle 7.11: Klinikopathologische Charkateristika der für die MRM-Versuche verwendeten Patientenkollektive - Patientenkollektiv Serum Aachen	197
Tabelle 7.12: Klinikopathologische Charkateristika der für die MRM-Versuche verwendeten Patientenkollektive - Patientenkollektiv Serum Bonn.....	198
Tabelle 7.13: 27 neu am Genome BC Proteomics Center etablierte und noch nicht veröffentlichte Peptide des 72 Peptide umfassender SIS-Peptide Mix.....	199
Tabelle 7.14: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (RSD), Ratio von tumorfreiem (Tf) und Tumorgewebe (Tu) sowie p-Werte der einzelnen zwischen Tumoren und tumorfreien Geweben	200
Tabelle 7.15: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (RSD), Ratio von Tumoren mit Rezidiv (+) und Tumoren ohne Rezidiv (- Rez) sowie p-Werte der einzelnen zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv deregulierten Spots.	201
Tabelle 7.16: Identifikation potentieller Biomarker für das Prostatakarzinom.	202
Tabelle 7.17: Identifikation potentieller Biomarker für das rezidivierende Prostatakarzinom.	203

Tabelle 7.18: IPA Tabelle alle Proteinabkürzungen die in der Abbildung 4.6 „IPA Analysen der in tumorfreien Geweben und Prostatakarzinomen deregulierten Proteine“ verwendet wurden.	204
Tabelle 7.19: IPA Tabelle alle Proteinabkürzungen die in der Abbildung 4.7 „IPA Analysen der zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine“ verwendet wurden.	205
Tabelle 7.20: IPA Tabelle alle Proteinabkürzungen die in der Abbildung 4.8 „IPA Netzwerk, welches für Zelltod und Überleben, Krebs und zelluläre Entwicklung verantwortlich ist“ verwendet wurden.	207
Tabelle 7.21: IPA Tabelle alle Proteinabkürzungen die in der Abbildung 4.9 „Einordnung der zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine in IPA Netzwerke“ verwendet wurden.	208
Tabelle 7.22: detaillierte Auflistung aller Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte aller durchgeführten MRM Messungen	210
Tabelle 7.23: Ergebnisse der LC-MS Analysen von TTC38 Knockdown und Überexpressionsklonen zur Identifikation von Proteinen, welche in den TTC3-Knockdown und Überexpressionsklonen dereguliert vorliegen und mit der TTC38 Expression korrelieren.	215
Tabelle 7.24: Ergebnisse der LC-MS Analysen der TTC38 Kockdown und Überexpressionsklone.	217
Tabelle 7.25: Funktion der mit TTC38 assoziierten Proteine, ihre Lokalisation, Funktion und Assoziation mit verschiedenen Krebsarten.	219

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008.	2
Abbildung 1.2: Die <i>Hallmarks of Cancer</i> nach Hanahan und Weinberg	4
Abbildung 1.3: Lage (A) und Zoneneinteilung (B) der Prostata.	6
Abbildung 1.4: Verhältnis der Prävalenz des Prostatakarzinoms bei Autopsie im Vergleich zu klinisch diagnostizierten Prostatakarzinomen und Mortalität des Prostatakarzinoms. Verändert nach Damber und Aus.....	7
Abbildung 1.5: Histologische Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms nach Donald F. Gleason.....	13
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der 2D-DIGE-Technik:	27
Abbildung 1.7: Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers.....	30
Abbildung 1.8: Entstehung von a,b,c- sowie x,y,z-Ionen durch Laser induced dissociation (LID) bzw. über Collision induced dissociation (CID) bei der Tandemmassenspektrometrie.	31
Abbildung 1.9: Schema der Tandem Massenspektrometrie	31
Abbildung 1.10: Schematischer Aufbau eines Ionenfallen-Massenspektrometers (eigene Abbildung)... ..	33
Abbildung 3.1: Verwendete Vektoren für den TTC38 Knockdown und die TTC38 Überexpression in der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3.	82
Abbildung 4.1: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der 2D-DIGE Analyse.....	90
Abbildung 4.2: Vorversuche der 2D-DIGE Analysen von drei Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und drei Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv	90
Abbildung 4.3: Hauptkomponentenanalyse der in der 2D-DIGE verwendeten Prostatektomieproben.....	92
Abbildung 4.4: 2D-DIGE Analyse von 23 Prostatektomieproben von Prostatakarzinompatienten mit Rezidiv und ohne Rezidiv und 14 korrespondierenden tumorfreien Prostatektomieproben.	93
Abbildung 4.5: 2D-DIGE Analyse von elf Prostatektomieproben von Patienten mit Rezidiv und zwölf Prostatektomieproben von Patienten ohne Rezidiv.	93
Abbildung 4.6: IPA Analysen der in tumorfreien Geweben und Prostatakarzinomen deregulierten Proteine.....	96
Abbildung 4.7: IPA Analysen der zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine.....	97
Abbildung 4.8: IPA Netzwerk, welches für Zelltod und Überleben, Krebs und zelluläre Entwicklung verantwortlich ist.	98
Abbildung 4.9: Einordnung der zwischen Tumoren mit und ohne Rezidiv deregulierten Proteine in IPA Netzwerke, welche für Zellmorphologie, zelluläres <i>Assembling</i> und zelluläre Organisation, Funktion und Maintenance	99
Abbildung 4.10: „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der mittels 2D-DIGE und MS als dereguliert identifizierten Proteine.	100

Abbildung 4.11: „Ingenuity Pathway Analysen“ (IPA) der mittels 2D-DIGE und MS als dereguliert identifizierten Proteine. Dargestellt sind molekulare und zelluläre Funktion (A, E), physiologische Systementwicklung und Funktion (B, F) Lokalisation (C, G) und Art der Proteine (D, H) der zwischen tumorfreiem Gewebe und Prostatakarzinomen (A -D) bzw. zwischen Prostatakarzinomen mit und ohne Rezidiv (E - H) deregulierten Proteine.....	101
Abbildung 4.12: Validierung der 2D-DIGE Ergebnisse für TCP1alpha mittels Western Blot	102
Abbildung 4.13: A) Western Blot und zugehörige densitometrische Auswertung von Annexin A5 (ANXA5) normiert auf β -Actin	103
Abbildung 4.14: Validierung der 2D-DIGE Ergebnisse für Gelsolin und Calponin-1 mittels Western Blot.	104
Abbildung 4.15: Immunhistochemische Analysen von KCTD12 und Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR)	105
Abbildung 4.16: Validierung der 2D-DIGE Ergebnisse für Secernin-1 mittels Western Blot	106
Abbildung 4.17: Repräsentative immunhistochemische Secernin-1 Färbungen.....	107
Abbildung 4.18: Zusammenfassung der Immunhistochemie von Secernin-1	108
Abbildung 4.19: Secernin-1 Expression in entzündeter Prostata unterscheidet sich nicht von der Secernin-1 Expression in normalem Prostatagewebe.....	109
Abbildung 4.20: Immunhistochemische Analysen der Secernin-1 Expression in einem unabhängigen Patientenkollektiv.....	110
Abbildung 4.21: Kaplan-Meyer Überlebensanalysen des immunhistochemisch für Secernin-1 gefärbten TMAs.....	111
Abbildung 4.22: Secernin-1 Nachweis im Serum von Prostatakarzinomen mittels Western Blot	112
Abbildung 4.23: Repräsentative immunhistochemische Färbungen der Vinculinexpression im Gewebe von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Rezidiv im Vergleich zu tumorfreien Geweben	113
Abbildung 4.24: Validierung von Vinculin als potentieller Tumormarker für das humane Prostatakarzinom	114
Abbildung 4.25: Kaplan-Meyer Kurven zum Einfluss der Vinculinexpression auf das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinompatienten.....	115
Abbildung 4.26: Analyse der Vinculin Expression im Urin	116
Abbildung 4.27: Validierung der DIGE Ergebnisse für TTC38 mittels Western Blot	117
Abbildung 4.28: Real-time PCR Expressionsanalysen von TTC38	118
Abbildung 4.29: Immunhistochemie von TTC38.....	119
Abbildung 4.30: Zusammenfassung der Immunhistochemie von TTC38	120
Abbildung 4.31: Immunhistochemische Analyse der TTC38 Expression in Prostata(karzinom)gewebe.	121
Abbildung 4.32: Kaplan-Meyer Kurven zum Einfluss der TTC38 Expression auf das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinompatienten.....	122

Abbildung 4.33: Etablierung von Proteinisolation und -verdau aus Urin	123
Abbildung 4.34: Ergebnisse der LC-MRM-MS Messungen für prostataspezifische saure Phosphatase (PAP), Peptid FQEESETLK (A) , Galectin-3 Peptid IALDFQR (B) , Annexin A5 Peptid GTVTDFPGFDER (C) und Tetratricopeptid Protein 38 (TTC38) Peptid IVQLGGSNAQR (D) im Urin.....	125
Abbildung 4.35: Ergebnisse der LC-MRMMS Messungen für Gelsolin Peptid HVVONEVVVQR.....	126
Abbildung 4.36: Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen für 78 kDa <i>Glucose-regulated</i> Protein (GRP78).....	127
Abbildung 4.37: Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen für Alpha-1B-Glycoprotein Peptid GVTFLLR	128
Abbildung 4.38: Ergebnisse der LC-MRM-MS-Messungen für das Vinculin Peptid SLGEISALTSK	129
Abbildung 4.39: Expressionsanalysen von TTC38 in den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und Du145 ..	131
Abbildung 4.40: Real-time PCR Analysen der stabilen TTC38 knockdown Klone.....	132
Abbildung 4.41: Western Blot Analysen ausgewählter stabiler TTC38 knockdown Transfektanden der Zelllinie PC-3	133
Abbildung 4.42: Charakterisierung der stabilen TTC38 Überexpressionsklone	134
Abbildung 4.43: Repräsentative Ergebnisse des XTT-Proliferationsassays zum Vergleich der Proliferation von TTC38 knockdown Klonen und Kontrollklonen	135
Abbildung 4.44: Repräsentative Ergebnisse des XTT-Proliferationsassays zum Vergleich der Proliferation von TTC38 Überexpressionsklonen und PC-3 Kontrollklonen	136
Abbildung 4.45: Repräsentative Ergebnisse des Kolonienbildungsassays (CFA) zum Vergleich des Kolonienbildungsvermögens und der Proliferation von TTC38 knockdown Klonen und Kontrollklonen	137
Abbildung 4.46: Repräsentative Ergebnisse des Kolonienbildungsassays (CFA) zum Vergleich des Kolonienbildungsvermögens und der Proliferation von TTC38 Überexpressionsklonen und Kontrollklonen.....	137
Abbildung 4.47: Repräsentative Aufnahmen des Scratch-Assays zur Analyse des Einflusses von TTC38 auf das Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzelllinie PC-3	139
Abbildung 4.48: Boxplot der Zeitpunkte des Zuwachsens der Wunde von TTC38 knockdown Klonen (A) und TTC38 Überexpressionsklonen (B) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollklonen im Scratch-Assay.....	139
Abbildung 4.49: Repräsentative Aufnahmen des Zuwachsens der Wunden des Scratch Assays zur Analyse des Einflusses von TTC38 auf das Migrationsverhalten der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 .	140
Abbildung 4.50: Repräsentative Aufnahmen des Boyden-Chamber-Invasionsassays	141
Abbildung 4.51: A) Boyden Chamber Invasionsassay der TTC38 Überexpressionsklone sowie der zugehörigen Kontrollklone	142
Abbildung 4.52 Mit IPA Softwareanalysen (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) ermittelte potentielle Interaktionspartner von TTC38.....	143

Abbildung 4.53: Western Blot der potentiellen TTC38-Interaktionspartner TK1, PDFN1 und UBC	144
Abbildung 4.54: Ingenuity Pathway Analysen der zwischen acht knockdown Klonen (vier grünen und vier blauen knockdown Klonen) und vier zugehörigen Kontrollklonen sowie vier Überexpressionsklonen und vier zugehörige Kontrollklonen deregulierten Proteinen	147
Abbildung 7.1: Ergebnisse der Sequenzierung der shRNA-Plasmide.....	213
Abbildung 7.2: Ergebnisse der Sequenzierung des TTC38 Überexpressionsvektors sowie des zugehörigen Kontrollvektors pCMV6-AC.....	214

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Insbesondere danke ich Frau Prof. Dr. Ruth Knüchel-Clarke (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Aachen) ganz herzlich für die motivierende und positive Betreuung dieser Arbeit, die immerwährende Unterstützung, anregende Diskussionen und die Möglichkeit zur Teilnahme an mehreren Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Björn Usadel (Institut für Biologie I, RWTH Aachen) danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an Frau Dr. Corinna Henkel (Medizinisches Proteom-Center, Ruhr-Universität Bochum) für die interessante und aktuelle Themenstellung, die Einführung in die Welt der Proteomik, für ihren Optimismus, der wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat, die stets außerordentlich gute Zusammenarbeit und die hervorragende wissenschaftliche und persönliche Betreuung dieser Arbeit.

Ebenfalls ein ganz großer Dank geht an Frau Dr. Dr. Nadine Gaisa (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Aachen) für die Übernahme der sehr guten medizinischen Betreuung dieser Arbeit, für die geduldigen Erläuterungen der Tumorschnitte und für die vielen engagierten Auswertungen der Immunhistochemien.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Axel Heidenreich (Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Aachen) und Dr. David Pfister (Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Aachen) für das Zusammentragen der Follow-up Daten der analysierten Patientenproben und ihren Rat bei Fragen rund um die Patientenkollektive.

Den Kooperationspartnern Frau PD Dr. Susanne Füssel (Klinik und Poliklinik für Urologie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden), Herrn Prof. Dr. Glen Kristiansen (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) und Herrn PD Dr. Jörg Ellinger (Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Bonn) danke ich für die freundliche Bereitstellung humaner Patienten-proben, klinischer Befunde und Überlebensdaten.

Bei Herrn Prof. Dr. Christoph Borchers (Genome British Columbia Proteomics Centre, University of Victoria) bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit, die MRM Analysen in seinem Labor durchführen zu können. Ein ganz herzliches Dankeschön auch an Frau Angela Jackson (Genome British Columbia Proteomics Centre, University of Victoria) für die geduldige Einführung in die MRM und die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Herrn Prof. Dr. Helmut Meyer (Medizinisches Proteom-Center, Ruhr-Universität Bochum) danke ich für die Bereitstellung finanzieller Mittel zur Durchführung der MS Experimente sowie die Möglichkeit, die letzten Monate bei ihm am Institut arbeiten zu können. Mein herzlicher Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe „Quantitative Proteomics“ am Medizinischen Proteom-Center in Bochum für die Unterstützung bei und die Durchführung von MS-Analysen. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Hanna Diehl, Birte Beine und Kathrin Lüdemann-Franke. Danken möchte ich außerdem Julian Uszkoreit für die bioinformatischen Auswertungen, Maïke Ahrens für die Unterstützung bei der Statistik, und dem Team der ASA für die Proteinbestimmungen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Sonja Gostek (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Aachen) für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor und die wertvolle Unterstützung bei zahlreichen Experimenten – sei es in der Zellkultur, bei der Massenspektrometrie, der Proteinisolation, der 2D-Gelelektrophorese und bei vielen anderen Gelegenheiten. Vielen Dank dafür, dass du immer mit Rat und Tat zur Seite standest, für die gute Atmosphäre im Labor und die immer offenen Ohren für alles.

Mein großer Dank gilt auch Michael Moll, Benedikt George und Jennifer Sacher für ihre engagierten und erfolgreichen Einsätze bei den TTC38- bzw. den Secernin-1 Projekten.

Herrn Dr. Jürgen Veeck bin ich sehr dankbar für die geduldige Erklärung der SPSS-Auswertung, für Rat und Tat zur jeder Zeit und dass ich von seinem Wissen stets profitieren durfte. Bei Herrn Dr. Michael Rose bedanke ich mich für die Beantwortung der vielen Fragen rund um die Zellkulturexperimente. Herrn Dr. Till Braunschweig danke ich für die Unterstützung bei allen Fragen rund um das Prostatakarzinom.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie (Universitätsklinikum Aachen) für die Unterstützung meiner Arbeit durch Materialien, Fachwissen und Ratschläge. Insbesondere gilt mein Dank hier Sonja von Serényi, Daniela Smeets, Jennifer Wipperfürth, Roswitha Davtalab, Inge Losen und Norina Labude für ihre fachliche Unterstützung und die fortwährende Hilfsbereitschaft.

Dr. Christiane Kupper und Dr. Christina Klaus danke ich sehr für das Korrekturlesen dieser Arbeit, die aufmunternden Worte und die vielen Diskussionen rund um diese Arbeit.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie für die ständige und unermüdliche Unterstützung. Insbesondere Michael danke ich für Rat und Tat bei allen Problemen rund um den PC, bei der Erstellung der zahlreichen Graphiken dieser Arbeit, für die unendliche Geduld sowie die unglaubliche und liebevolle Unterstützung während diese Arbeit entstand und zu jeder Zeit. Danke, dass ihr immer für mich da seid! Danke für alles!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Aachen, den 02.05.2014

Cordelia Geisler

Lebenslauf

Name	Cordelia Geisler
Adresse	Christoph-von-Gluck Platz 20b 80807 München Deutschland
Telefon	+49 (0)176 - 21 22 77 98
Email	cordelia.geisler@rwth-aachen.de
Geburtstag/-ort	16.06.1984, Wesel
Nationalität	deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit 07.2010	Promotion am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, Proteomic Research Group
11.2013 - 02.2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Medizinischen Proteom-Center, Ruhr-Universität Bochum, Arbeitsgruppe Quantitative Proteomics
07.2010 - 10.2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, Proteomic Research Group
04.2013 - 06.2013	Forschungsaufenthalt am Genome British Columbia Proteomics Center der University of Victoria, Victoria BC, Kanada, gefördert durch ein Stipendium der Heinrich-Hetz-Stiftung
06.2010	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie

Studium

10.2007 - 11.2009	Studium der Biotechnologie/Molekularen Biotechnologie (Master) an der RWTH Aachen; Vertiefungsmodule <i>Immunologie und Medizin, pharmazeutische Biotechnologie, Mikrobiologie und Genetik</i> Abschluss als "Master of Science in Biotechnology"
03.2009 - 11.2009	Masterarbeit am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung der putativen Tumorsuppressorgene <i>DDK3</i> und <i>ITIH5</i> bei der Chemosensitivität humaner Mammarkarzinome“
11.2004 - 08.2007	Studium der Biotechnologie/Molekularen Biotechnologie (Bachelor) an der RWTH Aachen Abschluss als "Bachelor of Science in Biotechnology"

Studium - Fortsetzung

04.2007 - 08.2007 Bachelorarbeit am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie
Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung der Promotormethylierung des potentiellen Tumorsuppressorgens *SFRP5* beim humanen Brustkrebs“

Studienbegleitende Tätigkeiten

10.2008 - 01.2009 Forschungspraktikum „Molekulare Pharmakologie“ am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften (IPW – Pharmakologie und Toxikologie) der Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich, gefördert durch ein ERASMUS-Stipendium

Ausbildung

09.2003 - 02.2005 Lehrgang zur Biomedizinischen Assistentin am Institut für Biologie und Medizin des Rheinischen Bildungszentrum e.V. in Köln
Abschluss als Biomedizinische Assistentin mit der Zusatzqualifikation „*Molekularbiologie und Molekulare Medizin*“

Schulische Laufbahn

08.1994 - 06.2003 Konrad-Duden-Gymnasium, Wesel, Abitur
08.1990 - 07.1994 Gemeinschaftsgrundschule Hamminkeln

München, 01.12.2014

Publikationsliste

Veröffentlichungen

1. **Geisler C**, Gaisa N, Pfister D, Fuessel S, Kristiansen G, Braunschweig T, Gostek S, Beine B, Diel H C, Jackson A, Borchers C, Heidenreich A, Meyer H, Knüchel R, Henkel C. Identification and validation of potential new biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis using 2D-DIGE and MS; eingereicht bei "BioMed Research International" für die Sonderausgabe "Biomarker and Translational Prostate Cancer Research".
2. Labbus K, Henning M, Borkham-Kamphorst E, **Geisler C**, Berger T, Mak TW, Knüchel R, Meyer HE, Weiskirchen R, Henkel C. Proteomic profiling in Lipocalin 2 deficient mice under normal and inflammatory conditions. *Journal of Proteomics; J Proteomics*, 2013; 78:188-96.
real
3. Kristiansen G, Rose M, **Geisler C**, Fritzsche FR, Gerhardt J, Lüke C, Ladhoff AM, Knüchel R, Dietel M, Moch H, Varga Z, Theurillat JP, Gorr TA, Dahl E. Endogenous myoglobin in human breast cancer is a hallmark of luminal cancer phenotype. *British Journal of Cancer*. 2010; 102:1736-45.
4. Veeck J*, **Geisler C***, Noetzel E, Alkaya S, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. Epigenetic inactivation of the Secreted frizzled-related protein-5 (*SFRP5*) gene in human breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Carcinogenesis* 2008; 29:991-998.
* geteilte Erstautorenschaft

Tagungsbeiträge (Vorträge)

1. **Geisler C**, Gaisa N, Fuessel S, Pfister D, Braunschweig T, Gostek S, Heidenreich A, Knüchel R, Henkel C. Differentielle Proteomanalyse zur Identifikation von Biomarkern zur Stratifizierung des Rezidivrisikos von Prostatakarzinom Patienten. 19. Arbeitstagung Mikromethoden in der Proteinchemie, 25.-27. Juni 2012, Bochum. Gewinn des „Bruker Daltonik“ Nachwuchspreis „Proteinanalytik“.
2. **Geisler C**, Gaisa N, Fuessel S, Pfister D, Braunschweig T, Gostek S, Heidenreich A, Knüchel R, Henkel C. Identifikation neuer Biomarker zur Stratifizierung des Rezidivrisikos von Prostatakarzinom Patienten. 3. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 17.-19. November 2011, Jena.
3. Henkel C, Özdemir R, Gostek S, **Geisler C**, Gaisa N, Lindemann-Docter K, Pfister D, Heidenreich A, Knüchel R. MALDI imaging als neues diagnostisches Tool? Differenzierung papillärer Harnblasentumore. 3. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 17.-19. November 2011, Jena.
4. **Geisler C**, Winkens W, Veeck J, Fasching PA, Hartmann A, Neuß T, Henkel C, Knüchel R, Dahl E. Dickkopf-3 (DKK3), putatives Tumorsuppressorgen und Chemosensitizer im Mammakarzinom? 95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., 16.-19. Juni 2011, Leipzig.

5. Henkel C, Oezdemir RF, **Geisler C**, Gaisa NT, Lindemann-Docter K, Pfister D, Heidenreich A, Knüchel-Clarke R. Papillary High Grade and Low Grade Tumours: is there an objective way to classify? 57. Kongress der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie, 14.-16. April 2011, Aachen.
6. **Geisler C**, Veeck J, Noetzel E, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. Epigenetic inactivation of SFRP5 is associated with poor clinical patient outcome in human breast cancer. 3. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, 10.-12. September 2009, Bergisch-Gladbach.
7. Veeck J, **Geisler C**, Noetzel E, Knüchel R, Dahl E. Die epigenetische Inaktivierung von SFRP5 ist mit einer ungünstigen klinischen Prognose im humanen Mammakarzinom assoziiert. 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., 04.-07. Juni 2009, Freiburg.

Tagungsbeiträge (Poster)

1. **Geisler C**, Fuessel S, Pfister D, Braunschweig T, Gostek S, Heidenreich A, Knuechel R, Henkel C. Identification of New Biomarkers for Discriminating Prostate Cancer Patients with High Risk of Relapse. 10th Welt Kongress der HUPO (Human Proteom Organisation) 2011. 4.-7. September 2011, Genf, Schweiz.
2. Henkel C, Lenz T, Hilgers M, Gostek S, **Geisler C**, Knuechel R. New Method for the Detection of Interesting Biomarkers in Bladder Cancer. 10th Welt Kongress der HUPO (Human Proteom Organisation) 2011. 4.-7. September 2011, Genf, Schweiz.
3. **Geisler C**, Pfister D, Fuessel S, Braunschweig T, Kuhlmann D, Gostek S, Heidenreich A, Knüchel-Clarke R, Henkel C. Identification of new Biomarkers for discriminating prostate cancer patients with and without metastasis. 57. Kongress der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Urologie. 14.-16. April 2011, Aachen.
4. **Geisler C**, Veeck J, Noetzel E, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. Promotor hypermethylation of *SFRP5* may be a novel prognostic biomarker in human breast cancer potentially useful in patient risk stratification. EPIPHAMY- 3rd bi-annual symposium on DNA methylation and cancer, 09. Oktober 2009, Aachen.
5. Veeck J, Wiesmann F, **Geisler C**, Bektas N, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. Epigenetic silencing of WNT antagonist genes as prognostic biomarker for human breast cancer. 3rd Mildred Scheel Cancer Conference, 18.-20. Juni 2008, Königswinter.
6. Veeck J, **Geisler C**, Wiesmann F, Bektas N, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E. Epigenetic silencing of WNT antagonist genes as prognostic biomarker for human breast cancer. 99th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), 12.-16. April 2008, San Diego, USA.