

2. Symposium „Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie“

Mainz, 11.–13. November 2010



Redaktion:

Dr. rer. nat. C. Becker, Forschungscoordination,
 Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., Düsseldorf

Mehr als 40 Originalarbeiten junger Nachwuchswissenschaftler/innen repräsentierten auf dem 2. Symposium „Urologische Forschung der DGU“ den urologischen Wissenschaftsstandort des deutschen Sprachraums. Die Abstracts dieser Beiträge zum Symposiumsthema „Signaltransduktionswege bei urologischen Erkrankungen: Pathogenese – Prädiktion – Therapie“ sind in der vorliegenden Ausgabe des Urologen publiziert. Mit Übersichtsvorträgen zur Bedeutung der Signaltransduktion in der Medizin, zur molekularen Uropathologie sowie zu zielgerichteten Therapiestrategien wurden die einzelnen Sitzungen des Symposiums von international renommierten Experten, wie T. Acker, K. Friedrich, A. Hartmann oder M. Wiesener, begleitet. Ein gesondertes Forum mit professionellen Referaten widmete sich zudem wichtigen Aspekten zur erfolgreichen Abfassung von Anträgen und Publikationen.

Die zwei besten Präsentationen des Symposiums wurden mit dem AuF-Preis in Höhe von je 1.000 EUR prämiert.

Preisträger 2010 sind:

- Dr. rer. nat. N. Sampson, Institute of Biomedical Aging Research, Austrian Academy of Science, Innsbruck (Beitrag V 2.7)
- Dr. med. F. Zengerling, Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum Ulm (Beitrag V 2.5)

Korrespondenzadresse:

Dr. C. Becker, Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V.,
 Forschungscoordination, Uerdinger Str. 64, 40474 Düsseldorf,
 becker@dgu.de

Vortragssitzung I: Molekulare Grundlagen prognostischer/ diagnostischer Marker

Moderation: W. Brenner, Mainz/A.J. Schrader, Ulm

V 1.1

miRNA 15a kann benigne vs. maligne Nierentumoren im Urin und im Gewebe unterscheiden

von Brandenstein M¹, Herden J², Braun G², Dienes HP¹, Engelmann U², Fries JWU¹

¹ Pathologisches Institut, Köln

² Klinik und Poliklinik für Urologie, Köln

Die NF-κB Signalkaskade ist ein potenzielles therapeutisches Ziel in malignen Tumoren. Im Vorfeld konnte die Arbeitsgruppe bereits in Zellkulturversuchen zeigen, dass es zur Komplexbildung zwischen NF-κB p65 und MAPK p38 (Transkriptionskomplex, TK) kommt und dieser nach nukleärer Transmigration wesentlich an der Zielgenexpression beteiligt ist. Zur klinischen Diagnostik wäre es wünschenswert, mittels eines nichtinvasiven Markers die Aktivierung dieser Signalkaskade nachzuweisen.

In unserer Studie haben wir in Zellkultur und in frischen sowie in paraffinieren humanen Nierentumorproben die Beziehung zwischen dem TK, PKC α und der miRNA 15a mittels qRT-PCR, Immunpräzipitation, SDS PAGE Gel, „electromobility shift assay“ und Transfektionen mit Expressionplasmiden untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie an einer malignen Tumorzelllinie (Caki-1) zeigen, dass PKC α sich mit dem TK vereint und in den Kern transmigriert. Dort unterdrückt PKC α die nukleäre Freisetzung von pri-miRNA 15a. Durch Endothelin-1 induziert, führen fallende PKC-α-Spiegel zu einer vermehrten Bildung von miRNA 15a im Zytoplasma. Diese Komplexbildung konnte auch in humanen Nierentumoren nachgewiesen werden. Diese zeigen ferner unterschiedliche Spiegel für die verschiedenen PKC-Isoformen in malignen vs. benignen Tumoren. PKC α, das ebenfalls eine Komponente des TK in humanen Tumorproben ist, wird in Onkozytomen hoch-, in malignen, klarzelligen Nierenzellkarzinomen (NZK) herunterreguliert. Im Gegenzug wird miRNA 15a im klarzelligen NZK hoch- und in denen des Onkozytoms herunterreguliert. Ähnlich verhält es sich im chromophoben NZK. Eine Erhöhung des miRNA-15a-Spiegels konnte im Urin von Patienten mit malignem, klarzelligem NZK nachgewiesen werden, während er in anderen NZK-Formen, bei anderen extrarenalen oder urogenitalen Tumoren oder bei Entzündungen des Urogenitaltraktes nur sehr gering ist.

Damit stellt der Urinnachweis von miRNA 15a einen möglichen wichtigen, nichtinvasiven Marker zur präoperativen Erkennung maligner, klarzelliger NZKs dar.

V 1.2

Spezifische miRNAs als Regulatoren der Metastasierung im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Heinzelmann J¹, Henning B¹, Posorski N², Sanjmyatav J¹, Wunderlich H¹, Mieczyslaw R³, Gajda M³, Junker K¹

¹ Klinik für Urologie, Universitätsklinikum, Jena

² Institut für Humangenetik und Anthropologie, Core Unit Chip Application, Universitätsklinikum, Jena

³ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum, Jena

Einführung. Es ist bekannt, dass microRNAs (miRNAs) als Regulatoren der Genexpression einen großen Einfluss auf die verschiedensten Signalwege in der Zelle haben und die Deregulation spezifischer miRNAs an wesentlichen Prozessen der Metastasierung beteiligt ist. Die Rolle der miRNAs während der Progression und Metastasierung der Nierenzellkarzinome (NZK) ist jedoch weitestgehend unbekannt. Daher ist das Ziel dieser Studie, ein spezifisches miRNA-Expressionsmuster der metastasierenden klarzelligen NZK (kzNZK) zu identifizieren und den Einfluss spezifischer miRNAs auf Prozesse der Metastasierung zu untersuchen.

Material und Methoden. Angereicherte miRNAs wurden aus 18 kryokonservierten kzNZK-Proben (10 nichtmetastasierte, 4 spätmetastasierte Tumore und 4 Tumore mit Primärmetastasen) isoliert. Die miRNA-Expression wurde mit Hilfe von Microarrays analysiert und die Ergebnisse mit der qRT-PCR validiert. Der Knockdown von let-7a in der Zelllinie HEK-293 wurde mit miRNA-Inhibitoren durchgeführt. Die Proliferation wurde mit Hilfe von xCelligence und dem WST-1-Assay gemessen. Die Migration wurde mit Hilfe von xCelligence und CC-Inserts analysiert. Die Untersuchung der Invasion erfolgte unter Verwendung von mit Matrigel beschichteten CC-Inserts.

Ergebnisse. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression von 33 miRNAs zwischen metastasierenden und nichtmetastasierenden kzNZK. Weiterhin konnte ein miRNA-Muster (inklusive let-7a-c) identifizieren werden, welches aggressive primär metastasierende Tumore charakterisiert. Die Microarray-Daten konnten mit qRT-PCR validiert werden. Statische Analysen zeigten eine Korrelation der Expression spezifischer miRNAs zur Metastasenbildung und zum Überleben. Der Knockdown von let-7a in HEK-293 führte zu einer Erhöhung der Migration und Invasion und zu einer leichten Verringerung der Proliferation.

Fazit. Diese Studie belegt, dass spezifische miRNAs im Zusammenhang mit der Metastasierung des kzNZK dereguliert sind. Zusätzlich charakterisiert ein spezifisches miRNA Muster die sehr aggressiven, früh metastasierenden Tumore. Dabei zeigten einige dieser miRNAs eine Korrelation zum Metastasierungspotenzial des Tumors und zum Überleben der Patienten. Erste Untersuchungen ergaben, dass die veränderte Expression spezifischer miRNAs einen Einfluss auf Prozesse der Metastasierung hat. Daher könnte die Analyse der miRNA Expression im Primärtumor wichtige Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen der Metastasierung der NZK unter Beteiligung spezifischer miRNAs liefern.

V 1.3

Kalzium als Induktor für Knochenmetastasen

Schneider E¹, Prawitt D¹, Roos FC¹, Junker K², Thüroff JW¹, Brenner W¹

¹ Urologie, Kinderklinik, Universitätsmedizin, Mainz

² Urologie, Universitätsklinik, Jena

Obwohl eine Vielzahl von molekularen Mechanismen der Metastasierung bereits bekannt ist, sind die Hindergründe der Organspezifität der Metastasierung weitgehend ungeklärt. Nierenzellkarzinome (NZK) metastasieren häufig in den Knochen, ein Gewebe mit hohem Kalzium-Spiegel. Wir haben den Einfluss des kalziumsensitiven Rezeptors (CaSR) im NZK und die Rolle von Kalzium in Prozessen der Metastasierung untersucht.

In 18 randomisierten klarzelligen NZK-Proben von tumornephrektomierten Patienten – 6 innerhalb von 5 Jahren nach OP nichtmetastasiert, 6 in die Lunge metastasiert und 6 in Knochen metastasiert – wurde der CaSR mittels Western-Blot-Analysen quantifiziert. Um in vitro den Einfluss von Kalzium auf NZK-Zellen zu analysieren, wurden primäre Zellen aus Tumorgewebe von Patienten der gleichen drei Gruppen (je 2 Zelllinien) verwendet: nicht-

metastasiert, in die Lunge metastasiert und in Knochen metastasiert. Die Zellproliferation nach Kalziumbehandlung (2,5, 5 und 10 µM) wurde über die BrdU-Inkorporation und die Zellmigration in einer Boyden Chemotaxis Kammer mit Kalzium als Chemotaxin (10 µM) bestimmt. Die Expressionen von phospho-ERK1/2, PTEN und seiner Ubiquitin-Ligase NEDD4.1 wurden im Western Blot analysiert.

In Tumorproben von Patienten mit Knochenmetastasen war die CaSR-Expression, verglichen mit nichtmetastasierten NZK, um 80% erhöht. Die Behandlung von NZK-Zellen mit Kalzium bewirkte eine deutlich erhöhte Proliferationsrate, die in Zellen aus knochenmetastasierten NZKs, doppelt so hoch lag, wie die von Zellen aus nicht- oder lungenmetastasierten NZKs. Zudem zeigten Zellen aus Knochen-metastasierten NZKs eine 3,5-fach höhere Migrationsrate, verglichen mit Zellen von nichtmetastasierten NZKs. Zellen aus lungenmetastasierten NZKs zeigten eine 1,8-fach erhöhte Migration. Wir konnten zeigen, dass dieser Mechanismus nicht durch eine ERK1/2-Aktivierung bedingt ist, die Analysen des alternativen Signalwegs über Akt stehen noch aus. Die Behandlung der NZK-Zellen mit Kalzium induzierte unabhängig vom Metastasierungsverhalten eine reduzierte PTEN-Expression, ein Mechanismus, der unabhängig vom Abbau durch NEDD4.1 zu sein scheint. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Metastasierung von NZK in Knochengewebe durch den CaSR bedingt wird und dass Kalzium die Zellproliferation und Migration in knochenmetastasierenden NZK-Zellen erhöht.

V 1.4

Dynamik der Genexpression von Stammzellmarkern während des invasiven Wachstums beim Prostatakarzinom

Hach CE, Jung V, Kamradt J, Stöckle M, Unteregger G

Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Einleitung. Den „cancer-initiating cells“ – teilweise charakterisiert durch Stammzelleigenschaften – wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese auch des Prostatakarzinoms (PCa) zugeschrieben. Die geringe Konzentration dieses Zelltyps sowohl im Tumorgewebe als auch in permanenten Zelllinien erschwert die Aufklärung ihrer Rolle bei Tumorinitiation und -progression. Zusätzlich scheint sich die Genexpression in Abhängigkeit von der Zellfunktion zu ändern. Das invasive Wachstum ist eine der wesentlichen Änderungen vom organbegrenzten zum metastasierenden Tumor. Um die Expression von Stammzellmarkern in Abhängigkeit des invasiven Wachstums zu quantifizieren, haben wir Stammzellmarker mittels q-RT-PCR an invasiv wachsenden P-Ca-Zellen untersucht.

Methoden. Die Zelllinien DU145, PC-3 und LNCaP wurden auf Matrigel™-beschichteten Invasionsmembranen kultiviert. Nach 48, 72 bzw. 96 h wurde die Invasionsrate als das Verhältnis Zellzahl Unterseite:Oberseite Membran ermittelt. Parallel wurde RNA isoliert und die Expression der SZ-Marker BMI, CD44, NANOG, OCT-4, SMO und SOX-2 mit TBP als Housekeeping-Gen mittels q-RT-PCR bestimmt.

Ergebnisse. Für DU145 lag die Invasionsrate bei 9,8% bzw. 24,5% (48 h/72 h). Diese Werte betragen 3,5% und 4,4% (48 h/72 h) bei PC-3. Die geringste Invasion zeigte LNCaP mit 0%, 0,3% bzw. 0,7% (48 h/72 h/96 h). Die Expression der SZ-Marker zeigte bei DU145 und PC-3 eine zeitliche Abhängigkeit: Bei DU145 fand sich bei der invasiven Zellpopulation nach 48 h eine Zunahme der Expression von BMI bei gleichzeitigem Rückgang der Werte von SOX-2. Nach 72 h nahm die Expression von CD44 und OCT-4 in dieser Zellpopulation ebenfalls signifikant zu. PC-3 zeigte ein völlig anderes Bild: Der reduzierten BMI-Expression stand eine signifikante Erhöhung von NANOG, OCT-4 und SMO in der invasiven Zellpopulation gegenüber. Ein mit DU145 vergleichbares Ergebnis zeigte die CD44-Expression nach 72 h. Bei der schwach invasiv wachsenden Zelllinie LNCaP fand sich zwar eine Expression der SZ-Marker OCT-4, BMI, SMO, NANOG und SOX-2, aufgrund der sehr geringen Invasionsrate konnte die Expressionsänderung während der Invasion jedoch nicht ermittelt werden.

Fazit. PCa-Zelllinien zeigen abhängig vom Zelltyp signifikante Unterschiede im Wachstums- und Invasionsverhalten. Die Ergebnisse der Expression ausgewählter SZ-Marker folgen nicht diesem Schema: Während des invasiven Wachstums findet sich eine Verschiebung der Expression. Dabei erfährt die

Genexpression nach unserer Beobachtung eine zusätzliche zeitlich abhängige Veränderung. Eine Erklärung hierfür wäre, dass PCa-Zellen während des invasiven Wachstums – möglicherweise auch nur vorübergehend – eine Änderung in der Expression von SZ-Markern erfahren. Dieser Umstand könnte auch die Detektion und Zuordnung zu ihrer biologischen Funktion auch im histologischen Präparat erschweren.

V 1.5

The implication of Tiam1/Rac3 signalling in prostate carcinogenesis

Hoffmann MJ¹, Maaßen A¹, Ziegler S¹, Collard JG², Ekici AB³, Gabbert HE⁴, Engers R⁴

¹ Institut für Pathologie, Uniklinik, Düsseldorf

² MPI, Dortmund

³ The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande

⁴ IZKF Erlangen

Objective. The small GTP-binding Rac proteins belong to the Rho-like GTPase family which constitutes a subgroup of the Ras superfamily of GTP hydrolases with diverse cellular functions. The Rho-like GTPase family includes different isoforms of Rac. While Rac1 is ubiquitously expressed and Rac2 hematopoiesis-specific, Rac3 is less characterized and only little is known about its functional role. Recently, we found that Rac3 and its activator Tiam1 are significantly overexpressed in most prostate carcinomas and high-grade PIN (HG-PIN) lesions and that both Tiam1 and Rac3 overexpression predict an aggressive clinical course. Here, we investigated the functional role of Tiam1 and Rac3 in prostate cancer development.

Methods. Benign prostatic epithelial (BPH1) cells were stably transfected with either wildtype or constitutive active forms of Tiam1 and Rac3 and compared to the empty vector. To mimic the in vivo situation of Tiam1 and Rac3 overexpression, BPH1 cells were also stably co-transfected with wildtype Fl-Tiam1 and wt-Rac3. Adhesion assay, migration assays, transformation assays, western blot analysis and zymography were done as described earlier.

Results. Ectopic expression of Tiam1 and Rac3 induced distinct phenotypical changes in BPH1 cells. Most prominent was the dissociated growth pattern of the V12-Rac3 (constitutively active) and of the Fl-Tiam1 and wt-Rac3 co-transfected cells that also showed decreased cell-cell and cell-substrate adhesion. Although these stably transfected cell lines were generated from benign cells they gained a significant capability of migration and invasion. V12-Rac3 and also co-transfection of Fl-Tiam1 and wt-Rac3 had no significant effects on cell proliferation, but enabled cells to grow in more than one layer and form colonies in a colony formation assay. A soft agar assay revealed colony-forming capacity under anchorage-independent conditions. Empty vector transfected cells failed to form 3 dimensional colonies. On the molecular level, we found important components of downstream signalling pathways as such as Akt and Erk activated, but no effects on activities of p38 and p70-S6 kinase. A microarray expression analysis using the Affymetrix U133 Plus 2.0 platform was performed to gain further insights on downstream targets mediating the effects of Tiam1 and Rac3 overexpression.

Conclusion. Constitutive activation of Rac3 in vitro affects several cell biological functions and induces a more aggressive phenotype in benign prostatic epithelial cells. Given the fact that Rac3 and its activator Tiam1 are overexpressed in most HG-PIN lesions and prostate carcinomas, our results suggest a significant role of Rac3 signalling in the development of prostate cancer.

V 1.6

Definition eines Methylierungsmusters zur Prognosebewertung von metastasierten Harnblasentumoren

Stubendorff B¹, Dudziac E², Bourghol G², Catto J², Wunderlich H¹, Gajda M³, Junker K¹

¹ Klinik für Urologie, Jena

² Institute for Cancer Studies, Sheffield, UK

³ Institut für Pathologie, Jena

Einleitung. Die Prognose für Patienten mit metastasierten Harnblasentumoren ist unbefriedigend, da die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 6% liegt. Eine

frühzeitige Erkennung des Metastasierungsrisikos und der damit verbundene Einsatz einer effizienten und zielgerichteten Therapie würden zur Verbesserung der Prognose beitragen. Derzeit existieren jedoch keine Parameter, die eine individuelle Prognosebewertung von Patienten mit muskelinvasiven Tumoren erlauben. Deshalb ist die Identifizierung zuverlässiger Biomarker zur frühzeitigen Erkennung der Tumorausbreitung dringend erforderlich. Da epigenetische Veränderungen als hoch sensitive und frühzeitig auftretende Ereignisse bei der Regulation zentraler Signalwege gelten, besteht das Ziel in der Identifizierung eines DNA-Methylierungsmusters, das mit der Metastasierung von Harnblasentumoren korreliert.

Material und Methoden. Aus 14 Gewebeproben von invasiven Harnblasentumoren (pT2-4; 8 metastasiert und 6 nichtmetastasiert) wurde genomische DNA isoliert und anschließend mittels Ultraschallbehandlung auf eine Länge von 200–600 bp fragmentiert. Die fragmentierte DNA wurde mit einem 5-Methylcytosin-Antikörper inkubiert, um die methylierte DNA anzureichern. 1,6 µg der fragmentierten DNA wurde als Input einbehalten. Input und IP wurden mit Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkiert und anschließend kompetitiv auf CpG Island Microarrays hybridisiert. Die Daten wurden mit Hilfe der Genomic Workbench 5.0 (Agilent) visualisiert und mittels Microsoft Excel analysiert.

Ergebnisse. Die Analyse der Microarray-Daten ermöglicht die Ermittlung differenzierter Methylierungsmuster. Erste Analysen zeigen eine Promotor-hypermethylierung bekannter Tumorsuppressorgenen (RASSF1) sowie Gene, deren Expression zur verstärkten Zell-Zell-Adhäsion beiträgt (EPHB3, ZYX). Es zeigen sich hoch signifikante Unterschiede (p<0,01) zwischen der metastasierten und nichtmetastasierten Patientengruppe.

Fazit. Unsere Ergebnisse belegen die Annahme, dass muskelinvasive Primärtumore ein spezifisches Methylierungsmuster in Abhängigkeit vom Metastasierungspotenzial aufweisen. Die Stilllegung von Tumorsuppressoren sowie Zelladhäsionsmolekülen durch DNA-Methylierung führt zu Veränderungen in der Regulation wichtiger Signaltransduktionswege und tragen zur Tumorprogression bei. Die Identifizierung betroffener Signalwege wird zur Verbesserung der individuellen Prognosebewertung und der Entwicklung zielgerichteter Therapien beitragen und potenziell die Überlebensraten von Patienten mit metastasierten Harnblasentumoren verbessern.

In anschließenden Untersuchungen wird die Identifizierung weiterer Kandidatengene erfolgen, deren Methylierungsstatus unter Verwendung methylierungsspezifischer Methoden sowie funktioneller Analysen bestätigt werden soll.

Postersitzung

Moderation: F. Wagenlehner, Gießen/W. Schulz, Düsseldorf

P 1.1

Proteolytische Dysbalance in urologischen Tumoren – eine Basis für veränderte Signaltransduktionen?

Rabien A¹, Wittschieber D^{2,3}, Stenzinger A^{2,4}, Jung M¹, Stephan C^{1,5}, Weichert W^{2,4}, Jung K^{1,5}, Kristiansen G⁶, Erbersdobler A^{2,7}

¹ Klinik für Urologie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin

² Institut für Pathologie, CCM, Charité – Universitätsmedizin, Berlin

³ Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum, Münster

⁴ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum, Heidelberg

⁵ Berliner Forschungsinstitut für Urologie, Berlin

⁶ Institut für klinische Pathologie, Universitätsspital, Zürich, CH

⁷ Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät der Universität Rostock

Ein proteolytisches Ungleichgewicht zwischen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihren endogenen Inhibitoren kann zum Ausbrechen von Tumorzellen aus ihrem Zellverband und damit zur Metastasierung führen.

In unseren Untersuchungen am Nierenzell-, Harnblasen- und Prostatakarzinom bestimmen wir das proteolytische (Un-)Gleichgewicht in den Tumoren unter besonderer Berücksichtigung des MMP-Inhibitors RECK („reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs“) als Metastasierungs-hemmer, um dann karzinomspezifische Signalwege dazu näher zu analysieren.

Im Nierenzellkarzinom zeigte sich die RECK-Expression stark vermindert im Vergleich zum umliegenden nichtmalignen Gewebe, sowohl auf RNA-Ebene (quantitative RT-PCR), als auch auf Proteinebene (Tissue Microarray und Western Blot). Bei der Betrachtung der Balance zwischen MMP-2, -9 oder -14 (positiv gewertet) und RECK (negativ gewertet) zeigten sich positive Assoziationen mit dem Tumorstadium und Tumorgrad für MMP-9/RECK (dichotomisierte Daten, exakter Test nach Fisher; $p < 0,001$) und MMP14/RECK (pT: $p = 0,001$; Grad: $p < 0,001$), d. h. je höher die MMP-Expression bzw. je niedriger die RECK-Expression, desto höher war die Malignität des Tumors. Entsprechend war die Überlebenswahrscheinlichkeit in der Kaplan-Meier-Analyse geringer (MMP-9/RECK: $p = 0,038$; MMP-14/RECK: $p = 0,001$). Auch im Harnblasenkarzinom zeigte sich die RECK-Expression vermindert im Vergleich zum umliegenden nichtmalignen Gewebe (Western Blot). Immunhistochemische Untersuchungen an 127 Großflächenschnitten von Urothelkarzinomen offenbarten eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen RECK und dem gegensätzlich wirkenden EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer): Mit steigendem Tumorstadium und von „low-grade“- zu „high-grade“- Tumoren stieg die EMMPRIN-Expression ($p < 0,001$) bzw. nahm die RECK-Expression ab (pT: $p < 0,001$; Grad: $p = 0,006$), während MMP-2, MMP-9 und MMP-14 nicht signifikant verändert waren. Die Eignung des RECK als Biomarker für das Prostatakarzinom konnten wir bereits nachweisen. Da sich bei funktionellen Untersuchungen an Prostatakarzinomzellen mit stabiler RECK-Überexpression (DU-145/pCMV6-Neo RECK) eine Reduktion der Invasivität um 80% im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen zeigte, soll nun die zu Grunde liegende Signaltransduktion mit Hilfe eines Antikörper-Microarrays mit 224 Antikörpern aus dem Bereich der Apoptose, des Zellzyklus und der Signaltransduktion geklärt werden.

P 1.2

Selenoprotein P als Tumormarker bei urogenitalen Tumoren

Meyer HA^{1,2}, Endermann T³, Stephan C¹, Jung K^{1,4}, Schomburg L³

¹ Klinik für Urologie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin

² Institut für Physiologie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin

³ Institut für experimentelle Endokrinologie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin

⁴ Berliner Forschungsinstitut für Urologie, Berlin

Hintergrund. Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) können in Normalgewebe sowie Tumorzellen zelluläre Transformationen auslösen. Als Signalüberträger wirken ROS auf die nachgeschalteten MAPK- und PAK-Signalwege, wodurch Zellmigration, Angiogenese und auch Metastasierung induziert werden. Peroxide als ROS-Vorläufer werden normalerweise in der Zelle durch Glutathion-Peroxidasen (GPx) abgebaut. Die Aktivität der GPx hängt aufgrund des L-Selenocysteins im aktiven Zentrum jedoch stark vom Selenstatus des Patienten ab.

Zielsetzung. Die Bedeutung des Spurenelementes Selen für die Prädisposition und den Krankheitsverlauf bei urologischen Tumoren (Prostata und Niere) zu untersuchen.

Methoden. Seren von Patienten mit einem Nierenzell- (RCC) bzw. Prostatakarzinom (PCa) wurden retrospektiv analysiert. Der Selenstatus wurde über das im Blut zirkulierende Selenoprotein P (SePP) bestimmt. Die Konzentration von SePP, die Selenkonzentration sowie etablierte Tumormarker wurden im Serum ermittelt und mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Das diagnostische Potenzial der untersuchten Marker wurde mit ROC- und Kaplan-Meier-Kurven analysiert.

Ergebnisse. Bei PCa- sowie RCC-Patienten sind die Selen- und SePP-Konzentrationen im Serum signifikant erniedrigt. Bei beiden Tumoridentitäten ist das Tumorstadium (pT) mit der Stärke der reduzierten SePP-Konzentration im Serum assoziiert. Metastasierte RCC-Patienten zeigen eine signifikant niedrigere SePP-Konzentration im Serum als nichtmetastasierte Patienten. Kaplan-Meier-Analysen beim RCC zeigen, dass geringe SePP-Konzentrationen mit einer deutlich verkürzten Lebensdauer assoziiert sind. Im Bereich der PCa-Vorhersage besitzt SePP prognostisches Potenzial; die Markerkombination aus Alter, PSA, % freiem PSA und SePP ergab den höchsten diag-

nostische Wert (AUC 0,80) im Vergleich zur Markerkombination ohne SEPP (AUC 0,77).

Fazit. Die verminderte SEPP-Konzentration im Serum stellt einen zusätzlichen Marker bei der PCa-Diagnose sowie bei der RCC-Prognose dar. Die mögliche Rolle dieser Befunde als Ausdruck veränderter Selenkonzentrationen im Tumorgewebe und damit zusammenhängender Einflüsse auf Stoffwechselwege werden schematisch dargestellt.

P 1.3

MUC7 als Prädiktor des tumorspezifischen Überlebens von Patienten mit frühinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase

Otto W, Burger M, Fritsche HM, Rößler W, Wieland WF, Denzinger S

Klinik und Poliklinik für Urologie, Universität Regensburg

Einleitung. Für MUC7, einer im Urothel exprimierten Unterform von Muzinen, wurde in Voruntersuchungen erhöhte Expression im Urin von Patienten mit schlecht differenzierten Harnblasenkarzinomen gefunden. Ebenso war MUC7 ein sensitiver Marker für das Vorliegen von Lymphknotenmikrometastasen nach radikaler Zystektomie und Lymphadenektomie. Die Prognose von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom im Stadium pT1 ist mit den heute bekannten Parametern nur unzureichend vorhersagbar. Daher untersuchten wir die immunhistochemische Expression von MUC7 im Tumorgewebe von Patienten mit pT1-Urothelkarzinom der Harnblase und deren Bedeutung für das tumorspezifische Überleben.

Material und Methoden. Anhand von paraffinierten Präparaten nach transurethraler Resektion der Harnblase an 335 Patienten mit pT1-Harnblasenkarzinom wurden immunhistochemische Färbungen mit MUC7 durchgeführt. Die Patienten wurden zwischen 1989 und 2009 an der Klinik für Urologie der Universität Regensburg behandelt. Zur Ermittlung des tumorspezifischen Überlebens wurde ein Cutoff-Wert von 20% definiert. Das Follow-up war durchschnittlich 49 Monate (1–156).

Ergebnisse. Die immunhistochemische MUC7-Färbung war auswertbar an 290 Schnitten. Der Anteil von Männern betrug 77%, das Durchschnittsalter der Patienten war 70,6 Jahre (41–98). Das Grading nach WHO 1973 wurde zum Zeitpunkt der Diagnosedstellung mit G1 in 1,4%, 40,3% G2 und 58,3% G3 angegeben. Das tumorspezifische Überleben von Patienten mit MUC7-Überexpression war 82,7% gegenüber 90,8% bei Patienten mit einer Expression $\leq 20\%$ ($p = 0,029$). Bei pT1G3-Tumoren unterschied sich das tumorspezifische Überleben hochsignifikant (76,2% vs. 88,5%; $p < 0,001$).

Fazit. An einem großen Kollektiv von pT1-Harnblasenkarzinomen konnten wir die ersten Untersuchungsergebnisse mit MUC7 im Rahmen von PCR-Tests an Urin bzw. Tumorgewebe von Harnblasenkarzinom-Patienten auf die immunhistochemische Analyse übertragen. Die weitere Prüfung des Markers auf seine prognostische Bedeutung beim pT1-Harnblasenkarzinom sollte in multizentrischen Studien vertieft werden.

P 1.4

Die Amplifikation und Überexpression von Vinculin beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom

Ruiz C¹, Holz DR², Oeggerli M¹, Schneider S¹, Gonzales IM², Kiefer J², Zellweger T³, Bachmann A⁴, Mousses S², Barrett MT², Azorsa DO², Bubendorf L¹

¹ Institut für Pathologie, Universitätsspital, Basel, Schweiz

² Pharmaceutical Genomics Division, Translational Genomics Research Institute, Scottsdale, USA

³ Abteilung für Urologie, St. Claraspital, Basel, Schweiz

⁴ Departement Urologie, Universitätsspital, Basel, Schweiz

Einleitung. Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom werden standardmäßig einer hormonablativen Therapie unterzogen. Obwohl zuerst erfolgreich, entwickeln fast alle diese Tumoren eine Therapieresistenz. Ungefähr 15% dieser kastrationsresistenten Prostatakarzinome weisen eine genomische Amplifikation des 10q22-Lokus auf. Ziel dieser Studie war es, die Struktur dieses 10q22-Amplifikons zu erforschen und das Zielgen dieses Amplifikons zu bestimmen.

Methoden. Wir haben Zelllinien, welche eine 10q22-Amplifikation aufweisen mittels hochauflösender Array-CGH untersucht. Dies erlaubte uns die gemeinsam amplifizierte Region und die darin enthaltenen 26 Gene genau zu bestimmen. In einem weiteren Schritt wurde die Expression jedes dieser Gene in einem RNA-Interferenz Screening unterdrückt und dessen Effekt auf die Zellproliferation bestimmt. Gene, welche zu einer signifikanten Wachstumsreduktion in der 10q22-amplifizierten Zelllinie PC-3 führten, nicht aber in der nicht amplifizierten Zelllinie 22rv1, wurden als potenzielle Zielgene dieses Amplikons definiert. Diese potenziellen Zielgene wurden dann mit Hilfe von funktionellen Assays untersucht und mittels Immunhistochemie auf Prostata Tissue Microarrays validiert.

Ergebnisse. Wir konnten die gemeinsam amplifizierte Region auf eine Länge von 5,8 Megabasen bestimmen. Die RNA-Interferenz Experimente deckten Vinculin als den vielversprechendsten Kandidaten dieses Amplikons auf. Die immunhistochemische Untersuchung der Proteinexpression zeigte, dass Vinculin-amplifizierte Prostatakarzinome eine signifikant höhere Vinculin-Proteinexpression aufweisen als die nichtamplifizierten ($p < 0,001$). Eine zusätzliche immunhistochemische Analyse an 443 Prostatakarzinomen von verschiedenen Stadien zeigte eine sehr hohe Vinculinexpression in den kastrationsresistenten Prostatakarzinomen, aber fast keine Expression bei benignen Prostatahyperplasien ($p < 0,0001$). Interessanterweise war eine hohe Vinculinexpression im Prostatakarzinom mit einer hohen Tumorzellproliferation assoziiert ($p < 0,0001$).

Diskussion. Obwohl unzählige wissenschaftliche Publikationen über die Zytoskeletton-Funktion des Vinculins vorhanden sind, wurde dessen Expression und Funktion im Prostatakarzinom noch nie untersucht. Unsere Resultate lassen darauf schließen, dass es sich beim Vinculin um das Zielgen des 10q22-Amplikons im Prostatakarzinom handelt. Die Vinculin-Überexpression könnte durch eine Steigerung der Tumorzellproliferation erheblich zur Progression des Prostatakarzinoms beitragen.

P 1.5

Die Detektion von Papillomavirus-DNA in der Prostata – ein Virus mit unterschätzter klinischer Relevanz?

Brookman-May S¹, May M², Gilfrich C², Wieland WF¹, Burger M¹

¹ Klinik für Urologie im Caritas-Krankenhaus St. Josef, Universität Regensburg

² Klinik für Urologie, St. Elisabeth-Krankenhaus, Straubing

Einleitung. Humane Papillomaviren (HPV) sind die häufigsten sexuell übertragenen Erreger und werden mit der steigenden Inzidenz verschiedener onogener Tumoren in Zusammenhang gebracht. Die Präsenz von HPV in der Prostata und der Stellenwert des Virus in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms (PCA) sind Gegenstand kontroverser Diskussionen. Den Hintergrund der vorliegenden Untersuchung bildete die Frage, ob eine Assoziation zwischen dem Nachweis von intraprostatatischen HPV und dem Prostatakarzinom besteht.

Material und Methoden. Es wurden 213 konsekutive Patienten ausgewertet (mittleres Alter: 65,7±8,4 Jahre), bei denen im Rahmen der transrektalen ultraschallgestützten Multi Biopsie der Prostata ein zusätzlicher Stanzzyylinder unter Anwendung der PCR auf Bakterien-, Pilze- und Viren-DNA (unter Einschluss von HPV) mit anschließender Sequenzierung untersucht wurde. Die so erhobenen Daten wurden neben dem histologischen Ergebnis mit diversen klinischen Parametern korreliert. Mittels binärem logistischen Regressionsmodell wurde der Einfluss der vorliegenden Erreger auf die Existenz des Prostatakarzinoms (PCA) geprüft.

Ergebnisse. Der Nachweis von allgemeiner Bakterien-DNA (16S rDNA) gelang nicht. Insgesamt 145 der 213 Patienten (68.1%) wiesen HPV-DNA in der PCR auf. In 64% (n=137) wurde High-Risk-HPV-DNA beschrieben, bei jeweils 18% waren es die HPV-Genotypen 16 und 18. Es bestand in unserer Untersuchung kein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem HPV-Nachweis und dem histologisch verifizierten PCA, das bei 23.5% der Patienten (n=50) gefunden wurde (Odds-Ratio: 1,45; 95%-KI: 0,71–2,91).

Fazit. Trotz fehlender positiver Korrelation zwischen HPV-DNA und PCA in der vorliegenden Untersuchung weisen dennoch Daten aus der Literatur auf einen Einfluss von Papillomaviren in der Karzinogenese des Prostatakarzi-

noms hin. Künftige Studien müssen klären, inwiefern die HPV-DNA in das Erbgut der Prostatazellen eingebaut wird und dann über einzelne Gene in der Lage ist, eine maligne Transformation zu bewirken.

P 1.6

Prädisposition zur TMPRSS2-ERG-Fusion im Prostatakarzinom

Lüdeke M^{1,2}, Linnert CM², Rinckleb AE^{1,2}, Hoegel J², Herkommer K³, Rubin MA⁴, Kuefer R¹, Assum G², Kubisch C², Vogel W^{1,2}, Schrader M¹, Maier C^{1,2}

¹ Klinik für Urologie, Ulm

² Institut für Humangenetik, Universität Ulm

³ Urologische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München

⁴ Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA

Hintergrund. Das Prostatakarzinom weist die höchste Heritabilität (0,42) unter den häufigen Tumorerkrankungen auf. In vorausgegangen Studien fanden sich Hinweise auf eine Suszeptibilität für eine Subgruppe an Karzinomen, die sich durch die Präsenz der häufig vorkommenden TMPRSS2-ERG Onkogenfusion auszeichnet. Als eine Hypothese für prädisponierende Keimbahnmutationen nehmen wir an, dass Defekte in DNA-Reparaturgenen zu einer Reduktion der chromosomalen Stabilität führen und damit chromosomale Rearrangements wie die der TMPRSS2-ERG-Fusion begünstigen.

Methodik. In Prostatakarzinomfamilien mit zwei und mehr fusionspositiven Fällen wurden mittels Kopplungsanalysen Suszeptibilitätsloci eingegrenzt. Innerhalb der Kandidatenregionen auf Chromosom 5q14, 9p13, 9q21, 10q26, 11q24, 12q15, 13q12 und 18q wurden 11 Gene aus dem Kontext der DANN-Reparatur gewählt und in TMPRSS2-ERG-Familien auf Keimbahnveränderungen analysiert. Von den gefundenen Varianten wurden 13, welche eine Veränderung der Proteinsequenz zur Folge haben, für eine Fall-Kontroll-Studie herangezogen. Das Kollektiv bestand aus 507 Kontrollen, 327 sporadischen und 203 familiären (47 davon mit TMPRSS2-ERG Status) Prostatakarzinomfällen.

Ergebnisse. In den Genen ESCO1 (Establishment of Cohesion 1) und POLI (Polymerase, DNA directed, Iota) fanden sich jeweils eine seltene Aminosäurevariante (MAF<0,05) mit einer Assoziation für das TMPRSS2-ERG positive Prostatakarzinom [ESCO1 N191S ($p=0,0034$; OR=4,27) und POLI F532S ($p=0,0011$; OR=4,62)], deren Signifikanz einer Bonferroni-Korrektur für multiples Testen standhielt (Grenzwert $p=0,0038$). Um die Relevanz der beiden assoziierten Varianten weiter zu beleuchten, wurden Tumorgewebe auf Loss of Heterozygosity (LoH) Ereignissen untersucht. LoH für ESCO1 N191S und POLI F532S fanden sich in 2 von 10 bzw. 1 von 8 Tumoren, stets unter dem Verlust des Wildtyp-Allels.

Fazit. Die Varianten in ESCO1 und POLI zeigen eine Effektgröße (OR>4), welche, für sich allein betrachtet, bereits relevant für die Risikoprädiktion von TMPRSS2-ERG positiven Tumoren sein könnten. Unumgänglich ist hier die Verifikation bzw. der funktionelle Beleg des Zusammenhangs zwischen Variante und Erkrankungsrisiko. Aus diesem Grund organisieren wir derzeit eine Verifikationsstudie im Rahmen des International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG). Geplant sind sowohl Kopplungsanalysen, als auch Fall-Kontroll-Studien auf einem größeren, TMPRSS2-ERG-typisierten Kollektiv. Für eine funktionelle Evidenz haben wir den TMPRSS2-ERG in vitro gene Assays etabliert, mit dessen Hilfe untersucht werden soll, wie sich Veränderungen der ESCO1- und POLI-Expression auf die Fusionsstehung auswirken. Daneben untersuchen wir, inwiefern sich die Expression von ESCO1 und POLI in Tumor- bzw. Normalgewebe von fusionspositiven und -negativen Tumoren voneinander unterscheiden.

P 1.7**Der Einsatz von mTOR- und HDAC-Inhibitoren verzögert die Zellzyklusprogression und die integrinabhängige Invasion von Prostatakarzinomzellen**

Hudak L, Seibel JM, Wedel S, Juengel E, Tsaur I, Haferkamp A, Blaheta RA
Klinik für Urologie und Kinderurologie, Goethe-Universität, Frankfurt a. M.

Der gezielte Angriff auf Proteine, die am Prozess der Signalübertragung beteiligt sind, stellt einen attraktiven therapeutischen Ansatzpunkt zur Hemmung von Wachstum und Metastasierung des Prostatakarzinoms (PCA) dar. In der vorliegenden Versuchsanordnung wurden die humanen Prostatakarzinomzelllinien PC-3, DU-145 (androgenresistent) und LNCaP (androgensensibel) mit dem Histondeazetylase-(HDAC-)Inhibitor Valproinsäure (VPA) alleine und in Kombination mit dem Mammalian-Target-of-Rapamycin-(mTOR-) Inhibitor RAD001 (Everolimus) behandelt. Besonders interessant erschien hierbei die Frage, ob eine Kombinationstherapie aus beiden Substanzen zu einer Wirkungsverstärkung durch Summation verschiedener antitumoraler Effekte führt.

Tatsächlich induzierte die Kombinationsbehandlung eine deutlichere Hemmung des Zellwachstums und der Zellzyklusprogression, als die separate Gabe jeweils einer Substanz. Der Anteil an PCA-Zellen in der G₀/G₁-Phase war deutlich verstärkt, der Anteil an PCA-Zellen in der G₂/M- und S-Phase deutlich vermindert. Darüber hinaus zeigten sich Veränderungen zellzyklusregulierender Proteine. Neben einer Reduktion von Cyclin B sowie der cyclinabhängigen Kinasen cdk1, cdk2 und cdk4 wurden die hemmenden Proteine p21 und p27 vermehrt exprimiert. Interessanter Weise konnte die RAD001-VPA-Kombination die Einzelwirkung auf die Tumorzelladhäsion an vaskuläres Endothel sowie die Matrixproteine Kollagen, Laminin oder Fibronectin nicht verstärken. Jedoch führte die separate Gabe von VPA oder RAD001 zu signifikanten Abweichungen im Expressionsprofil der Integrine des α - und β -Subtyps sowie zu einer veränderten Integrinaktivität.

Die vorliegenden Daten liefern eine vielversprechende Grundlage für den kombinierten Einsatz von mTOR- und HDAC-Inhibitoren beim fortgeschrittenen PCA in klinischen Prüfungen, ggf. in Begleitung mit einer Chemotherapie.

**Vortragssitzung II:
Neue Therapieziele**

Moderation: S. Füssel, Dresden/M. Burger, Regensburg

V 2.1**Targeting growth factor receptor signalling in the treatment of platinum-resistant testicular cancer**

Nitzsche B^{1,7}, Pries A¹, Schrader M², Preissner R¹, Honecker F³, Höpfner M¹

¹ Dept. of Physiology (CBF), Charité – Universitätsmedizin Berlin

² Dept. of Urology, University Ulm

³ Dept. of Oncology, University Medical Center, Hamburg-Eppendorf

* supported by Stiftung Urologische Forschung Berlin

Objective. Effective treatment of advanced urologic tumors resistant to conventional chemotherapy (e. g. testicular germ cell tumor, TGCT) is still insufficient. As angiogenesis is essential for the development, growth and progression of tumors we hypothesized that targeting angiogenic growth factor receptor signalling pathways may be a promising approach for novel treatment of therapy resistant TGCTs.

Design and methods. Two recently identified antiangiogenic compounds, HP-2 and HP-14, blocking the VEGFR-2 and related signalling pathways of endothelial and VEGFR-2-expressing cancer cells were investigated for their suitability to inhibit the growth and vascularization of normal and platinum-resistant testicular germ cell tumors (TGCT) in vitro and in vivo. Performing proliferation assays (crystal violet method), the antineoplastic effects of HP-2 and HP-14 alone or in combination with platinum compounds were evaluated in both platinum-sensitive and -resistant testicular germ cell tumor cells (2102EP, 2102EP-R). For in vivo evaluations TGCT cells (2102EP, 2102EP-R,

Tera-1, Tera-2) were inoculated onto the chorioallantoic membrane of fertilized chicken eggs (CAM assay). The developing tumors were treated with the HP-compounds and the inhibition of angiogenesis and tumor growth was documented.

Results and conclusions. HP-2 and HP-14 effectively suppressed the growth of TGCTs, both in vitro and in vivo. We could show that the growth of testicular germ cell cancer cells, resistant to conventional platinum-based chemotherapy can be potently inhibited by the novel HP-compounds alone or in combination with cisplatin. Together, these data suggest that HP-2 and HP-14 may be interesting new drugs for targeted therapy of urologic cancers, particularly for those being resistant to the conventionally successful platinum-based interventions.

V 2.2**Analysen zum Genexpressionsprofil in Nierenkarzinomzellen, induziert durch den HDAC-Inhibitor Valproat sowie Interferon α**

Jünger E, Makarevic J, Libermann T, Barth S, Michaelis M, Cinatl J Jr, Jones J, Hudak L, Haferkamp A, Blaheta RA

Klinik für Urologie und Kinderurologie, Goethe-Universität, Frankfurt a. M.

Molekular gezielte Therapieformen sind große Hoffnungsträger in der Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms (NZK). Zahlreiche Daten plädieren dabei für einen pharmakologischen Angriff auf Histone-Deacetylasen (HDAC), die als zentrale Schaltstellen in der Tumorzelle wesentlich für Malignität und Metastasierung verantwortlich sind. In präklinischen Studien haben wir den Einfluss des HDAC-Inhibitors Valproat (VPA) in Kombination mit Interferon α (IFN α) auf das Genexpressionsprofil humaner NZK-Zellen evaluiert. Caki-1-Zellen wurden für 3 oder 5 Tage mit 0,25 oder 1 mM VPA behandelt. In Parallelansätzen wurden die Tumorzellen mit VPA und IFN α (200 U/ml) inkubiert. Die Analyse der Genaktivität erfolgte mittels Affymetrix GeneChip HT Human Genome U133 Array Plate Set. Veränderungen wurden durch RT qPCR verifiziert.

VPA-induzierte signifikante Abweichungen im Genexpressionsmuster, insbesondere solcher Gene, die in Wachstums-, Apoptose-, Adhäsions- und Migrationsprozesse eingebunden sind. Die Kombination von VPA mit IFN α erhöhte nicht nur den Effekt der Einzelsubstanzen, sondern veränderte auch solche Gene, die durch VPA oder IFN α alleine nicht alteriert wurden. Auffällig war die deutliche Aktivitätserhöhung Chemokin- (CXCL10, CXCL11, CXCL16) und Integrin-regulierender Gene (ITGA2, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA7). Auch die Adhäsionsmoleküle NCAM1, ICAM1, VCAM1 wurden signifikant verändert. Die Daten konnten durch RT qPCR bestätigt werden. In biologischen Testsystemen zeigte sich eine deutliche Blockade des Wachstums- und Adhäsionsverhalten der Tumorzellen unter VPA sowie unter der VPA-IFN α -Kombination.

Die Daten erlauben den Schluss, dass VPA, kombiniert mit IFN α deutliche Veränderungen im Genmuster der NZK-Zellen hervorruft, die mit einer verminderten Wachstums- und Adhäsionskapazität einhergehen. Die Therapiestrategie könnte somit eine innovative Option zur Behandlung des fortgeschrittenen NZK repräsentieren.

V 2.3

Humaninpathogenes Encapholmyokarditisvirus hat onkolytisches Potenzial zur Behandlung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms

Roos FC^{1,2,5}, Roberts AM^{1,5}, Hwang III^{1,5}, Watson IR^{1,3}, Carneiro LAM¹, Girardin SE¹, Bell JC⁴, Der SD¹, Ohh M^{1,7}

¹ Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Ontario, Canada

⁵ King's College Circle, Toronto, Ontario, Canada

² Department of Urology, Johannes Gutenberg University, Mainz

³ Cancer Research Program and Division of Haematology-Oncology, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada

⁴ Center for Cancer Therapeutics, Ottawa Health Research Institute, Ottawa, Ontario, Canada

* Correspondence to: Michael Ohh, PhD; Tel: 416-946-7922;

E-mail: michael.ohh@utoronto.ca

Apoptose ist ein fundamentaler Abwehrmechanismus gegen Mikroben. Inaktivierung des antiapoptischen NFκ-B-Signalweges schwächt die Virulenz und die virale Replikation des Encephalomyokarditisvirus (EMCV) ab, da infizierte Zellen schnell in die Apoptose eintreten. Der Hypoxie-induzierende Faktor (HIF) mediiert die antiapoptische Wirkung des NFκ-B im klarzelligen Nierenzellkarzinom (kzNZK), da dieses häufig aufgrund Mutation oder Inaktivierung des Tumorsuppressor von Hippel-Lindau (VHL) eine erhöhte HIF-Expression aufweist.

Wir konnten zeigen, dass EMCV NFκ-B in mehreren immortalen und direkt aus dem Patienten gewonnenen und kultivierten Nierenzellkarzinomzelllinien induziert und diese über die viral induzierte Lyse abtötet. Die funktionelle Restauration des VHL oder Suppression des HIF und NFκ-B Signalweges schwächten die Virulenz des EMCVs in kzNZK-Zelllinien drastisch ab. Ferner führte eine intratumorale Applikation des EMCV in kzNZK-Zelllinien, die in die Rückenkammer von Mäusen injiziert wurden, zu einer Regression der dort sich gebildeten Tumoren.

Diese Beobachtungen zeigen ein mögliches onkolytisches Potenzial des EMCV für die Behandlung des NZK und anderer HIF und NFκ-B überexprimierender solider Tumoren.

V 2.4

Mechanismen der spezifischen Hemmung der Migration von NZK-Zellen durch das Disintegrin Echistatin

Jäger W, Becker A, Schneider E, Thüroff JW, Hampel C, Brenner W
Urologische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin,
Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz

Einleitung. Im Zentrum der Metastasierungskaskade steht die Adhäsion von Tumorzellen an das Gefäßendothel und letztendliche Transmigration in das jeweilige Sekundärorgan. Dabei interagieren Integrine mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix, welche die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) beinhalten. Disintegrine, die ebenfalls die RGD-Sequenz enthalten, können Integrine blockieren und somit die Transmigration von Tumorzellen durch das Endothel inhibieren. Wir haben den Einfluss der Disintegrine Kistrin und Echistatin auf die Zellmigration und deren molekulare Hintergründe analysiert.

Materialien und Methoden. Die NZK-Zelllinie CCR-RC1 wurde mit Echistatin, Kistrin und RGD-enthaltenden Peptiden (RGD-Tripeptid, G-RGD-S, analog zu Fibronectin, A-RGD-D, analog zu Echistatin und P-RGD-M, analog zu Kistrin) vorinkubiert. Anschließend wurde die Zellmigration in einer Boyden-Kammer quantifiziert. Ferner wurde die Adhäsionsstärke der Zellen an diese Moleküle und durch blockierende Antikörper die Rolle von β1- und α5-Integrinen in diesem Prozess untersucht. Die Bedeutung der Tertiärstruktur der Disintegrine wurde durch Spaltung der Disulfidbrücken beurteilt.

Ergebnisse. Im Gegensatz zu Kistrin bewirkte das Disintegrin Echistatin eine Hemmung der Tumorzellmigration auf 25% der unbehandelten Zellen. Von den RGD-enthaltenden Peptiden zeigte die Positivkontrolle G-RGD-S eine Hemmung auf 45% und das Echistatin-Analogon A-RGD-D auf 80%, während das Kistrin-Analogon P-RGD-M keine Hemmung bewirkte. Die Adhäsion der Tumorzellen an Echistatin und an Kistrin war gleichsam stark,

wohingegen es zu keiner Bindung an die RGD-Peptide kam. Die vorherige Inkubation der Zellen mit blockierenden Antikörpern gegen β1- und α5-Integrine zeigte keinen Einfluss auf diesen Prozess. Nach Spaltung der Disulfidbrücken der Disintegrine war die hemmende Wirkung von Echistatin auf die Zellmigration aufgehoben; ebenfalls war keine Adhäsion der Tumorzellen an das veränderte Echistatin mehr zu beobachten.

Fazit. Die beiden Disintegrine Echistatin und Kistrin beinhalten die Aminosäure-Sequenz RGD in gleichem Maße. Nach Inkubation von Tumorzellen mit Disintegrinen zeigte sich, dass lediglich Echistatin die Tumorzellmigration hemmt. Da die Tumorzellen im Adhäsionsversuch ebenfalls eine starke Adhärenz an Kistrin zeigten, scheint der hemmende Effekt von Echistatin auf die Zellmigration nicht auf der unmittelbaren Blockierung von Integrinen, sondern auf einer möglichen selektiven Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zu beruhen. Da es nach Spaltung der Disulfidbrücken und somit Zerstörung der Tertiärstruktur des Echistatins zu keiner Adhäsion an Tumorzellen und konsekutiven Migrationshemmung mehr kommt, scheint der Anordnung der RGD-Sequenz in der Haarnadelschleife eine wesentliche Bedeutung beizukommen.

V 2.5

Inhibition der GSK-3β verhindert eine hormonunabhängige Aktivierung des AR in HRPcα-Zellen

Zengerling F, Schrader AJ, Schrader M, Cronauer MV, Schütz SV
Klinik für Urologie, Universitätsklinikum, Ulm

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor aus der Superfamilie der Steroidrezeptoren. In Abwesenheit eines Liganden befindet sich der AR in einem inaktiven Zustand im Zytoplasma. Die Bindung von Androgenen führt zu einer Dimerisierung des AR mit einem weiteren AR-Molekül und begünstigt dessen Transport in den Zellkern. Im Kern bindet das AR-Dimer an sog. Androgen-Response-Elemente auf der DNA und moduliert die Transkription androgenabhängiger Gene. Beim disseminierten fortgeschrittenen PCa wird die Hormonabhängigkeit der PCa-Zellen durch Hormonentzug therapeutisch genutzt. Obwohl die Mehrzahl der Patienten anfänglich gut auf eine Hormonablation anspricht, kommt es nach einem Zeitraum von durchschnittlich 2 Jahren zur Tumorprogression mit Bildung von hormonrefraktären Prostatakarzinom-(HRPcα)-Zellen welche auch in Abwesenheit von Androgenen proliferieren können.

Wie mittels Western Blot gezeigt werden kann, weisen die hormonrefraktären LNCaP-Tochterzelllinien SSR und C4-2 im Vergleich zu den parentalen, hormonsensitiven LNCaP-Zellen eine erhöhte intrazelluläre AR-Proteinkonzentration auf. Des Weiteren kann in den hormonrefraktären SSR und C4-2 eine ligandenunabhängige nukleäre Akkumulation des AR nachgewiesen werden. Interessanterweise geht die Erhöhung der intrazellulären AR-Konzentration in C4-2 und SSR mit einer erhöhten Expression der Glykogen-Synthase-Kinase 3β (GSK-3β), einer ubiquitär vorkommenden Serin-/Threonin-Kinase einher. Eine pharmakologische Inhibition der GSK-3β mittels SB216763, einem weit verbreiteten GSK-3β Inhibitor führt zu einem schnellen, nukleären Export des AR in den hormonrefraktären C4-2 und SSR in Abwesenheit physiologischer Androgenkonzentrationen. In weiterer Folge führt eine Verminderung der GSK-3β Aktivität durch SB216763 in Abwesenheit von Androgen zu einer Abnahme der PCa-Zellproliferation. Diese ist am deutlichsten in den hormonrefraktären AR-positiven C4-2 und SSR im Vergleich zu den hormonabhängigen LNCaP oder den AR-negativen PC3-Zellen (C4-2>SSR>LNCaP>PC3).

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass der nukleäre Export des AR durch Inhibition der GSK-3β möglicherweise ein nützlicher Ansatzpunkt zur Unterbrechung des konstitutiv aktiven AR-Signalweges in fortgeschrittenen, hormonrefraktären PCa ist.

V 2.6

Interferon signalling defects in prostate cancers affect the response to DNA methylation inhibitors

Bleckmann S, Schulz WA

Department of Urology, Heinrich Heine University, Düsseldorf

Mutations and polymorphisms in genes encoding antiviral proteins, notably RNASEL, are associated with an increased risk of prostate cancer. In many prostate cancers interferon response genes, like the prototypic MX1, are downregulated. We sought to elucidate whether changes in DNA methylation underlie this downregulation.

Treatment with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (aza-dC) induced MX1 and several other interferon responsive genes in PC3, but not in LNCaP cells, after 3 days. According to bisulfite sequencing, however, the major MX1 promoter was unmethylated in both cell lines. Induction of MX1 in LNCaP cells was neither restored by increasing the inhibitor concentration nor the length of treatment. In contrast to PC3, LNCaP cells express the androgen receptor and contain mutant RNase L. However, depleting LNCaP medium of steroids did not restore MX1 inducibility by aza-dC. Neither was MX1 inducibility in PC3 diminished by siRNA-mediated downregulation of RNase L. Intriguingly, compared to PC3, LNCaP cells also displayed a strongly diminished induction in response to exogenous interferon β (8- vs. 90-fold), due to a 50-fold decreased expression of JAK1, a protein kinase crucial for interferon signalling. Accordingly, interferon β expression in PC3 cells became upregulated after two days of aza-dC treatment, with the increase in MX1. This suggests that aza-dC treatment elicits interferon production, JAK1 activation and induction of interferon responsive genes like MX1 in PC3 cells. This sequence appears inactive in LNCaP cells due to lack of JAK1. Downregulation of JAK1 expression was not restricted to this cell line, but was also observed in a significant fraction of prostate cancer tissues. Our data suggest that downregulation of interferon responsive genes in prostate cancers is not caused by hypermethylation of their promoters, but is rather secondary to changes in interferon signalling pathways, such as JAK1 deficiency. Our findings have implications for the potential use of DNA methylation inhibitors in prostate cancer therapy, by predicting that aza-dC will induce interferon responses in some prostate cancers, but not in others. These differences are expected to affect the therapeutic efficacy of aza-dC and other inhibitors of DNA methylation in this cancer type.

V 2.7

ROS signalling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stromaSampson N¹, Zenzmaier C¹, Bubendorf L², Plas E³, Lener B¹, Jansen-Dürr P¹, Berger P¹¹ Institute of Biomedical Aging Research, Austrian Academy of Science, Innsbruck, Austria² Institute of Pathology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland³ Ludwig Boltzmann Institute for Andrology and Urology, Hospital Lainz, Vienna, Austria

Stromal remodeling, in particular fibroblast-to-myofibroblast differentiation, is a hallmark of benign prostatic hyperplasia (BPH) and solid tumors, including prostate cancer (PCa). Increased local production of TGF β 1 is considered the inducing stimulus. Given that stromal remodeling actively promotes BPH/PCa development, there is considerable interest in developing stromal-targeted therapies.

Microarray and quantitative PCR analysis of primary human prostatic stromal cells (PrSCs) induced to undergo fibroblast-to-myofibroblast differentiation with TGF β 1 revealed up-regulation of the ROS producer NADPH oxidase 4 (NOX4) and down-regulation of the selenium-containing ROS scavenging enzymes Glutathione peroxidase 3 (GPX3), Thioredoxin reductase 1 (TXNRD1) and the selenium transporter Selenoprotein P plasma 1 (SEPP1). Consistently, NOX4 expression correlated specifically with the myofibroblast phenotype in vivo and loss of SEPP1 was observed in tumor-associated stroma of human PCa biopsies. Using lentiviral NOX4 shRNA-mediated knockdown, pharmacological inhibitors, antioxidants and selenium,

we demonstrate that TGF β 1 induction of NOX4-derived ROS regulates the phosphorylation status of ERK1/2 and JNK, which subsequently initiate downstream cytoskeletal remodeling. Selenium supplementation inhibited differentiation, enhanced expression of the ROS scavenging selenoenzymes GPX3, TXN and TXNRD1 and depleted ROS levels downstream of NOX4 induction. Significantly, selenium reverses fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation even in the continued presence of the transdifferentiation-inducing stimulus.

Collectively, this work demonstrates that dysregulated redox homeostasis driven by elevated NOX4-derived ROS signalling underlies fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma. Further, these data indicate the potential clinical value of selenium and/or NOX4 inhibitors in preventing the functional pathogenic changes of stromal cells in BPH and PCa.

This work was supported by the Austrian Science Fund (FWF; NRN S9307-B05 and S9305-B05), NS is the recipient of a Lise Meitner Scholarship (FWF; M903-B05). The authors have no competing financial interests.

Postersitzung

Moderation: F. Wagenlehner, Gießen/H. Krause, Berlin

P 2.1

Endothelial factors in the prostate: loss of Caveolin-1 in prostate cancer correlates with tumour aggressiveness and plays a putative role in signal transductionSteiner I^{1,2}, Jung K², Schlomm T³, Sauter G⁴, Rabien A⁵, Diemel M¹, Erbersdobler A⁶¹ Institut für Pathologie, Charité, Berlin² Berliner Forschungsinstitut für Urologie³ Klinik für Urologie, Universität Hamburg⁴ Institut für Pathologie, Universität Hamburg⁵ Klinik für Urologie, Charité, Berlin⁶ Institut für Pathologie, Universität Rostock

Aims. Understanding the mechanisms of angiogenesis in prostate cancer (PCa) could be helpful for the development of diagnostic and prognostic markers and therapeutic options. Therefore, we investigated angiogenic and endothelial factors (VEGFA, VEGFR2, Cav-1, CD31, CD34, CD105, CD144, CD146) on the mRNA and/or protein level in well defined cohorts of prostate cancers and correlated the data with microvessel density (MVD) and clinicopathological parameters.

Methods. Tissue microarrays (TMAs) of 3261 prostatectomy specimens from patients with PCa and a validating cohort of 64 specimens were analysed for MVD by immunohistochemistry (CD31and/or CD34). The smaller cohort was additionally used to assess mRNA expression in normal prostatic tissue and corresponding tumour samples retrieved from each patient. Protein expression of endothelial Cav-1 was further analysed on the validating TMA.

Results. In both cohorts, MVD correlated significantly with tumour grade and pT status. In comparison to normal tissue, Cav-1 mRNA was significantly down-regulated in tumour samples and correlated inversely with pT status ($p=0.006$) and Gleason score ($p=0.012$). Higher MVD tended to result in lower Cav-1 mRNA expression ($rs=-0.277$, $p=0.056$). In a univariate Kaplan Meier survival analysis, lower Cav-1 mRNA expression was associated with biochemical recurrence. On the protein level, Cav-1 was mainly localized in endothelial cells and stromal regions. After analyzing whole tissue sections, in 12/64 cases Cav-1 was less expressed in tumoural endothelial cells than endothelial cells of corresponding normal regions.

Conclusion. Our data confirm that protein expression of the endothelial markers CD31 and CD34 have progressive value in archived prostatic tissue. Furthermore, loss of Caveolin-1, a putative tumour suppressor gene involved in endocytosis and signaltransduction, plays a role in the development and progression of prostate cancer.

P 2.2

HMGA2 upregulation is related to tumor progression and let-7 down-regulation in high risk prostate carcinoma

Schubert M¹, Spahn M¹, Kneitz S², Scholz CJ², Ströbel P³, Patrik A³, Riedmiller H¹, Kneitz B¹

¹ Department of Urology and Paediatric Urology, University Medical School, University of Würzburg

² Microarray Core Unit, IZKF (Interdisciplinary Center for Clinical Research), University of Würzburg

³ Institute of Pathology, University Medical Center Mannheim, University of Heidelberg

The highmobility group A2 (HMGA2) nonhistone chromosomal protein can modulate transcription by altering chromatin architecture. HMGA2 is highly expressed during embryogenesis and in various benign and malignant tumors. Recent studies report that HMGA2 is negatively regulated by the let-7 microRNA (miRNA) family. However, no studies have examined the clinical significance of HMGA2 expression and its relationship to the let-7 miRNA family in prostate cancer.

We analyzed the HMGA2 expression in 148 high-risk prostate carcinomas compared to benign and hyperplastic prostatic tissue. HMGA2 expression levels were correlated to various clinicopathological factors. In addition we analysed the expression of let-7 miRNA family members in our high-risk prostate cancer cohort and performed association studies between HMGA2 and let-7 family members in prostate carcinoma. The expression of HMGA2 in prostate cancer was significantly higher than in noncancerous tissues ($p < 0.05$). Elevated HMGA2 expression was significantly correlated with poor clinical prognosis ($p < 0.05$) and a multivariate analysis characterized the HMGA2 expression status as an independent prognostic factor ($p < 0.05$). The expression of let-7a in prostate carcinomas, which were characterized by low HMGA2 expression, was significantly higher than those with high HMGA2 expression ($p < 0.05$). An inverse correlation between HMGA2 and let-7a was found in primary prostate carcinoma.

Our results showed that high expression of HMGA2 in high-risk prostate cancer correlated with tumor progression and is an independent prognostic factor. Furthermore, our findings suggested that HMGA2 is negatively regulated by the let-7 miRNA family in prostate cancer.

P 2.3

miR-133b: eine tumorsuppressive miRNA im Prostatakarzinom

Schäfer A^{1,2,3}, Patron J⁴, Jung M¹, Mollenkopf HJ⁵, Stephan C¹, Kaufmann SHE⁴, Schreiber J⁴, Jung K^{1,2}

¹ Klinik für Urologie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin

² Berliner Institut für Urologische Forschung

³ Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität, Berlin

⁴ Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Abteilung für Immunologie, Berlin

⁵ Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Microarray core facility, Berlin

Ziel. miR-133b ist in verschiedenen Tumoren, wie im Blasenkarzinom erniedrigt exprimiert. Der Nachweis, dass miR-133b todesrezeptorvermittelte Apoptose in HeLa-Zellen reguliert, bestätigt ihre Funktion als Tumorsuppressor. In dieser Studie wurde die Expression und Funktion der miR-133b im Prostatakarzinom untersucht.

Methoden. Die miR-133b-Expression wurde in 69 Prostatakarzinomgeweben und normalem angrenzenden Gewebe bestimmt. PC3-Prostatakrebszelllinien wurden mit synthetischer pre-miR-133b, anti-miR-133b-Inhibitor oder einer Kontroll-miRNA transient transfiziert. Die globale mRNA Expression nach miR-133b-Transfektion wurde mittels eines Microarray analysiert. Weiterhin wurde die Inhibierung von Targetgenen durch Luciferasereportergenassay, Western Blot und Real Time quantitativer PCR verifiziert. Die mRNA-Expression ausgewählter Targetgene wurde mit der miR-133b-Expression in den Prostatakarzinomgeweben korreliert.

Ergebnisse. Prostatakrebspatienten zeigten im Mittel eine 1,7-fach niedrigere Expression der miR-133b im Tumorgewebe im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe. Die Expression war nicht mit dem Gleason-Score oder dem

pathologischen Stadium korreliert. Überexpression der miR-133b in PC3-Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion der Proliferationsrate. Die Analyse der globalen mRNA Expression in miR-133b überexprimierenden PC3-Zellen im Vergleich zu Kontroll-miR transfizierten Zellen ergab eine Panel von 202 vermindert exprimierten miRNAs, die als direkte Targets vorhergesagt wurden. Ausgewählte Targets wurden weiterhin als direkte Targets der miR-133b validiert.

Fazit. miR-133b stellt eine tumorsuppressive miRNA im Prostatakarzinom dar und reguliert eine Vielzahl von Genen direkt und indirekt. Ihre Funktion in der Kanzerogenese des Prostatakarzinoms macht sie zu einem möglichen Target für neue Therapieansätze.

P 2.4

MikroRNAs sind häufig dereguliert im Prostatakarzinom und potenzielle Regulatoren von Signaltransduktionswegen wie PI3-Kinase oder MAP-Kinase-Pathway

Wach S¹, Nolte E¹, Szczyrba J², Stöhr R³, Hartmann A³, Ørntoft T⁴, Dyrskjöt L⁴, Eltze E⁵, Wieland W⁶, Grässer F², Wullich B¹

¹ Urologische Klinik, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg

² Institut für Virologie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

³ Pathologisches Institut, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg

⁴ Dept. of Molecular Medicine, University Hospital, Århus, Denmark

⁵ Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster

⁶ Urologische Klinik, Universität Regensburg

Einleitung. MikroRNAs (miRNAs) sind nichtprotein kodierende RNAs mit einer Größe von 21–25 Nukleotiden, welche die Genexpression auf einer posttranskriptionellen Ebene durch Inhibition der Proteinsynthese regulieren. Hierbei können miRNAs sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene fungieren. Der Deregulation von miRNAs wird eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung zugeschrieben.

Material und Methoden. Wir verwendeten 4 unabhängige Methoden um die miRNA Expression in zwei Patientenkollektiven zu analysieren („deep sequencing“, miRNA-Mikroarrays, Real-Time-PCR und miRNA in situ Hybridisierung). Das Potenzial von einzelnen miRNAs oder Kombinationen von miRNAs, zwischen malignen und nichtmalignen Gewebeproben zu unterscheiden, wurde unter Verwendung einer binären logistischen Regressionsanalyse und „receiver-operator characteristics“ (ROC) analysiert. Mit bioinformatischen Analysemethoden wurde untersucht, welche Zielgene von deregulierten miRNAs beeinflusst werden und welche Signaltransduktionswege hiervon beeinflusst werden können.

Ergebnisse. Wir identifizierten eine Gruppe von 4 miRNAs (miR-375, miR-200c, miR-143 und miR-145), die hochreproduzierbar in primären Prostatakarzinomen dereguliert sind ($p < 0,05$ gepaarter t-Test). Diese miRNAs konnten in einem binären logistischen Regressionsmodell die Dignität von mehr als 77% aller Gewebeproben korrekt vorhersagen. Die potenziellen Zielgene von deregulierten miRNAs sind unter anderem auch Bestandteile von bekannten Signaltransduktionswegen, die im Prostatakarzinom eine bedeutende Rolle spielen. Eine direkte Beeinflussung der PI3-Kinase- oder MAP-Kinase-Signalwege durch miRNAs ist möglich und könnte zu einer höheren Apoptoseresistenz (BCL2, FOXO1) oder verminderter Zellzykluskontrolle (CDKs) beitragen.

Fazit. Mit verschiedenen experimentellen Techniken lassen sich hochreproduzierbare miRNA-Expressionsprofile des Prostatakarzinoms erstellen. Diese miRNA-Expressionsprofile haben das Potenzial, als wertvolle diagnostische Biomarker zu dienen. Signaltransduktionswege, die von miRNAs beeinflusst werden können, lassen sich bioinformatisch identifizieren.

P 2.5**EDNRB and TSPAN7 represent new potential prognostic markers in clear-cell renal cell carcinoma**

Wuttig D¹, Zastrow S¹, Tomasetti S¹, Hofmann J¹, Toma M², Fuessel S¹, Meinhardt M², Junker K³, Sanjmyatav J³, Ullmann K⁴, Hackermueller J⁴, Erdmann K¹, Grimm M¹, Wirth MP¹

¹ Department of Urology, University Hospital, Dresden

² Institute of Pathology, University Hospital, Dresden

³ Dept. of Urology, Friedrich-Schiller University, Jena

⁴ Dept. of Diagnostics and New Technologies, Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology IZI, Leipzig

Aim. The aim was to validate the prognostic value of three genes recently identified in our microarray analyses on clear-cell renal cell carcinoma (RCC) to distinguish early and late metastasizing tumors.

Material and methods. Relative gene expression of EDNRB and PECAM1 (CD31) was measured on 86 cryo-preserved primary RCC by quantitative PCR using gene-specific TaqMan Assays. TSPAN7 protein expression was investigated by immunohistochemistry on tissue microarrays comprising 116 primary RCC and 102 corresponding non-malignant tissues using a polyclonal anti-TSPAN7 antibody.

Results. CD31 and EDNRB were significantly lower expressed in RCC with synchronous compared to metachronous metastases ("disease-free survival", DFS=2 vs. >2 years) and also showed a significantly lower expression in metastasized compared to non-metastasizes RCC (follow-up=92 months; p<0.05, U-test). Patients with low EDNRB (p=0.009; p=0.045) or CD31 (p=0.038) expression had a significantly shorter tumor-specific survival (TSS) and DFS (log rank test). TSPAN7 protein was slightly expressed in tumor cells without any prognostic relevance. A moderate to strong expression was seen in tumorous blood vessels. Patients with less TSPAN7 positive vessels had a significantly shorter DFS (p=0.025) and TSS (p=0.042). CD31 (HR=4,1) and TSPAN7 (HR=6,7) were independent predictors of TSS in addition to clinical stage and grade.

Conclusion. EDNRB, TSPAN7 as well as the vessel marker CD31 represent potenzial prognostic markers in RCC. Particularly TSPAN7, without any known relations to tumor progression so far, represents an interesting candidate for further studies. Support: Dr. R. Pflieger, Jürgen-Manchot-Stiftung.

P 2.6**Fibronectin 1 mRNA expression correlates with risk of progression in renal cell cancer**

Waalkes S¹, Atschekzei F¹, Eggers H¹, Hennenlotter J², Vetter G¹, Merseburger AS¹, Becker JU¹, Schrader AJ³, Serth J¹, Kuczyk MA¹

¹ Department of Urology, Medical School, Hannover

² Department of Urology, Eberhard Karls University, Tübingen

³ Department of Urology, University Medical School, Ulm

Background. Fibronectin 1 (FN1) is a glycoprotein involved in cellular adhesion and migration processes. The aim of this study was to elucidate the role of FN1 in development of renal cell cancer (RCC) and to determine a prognostic relevance for optimal clinical management.

Methods. 212 renal tissue samples (109 RCC, 86 corresponding tissues from adjacent normal renal tissue and 17 oncocytomas) were collected from patients undergoing surgery for renal tumors and subjected to total RNA extraction. Detection of FN1 mRNA expression was performed using quantitative real time PCR, three endogenous controls, renal proximal tubular epithelial cells (RPTEC) as biological control and the DDCT method for calculation of relative quantities. In addition relation between progression free survival, clinical variables and expression levels were assessed.

Results. Mean tissue specific FN1 mRNA expression was found to be increased approximately seven-fold comparing RCC and corresponding kidney control tissues (p median; HR=3,75, 95% CI 1,22–11,52).

Conclusion. To our knowledge, this is the first study to show that FN1 mRNA expression is higher in RCC compared to normal renal tissue and correlates with progression free survival. FN1 mRNA expression might serve as a mar-

ker for RCC aggressiveness, indicating early systemic progression particularly for patients with papillary RCC.

P 2.7**Die Interaktion zwischen Tumor- und Stromazellen induziert Veränderungen des Expressionsmusters in Nierenzellkarzinomen**

Weiland A¹, Enkelmann A¹, Walter M¹, Kröger N¹, v. Eggeling F², Wunderlich H¹, Junker K¹

¹ Klinik für Urologie, Universitätsklinikum, Jena

² Core Unit Chip Application, Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum, Jena

Hintergrund. Das Nierenzellkarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Niere. Über die Tumorbiologie ist bislang jedoch wenig bekannt. Für eine Reihe verschiedener Tumorentitäten wird der Tumormikroumgebung eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Die tumorassozierten Fibroblasten, als Bestandteil dieser Mikroumgebung, beeinflussen das Proliferations-, Invasions- und Migrationsverhalten der Tumorzellen durch Ausschüttung verschiedener Faktoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Änderungen im Expressionsmuster, welche durch die Interaktion zwischen Nierentumorzellen und Fibroblasten verursacht werden, untersucht, mit dem Ziel, einen Einblick in die molekularen Vorgänge des Nierenzellkarzinoms zu erhalten.

Material und Methoden. Die Nierentumorzellen und Fibroblasten wurden über Zellkultureinsätze 48 h co-kultiviert. Es wurden sowohl Nierentumorzelllinien als auch primäre Tumorzellen eingesetzt, welche durch mechanische und enzymatische Aufarbeitung von Patientenmaterial gewonnen wurden. Die verwendeten Vorhautfibroblasten wurden ebenfalls aus primärem Patientengut isoliert. Die co-kultivierten Zellen und die dazugehörigen Kontrollen wurden geerntet und lysiert. Die Proteinlysate wurden für eine SELDI-TOF-MS eingesetzt, um Änderungen im Proteinspektrum beider Zelltypen zu detektieren, welche durch den wechselseitigen Einfluss eventuell induziert wurden. Nach bioinformatischer Datenanalyse wurden unterschiedlich exprimierte Proteinmassen ermittelt. Des Weiteren wurden die Proteinlysate für eine 2D-DIGE verwendet, um die Daten der SELDI-TOF-MS zu bestätigen und zu erweitern.

Ergebnisse. Bei Vergleich der Proteinspektren der co-kultivierten und der separat kultivierten Zellen konnten Änderungen im Expressionsmuster beobachtet werden. Nach Co-Kultivierung der Nierentumorzellen mit Fibroblasten waren erhöhte Proteinexpressionslevel verschiedener Proteinmassen zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu wiesen die co-kultivierten Vorhautfibroblasten niedrigere Expressionslevel auf im Vergleich zu den Kontrollproben. Die erhaltenen Proteinmuster waren reproduzierbar. Die Daten der SELDI-TOF-MS konnten mithilfe der 2D-DIGE bestätigt und erweitert werden.

Fazit. Die gewonnenen Daten zeigen, dass die Co-Kultivierung von Nierentumorzellen und Fibroblasten Änderungen im Proteinexpressionsmuster induziert. Die Identifizierung der unterschiedlich exprimierten Proteinmassen sowie funktionelle Analysen werden einen Einblick in die molekularen Vorgänge des Nierenzellkarzinoms bezüglich der Tumor-Stroma-Interaktion ermöglichen.

Vortragssitzung III:**Molekulare Grundlagen zugelassener Therapien**

Moderation: K. Junker, Jena/R. Nawroth, München

V 3.1**Welche Rolle spielen der PI3K/Akt/mTOR- bzw. der MAPK-Signalweg im Urothelkarzinom? Ein methodischer Lösungsansatz**

Nawroth R, Stellwagen F, Horn T, Retz M

Urologische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität, München

Einleitung. Der Einsatz von mTOR-Inhibitoren gehört in verschiedenen Tumorentitäten mittlerweile zur Standardtherapie. Es ist bekannt, dass sich der

PI3K-/Akt-/mTOR- und MAPK-Signalweg gegenseitig in ihrer Aktivität regulieren und gemeinsam Einfluss auf Zellwachstum haben. Obwohl im Urothelkarzinom (UC) 60-70% der Patienten Mutationen in dem PI3K-/Akt-/mTOR-Signalweg aufweisen, wurde dieser Signalweg mechanistisch nur sehr oberflächlich charakterisiert. Erste Daten aus einer einarmigen Phase-II-Studie mit Everolimus (Afinitor, RAD001) in der Zweitlinientherapie zeigen, dass nur 3 von 17 Patienten nach 8 Wochen einen stabilen Krankheitsverlauf hatten. Wir haben eine biochemische Charakterisierung dieser Signalwege durchgeführt, die zu einer Definition neuer therapeutischer Ansätze führen könnte.

Material und Methoden. Aktivierung und Expressionsstatus der Kinasen Akt, mTOR, S6K1, 4E-BP1, S6RP, GSK3, ERK1/2 und Rafi wurde in 9 UC-Zelllinien mittels Immunblots untersucht. Für funktionelle Analysen wurden die Inhibitoren RAD001, NVP-BEZ235, LY294002 und U0126 oder siRNAs gegen mTOR, S6K1 und 4E-BP1 verwendet. Proliferation wurde mittels BrdU Inkorporation und DANN-Färbung mit 7AAD mittels FACS-Analyse detektiert. Apoptose wurde mit mittels Caspase-3/7-Aktivität und Zellvitalität mittels XTT-Tests ermittelt. Für das Zellwachstum wurde eine Neubauer-Kammer verwendet und lebende Zellen gezählt.

Ergebnisse. In 7 von 9 getesteten Zelllinien wurde unter definierten Kulturbedingungen eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges detektiert. Inhibition von mTORC1 führte zu einer Inaktivierung von S6K1, wohingegen 4E-BP1 nur durch PI3K/Akt Inhibition reguliert wurde. S6K1 Expression und Aktivität regulierte den Aktivierungsstatus von PI3K. Nur die Inaktivierung von S6K1 und 4E-BP1 unterdrückte Zellproliferation durch das Verhindern der Transition von der G0/1 in die S-Phase bei jedoch geringerer Aktivität der Caspasen 3/7. Anders als nach Inhibition von PI3K/mTOR durch NVP-BEZ235 führte der Einsatz von Rapamycin-Derivaten erst 24 Stunden nach Behandlung der Zellen zu einer Aktivierung von ERK1/2. Inhibition von MEK1/2 mittels U0126 induzierte eine Aktivierung von Akt, nicht jedoch von mTOR-Substraten wie S6K1. Nur eine Kombination von U0126 und NVP-BEZ235 reduzierte in allen untersuchten Zelllinien das Zellwachstum um 100%.

Fazit. Der PI3K-/Akt-/mTOR-Signalweg hat therapeutisches Potenzial im UC. Jedoch muss zusätzlich zu mTORC1 auch PI3K und in Abhängigkeit des Mutationsstatus der Zellen auch der MAPK-Signalweg inaktiviert werden, um Zellwachstum effizient zu verhindern.

V 3.2

Dosisabhängige Wirkung von Sorafenib auf MAPK-Signalweg und Apoptose in Harnblasenkarzinomzelllinien

Knievel J, Niegisch G, Schulz WA

Forschungslabor Urologische Klinik, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf

Einleitung. Die zielgerichtete Krebstherapie mit kleinmolekularen Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren stellt eine vielversprechende Alternative für die Behandlung des Harnblasenkarzinoms dar. Der Multikinase-Inhibitor Sorafenib hemmt den MAPK-Signalweg über die Kinase RAF sowie die Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR, PDGFR und cKIT. Weiterhin hat Sorafenib einen Einfluss auf die Apoptose über Mitglieder der Bcl-Familie. Wir haben den Effekt von Sorafenib auf verschiedene Harnblasenkarzinomzelllinien im Vergleich mit normalen Uroepithelzellen untersucht.

Material und Methoden. Die Expression und Aktivität der potenziellen Angriffspunkte von Sorafenib wurde mittels qPCR und Western Blot in Harnblasenkarzinomzelllinien und normalen Uroepithelzellen analysiert. Die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Sorafenib auf die Zellen wurde mit Vitalitäts- und Apoptose-Assays (Promega) sowie FACS gemessen.

Ergebnisse. Die mRNAs von VEGFR1/2, PDGFR und cKIT waren in 17 verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien und 8 normalen Uroepithelzellkulturen nur gering oder gar nicht exprimiert. Die Aktivität des MAP-Kinase-Signalweges war durch Sorafenib teilweise eingeschränkt. Die Kinasen ERK1 und 2 zeigten eine verringerte Aktivität, während die Phosphorylierung des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors ELK keine Unterschiede zwischen Sorafenib-behandelten und -unbehandelten Zellen aufwies. Dagegen wurde das anti-apoptotische Protein Mcl-1 durch Sorafenib in allen Zelllinien herunter reguliert. In 8 ausgewählten Tumorzelllinien wirkte Sorafenib

bei niedrigen Konzentrationen proliferationshemmend, während höhere Konzentrationen zur Apoptose führten. Sehr niedrige Konzentrationen (bis 1 µM) verstärkten die Proliferation. Die IC₅₀ lag bei 5 bis 10 µM. Normale Uroepithelzellen zeigten schon bei geringeren Konzentrationen (0,5 bis 1 µM) deutliche Vitalitätsverluste und gesteigerte Apoptose. Kombinationen mit SAHA, einem Histon-Deacetylase-Inhibitor, verstärkten die Wirkung von Sorafenib.

Fazit. Auf Grund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse an Zelllinien ist die Verwendung von Sorafenib im Harnblasenkarzinom kritisch zu bedenken. Viele Zielmoleküle von Sorafenib sind in Harnblasenkarzinomzelllinien nur schwach exprimiert bzw. aktiv; am konsistentesten war die Wirkung auf Mcl-1. Jedoch könnten Kombinationen mit anderen zielgerichteten Medikamenten die Sensitivität und Spezifität für Tumorzellen erhöhen.

V 3.3

Regulation der Apoptose durch mTOR-Inhibition bei Harnblasenkarzinomen und HNSCC

Wulff S¹, Zeughan M¹, Thode B¹, Wollmann B², Pries R², Wollenberg B², Jochem D¹, Kausch I¹

¹ Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck

² Klinik für HNO, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck

Einleitung. Harnblasenkarzinome und Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) sind bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Tumorstadien durch extrem schlechte Prognosen charakterisiert. Bei malignen Tumoren ist das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose gestört; es kommt zum unkontrollierten Zellwachstum und zu einer Fehlregulation der Apoptose. mTOR („mammalian target of rapamycin“) spielt bei der Biologie von malignen Zellen eine wichtige Rolle wie beispielsweise bei der Herabregulation des Zellzyklus, der Inaktivierung der Apoptosemaschinerie und der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Deshalb stellt die Inhibition von mTOR eine interessante Vorgehensweise bei der Behandlung von Harnblasenkarzinomen und HNSCC dar.

Material und Methoden. Verschiedene Harnblasenkarzinom- (T24 und RT4) und HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13) wurden in vitro analysiert. mTOR wurde durch Temsirolimus oder sequenzspezifische siRNAs inhibiert. MTT-Assays, Zell-Zyklus Analysen mittels Durchflusszytometrie, Immunohistochemie und Apoptose Arrays wurden durchgeführt.

Ergebnisse. Nach mTOR-Inhibition mit Temsirolimus wurde der Zelltod bei den Harnblasenkarzinom- und HNSCC-Zellen ausgelöst. Wir konnten hierbei zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden. Die Inhibition von mTOR durch Temsirolimus induzierte Apoptose und führte zu einem G₀/G₁-Zellzyklusarrest. Die Inhibition von mTOR durch sequenzspezifische siRNAs zeigte diese Effekte hingegen nicht. Durch die Anwendung von Apoptosearrays auf Proteinebene konnten wir zeigen, dass sich die Apoptoseinduktionswege bei Harnblasenkarzinomen und HNSCC unterscheiden. Darüber hinaus führte die Temsirolimus-Behandlung zu einer deutlichen Verminderung der Zellproliferation.

Fazit. Zum einen konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibition von mTOR durch Temsirolimus Apoptose induziert wird und zum anderen, dass sich die Wege der Apoptoseinduktion bei unterschiedlichen Tumorentitäten unterscheiden. Die Induktion der Apoptose und Zellzyklus-Arrest traten nur nach der mTOR-Inhibition mit Temsirolimus, nicht aber mit siRNAs auf. Somit stellt die mTOR-Inhibition mit Temsirolimus sowohl für Harnblasenkarzinome als auch für HNSCC eine vielversprechende klinische Behandlungsmöglichkeit dar, die molekularen Mechanismen müssen jedoch weiterhin entschlüsselt werden.

V 3.4

Additive Effekte von Sorafenib und Sunitinib in Kombination mit Rottlerin beim Nierenzellkarzinom

Jöckel MW, Schneider E, Khageh-Hosseini S, Roos F, Hampel C, Thüroff JW, Brenner W

Urologische Klinik, Universitätsmedizin, Mainz

Einleitung. Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist ein Tumor mit äußerst schlechter Prognose. Die Target-Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) stellt eine neue Therapieoption mit großem Potenzial für das NZK dar. Wir untersuchten die Effekte der TKI Sorafenib und Sunitinib auf die Tumormigration in vitro. Bei anderen Tumorentitäten verstärkt Rottlerin, ein PKCdelta-Hemmstoff, den antiproliferativen Effekt von Sorafenib. Unsere Analysen umfassten eine kombinierte Applikation von Rottlerin mit Sorafenib und Sunitinib.

Methoden. Vier Zelllinien des klarzelligem NZK wurden mit Sorafenib und Sunitinib alleine (5 µM), beziehungsweise in Kombination mit Rottlerin (10 µM) behandelt. Die Proliferation wurde mit Hilfe der BrdU-Aufnahme, die Apoptose durch einen Nachweis von Caspase 3 im Western Blot quantifiziert. Die Expression von PKCdelta wurde im Zellkern, sowie im Zytoplasma und membranassoziiert untersucht. Die Aktivität von PKCdelta wurde durch Detektion von phosphorylierter PKCdelta im Western Blot gemessen.

Ergebnisse. Die Zellproliferation wurde zwar durch Sorafenib und Rottlerin, jedoch nicht durch Sunitinib gehemmt. Die Kombination von Sorafenib und Rottlerin zeigte einen additiven Effekt auf die Proliferation. Rottlerin und Sunitinib induzierten Apoptose. Bei Sorafenib war dieser Effekt nicht nachweisbar, obwohl Sorafenib in Kombination mit Rottlerin zu einer deutlich stärkeren Induktion der Apoptose führte, als dies bei Rottlerin alleine zu beobachten war. Alle Substanzen verstärkten die Expression von PKCdelta im Zellkern. Die Expression von PKCdelta in der membranassoziierten Fraktion wurde von keiner der Substanzen alleine beeinflusst, obwohl die Kombination von Sunitinib und Rottlerin diesen Effekt zeigte. Anlog hierzu zeigte sich eine verminderte Expression der aktiven Form von PKCdelta nach Behandlung mit einer Kombination aus Sunitinib und Rottlerin.

Fazit. Die gemeinsame Anwendung von Sorafenib und Rottlerin zeigte einen additiven Effekt auf Proliferation und Apoptose der NZK-Zelllinien. Durch diese Kombination konnte auch sowohl die Expression als auch die Aktivität von PKCdelta am deutlichsten vermindert werden. Die Therapie des NZK mit Sorafenib könnte durch eine zusätzliche Gabe von Rottlerin verbessert werden.

V 3.5

Tyrosinkinase-Inhibitoren bei NZK – Wolf im Schafspelz?

Khageh-Hosseini S¹, Blaheta R², Roos F¹, Thüroff JW¹, Brenner W¹

¹ Urologie, Universitätsmedizin, Mainz

² Urologie, Uniklinik, Frankfurt a. M.

Die Behandlung eines Nierenzellkarzinoms (NZK) ist in den vergangenen Jahren meist nur von palliativer Natur gewesen. Das NZK ist gegen Bestrahlung und Chemotherapie weitgehend resistent, so dass eine neue Art der Behandlung gefunden werden musste. Die Entwicklung der TKI, welche in den Zellstoffwechsel der Tumorzellen und versorgenden Blutgefäße eingreifen und diese inhibieren, gilt als vielversprechende Innovation im Kampf gegen das NZK. Tatsächlich wird die Lebenserwartung der Patienten um ca. 3 Monate gesteigert, in denen es jedoch häufig zu starken Nebenwirkungen kommt. Diese führen meist zu einer Verringerung der Dosis und schließlich zu einer erneuten Tumormigration. Diese erneute Progression wurde bislang auf eine ungeklärte Resistenzentwicklung zurückgeführt.

Wir konnten nachweisen, dass die Gabe der TKIs Sorafenib und Sunitinib in geringen Konzentrationen paradoxer Weise zu einer erhöhten Zellaktivität, -progression und -migration in verschiedenen NZK-Zelllinien führte. Die Zellaktivitäts (MTT) und Zellproliferationstests (BrdU-Einbau) wurden mit 7 verschiedenen NZK-Zelllinien durchgeführt. Die 7 NZK-Zelllinien wurden für 24 h mit Sorafenib bzw. Sunitinib zwischen 0,1 µM und 100 µM behandelt. Anschließend wurden die Zellaktivität (MTT) und Zellproliferation (BrdU-Einbau) quantifiziert. Dabei zeigte sich im Konzentrationsbereich zwischen

0,1 µM und 5 µM für beide TKI's eine Zellaktivitäts- und -proliferationssteigerung von bis zu 40%. Mit zwei der zuvor verwendeten Zelllinien (A 498 und 786-O) wurde zudem in einer Boyden-Kammer die Zellmigration unter Sorafenib und Sunitinib-Behandlung untersucht. Die Zelllinie A 498 eine Zellmigrationssteigerung von ca. 20% bei einer Konzentration von 1 µM Sorafenib bzw. eine Steigerung von ca. 30% bei einer Konzentration von 5 µM Sunitinib. Die Zellen der Linie 786-O zeigten unter 1 µM Sunitinib eine um 50% gesteigerte Migrationsfähigkeit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch einen „human phospho kinase antibody array“ konnte der Aktivitätsstatus verschiedener für die Tumorgenese wichtiger Signalkinasen nachgewiesen werden. Hier zeigte sich unter Sorafenib-Behandlung, in den Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 µM, eine deutliche Steigerung der Aktivität u. a. in den Molekülen Akt, STAT 2, 4, 5 und 6 sowie dem für die Zellmigration wichtigen Molekül Src.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die erneute Tumormigration im Patienten nach erfolgreicher TKI-Behandlung nicht nur eine Folge einer Resistenzentwicklung ist, sondern vielleicht auch die Folge einer zu geringen Serumkonzentration, welche zu einer ungewollten Aktivierung der Tumorzellen führt.

V 3.6

Proteinmuster im Serum von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom zur Vorhersage des Therapieansprechens auf Tyrosinkinase-Inhibitoren

Walter M¹, Kröger N¹, Steiner T¹, Szendroi A², Romics I², Wunderlich H¹, von Eggeling F³

¹ Klinik für Urologie, Universitätskliniken, Jena

² Klinik für Urologie, Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn

³ Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätskliniken, Jena

Hintergrund. Der Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms (mNZK) hat sich in den letzten 4 Jahren etabliert. Jedoch zeigen primäres klinisches Ansprechen, Resistenzentwicklung sowie Nebenwirkungsgrad enorme Unterschiede bei der Betrachtung des einzelnen Patienten. Bislang existieren keine prädiktiven Biomarker für die TKI-Therapie. Ziel unserer Studie ist es deshalb, Proteinmuster im Serum zu finden, die mit einem therapeutischen Benefit der mit TKIs behandelten Patienten korrelieren.

Material und Methoden. In die fortlaufende Studie waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung 49 Patienten mit TKI-Therapie (23 Sorafenib, 26 Sunitinib) involviert. Das primäre Ansprechen und der weitere klinische Verlauf waren in allen Fällen bekannt, sodass das Ansprechen nach 3 Monaten sowie der klinische Benefit bzw. progrediente Verlauf nach 9–12 Monaten als Untersuchungskriterien gewählt wurden. Prätherapeutische Serumproben wurden auf den ProteinChip® Arrays Q10, CM10 und IMAC30 mit der Surface-enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF MS) analysiert. Die bioinformatische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Fuzzy C-means Clusteralgorithmus und dem Relevanzindex nach Kiendl. Des Weiteren wurde die differenzielle 2D-Gelelektrophorese (DIGE) zur Identifikation unterschiedlich exprimierter Proteine durchgeführt.

Ergebnisse. Bereits in prätherapeutischen Serumproben konnten für beide TKIs spezifische Proteinmuster für das primäre klinische Ansprechen und die Entwicklung von Therapieresistenzen definiert werden. Die biostatistisch ermittelten Proteinmassen zeigen eine hohe Relevanz für die Vorhersage des Therapieverlaufs.

Fazit. Basierend auf unseren Ergebnissen scheint es möglich, den Therapieerfolg/-misserfolg von Sorafenib und Sunitinib bereits durch die Untersuchung von prätherapeutischen Serumproben vorherzusagen. In der andauernden Studie müssen Kandidatenproteine identifiziert werden, um deren Rolle bei Therapieansprechen und Resistenzentwicklung zu analysieren.

V 3.7

Genomische Analyse klonaler Tumorphyspopulations von kastrationsresistenten Prostatakarcinomen

Ruiz C¹, Robeson AC², Oeggerli M¹, Schneider S¹, Zellweger T³, Bachmann A⁴, Mousseis S², Barrett MT², Bubendorf L¹

¹ Institut für Pathologie, Universitätsspital, Basel, Schweiz

² Pharmaceutical Genomics Division, Translational Genomics Research Institute, Scottsdale, USA

³ Abteilung für Urologie, St. Claraspital, Basel, Schweiz

⁴ Departement Urologie, Universitätsspital, Basel, Schweiz

Einleitung. Intratumorale Heterogenität ist ein bekanntes Phänomen beim fortgeschrittenen Prostatakarcinom. Diese Heterogenität basiert oft auf der Koexistenz und die Entwicklung von verschiedenen klonalen Populationen innerhalb eines Tumors. Ziel dieser Studie war die Untersuchung der genomischen klonalen Evolution von Prostatakarcinomen und ihrer Entwicklung zur Hormonresistenz.

Methoden. Prostatakarcinome, darunter mehrere Proben von demselben Patienten (2000, 2007, 2008), wurden auf ihre Multiklonalität untersucht. Die verschiedenen klonalen Populationen wurden mittels Flow-Sorting aufgrund ihres unterschiedlichen DNA-Gehaltes getrennt und mit Hilfe hochauflösender Array-CGH und Next-Generation-Sequencing genomisch charakterisiert. Die verschiedenen Populationen wurden außerdem mit klassischen pathologischen Methoden (FISH, IHC, H&E) untersucht.

Ergebnisse. Wir zeigen zum ersten Mal die genomische Evolution von verschiedenen klonalen Populationen eines hormonsensitiven Prostatakarcinoms und ihre Entwicklung zur Kastrationsresistenz. Dieser Prozess wird sowohl von bekannten genomischen Aberrationen, wie zum Beispiel die Genamplifikation des Androgen-Rezeptors, als auch von bisher im Prostatakarcinom unbeschriebenen Aberrationen begleitet. Weiterhin zeigen wir, dass die verabreichten Therapien (Orchiektomie und medikamentöse Hormonablation) nur zur Auslöschung der aneuploiden Populationen führten. Interessanterweise waren die diploiden Populationen in der Lage auf den Therapiedruck zu reagieren, zusätzliche genomische Aberrationen zu akquirieren und sich im Tumor durchzusetzen.

Diskussion. Die Anwendung von hochauflösendem genomischem Profiling verschiedener klonaler Populationen von Prostatakarcinomen führt zu neuen Einblicken in die klonale Evolution der zu untersuchenden Tumoren. Die Detektion von populationsspezifischen Aberrationen ist von fundamentaler Bedeutung. Die genomisch ablesbare unterschiedliche therapeutische Vulnerabilität der individuellen Klone könnte die Therapieentscheidungen leiten.

Vortragssitzung IV: Molekulare Zusammenhänge von Krankheitsbildern und Therapien

Moderation: G. Unteregger, Homburg/M. Burger, Regensburg

V 4.1

Induktion proteomischer und epigenetischer Alterationen durch die Interaktion von tumorassozierten Fibroblasten (TAF) und Harnblasentumorzellen

Enkelmann A¹, Heinzelmann J¹, Walter M¹, v.Eggeling F², Wunderlich H¹, Junker K¹

¹ Klinik für Urologie, Universitätsklinikum, Jena

² Core Unit Chip Application, Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum, Jena

Einleitung. Das Zusammenspiel von Tumorzellen und Tumorstroma ist von wesentlicher Bedeutung für Tumorentstehung und -progression. Für einige Modelltumoren (z. B. Mammakarzinom) konnte gezeigt werden, dass die sog. tumorassozierten Fibroblasten (TAF) die Tumorgenese unterstützen und dabei spezifischen Veränderungen unterliegen. Ziel dieser Studie ist es, die Induktion einer veränderten Protein- und miRNA-Expression nach der

Co-Kultur von TAF bzw. Normalgewebe-Fibroblasten und Harnblasentumorzellen zu untersuchen.

Material und Methoden. Aus primären Harnblasentumorgeweben wurden Zellkulturen angefertigt, aus denen Fibroblasten mittels EDTA-Behandlung isoliert werden konnten. Als Kontrollzellen wurden Fibroblasten aus Vorhautproben und gesundem Harnblasengewebe isoliert und kultiviert. Die Fibroblasten wurden mittels SELDI-TOF-MS und microRNA Microarray vergleichend zu den TAF charakterisiert. Weiterhin wurden Co-Kulturen von Fibroblasten und Tumorzellen in einem Transwell-Assay System über 48 h kultiviert. Anschließend wurden beide Zelltypen proteomisch mittels SELDI-TOF-MS hinsichtlich der Induktion einer veränderten Proteinexpression analysiert. Darüber hinaus wurde die Induktion einer veränderten microRNA-Expression durch Fibroblasten in den Tumorzellen untersucht.

Ergebnisse. Es ist gelungen, TAF aus Primärzellkulturen sowie Fibroblasten aus Harnblasengewebe und Vorhautgewebe zu gewinnen und zu kultivieren. Mittels SELDI-TOF-MS konnte die Induktion einer veränderten Proteinexpression sowohl in TAF als auch in Tumorzellen durch die Kultivierung mit dem jeweils anderen Zelltyp gezeigt werden. Microarray-Analysen zeigen die Induktion einer veränderten miRNA-Expression in Tumorzellen durch die Interaktion mit Fibroblasten.

Fazit. TAF können aus Primärtumorgeweben und Tumorzellkulturen isoliert und damit unabhängig vom Tumorgewebe analysiert werden. Die Charakterisierung zeigt spezifische Protein- und microRNA-Expressionsmuster in den TAF im Vergleich zu Normalgewebe-Fibroblasten. Co-Kultur-Versuche belegen die Interaktion von Fibroblasten und Tumorzellen im Gewebe sowohl auf proteomischer als auch auf epigenetischer Ebene. Die Identifizierung spezifischer Proteine und microRNAs und ihre funktionelle Charakterisierung werden dazu führen, die durch Tumor-Stroma-Interaktion aktivierten Signalkaskaden zu definieren und ihre Bedeutung in der Tumorgenese des Harnblasenkarzinoms zu verstehen.

V 4.2

mir-221 overexpression in prostate carcinoma cells regulates the interferon-gamma signalling cascade

Kneitz B¹, Krebs M¹, Kalogirou C¹, Kneitz S², Riedmiller H¹, Spahn M¹

¹ Department of Urology and Paediatric Urology, University Medical School, University of Würzburg

² Microarray Core Unit, IZKF (Interdisciplinary Center for Clinical Research), University of Würzburg

Aberrant expression of mir-221 in different types of cancer has been reported. We previously examined the expression of mir-221 in a high-risk prostate carcinoma cohort and demonstrated that mir-221 expression is progressively reduced in aggressive prostate cancer. We further could show that strong downregulation of mir-221 is associated with metastatic PCa and clinical recurrence. However up to now it is only poorly understood, how mir-221 downregulation might be involved in tumor initiation or tumor progression. Therefore we transiently transfected two androgen insensitive PCa cell lines (PC-3 and DU-145) with precursor mir-221 (pre-mir-221). We confirmed that transfection with pre-mir-221 leads to efficient overexpression of mature mir-221. The mir-221 overexpressing PCa cells showed decreased cell viability and proliferation rates or increased apoptosis. To analyze the molecular changes in these cells we performed microarray experiments on mRNA isolated from PC-3 cells transfected with pre-mir-221. Hierarchical clustering revealed a list of genes with elevated expression levels. Many of them are members of the IFN γ signalling cascade (e. g. Stat-1 and IRF1). The upregulation of some of those genes was confirmed by RT-PCR and Western Blotting. Treatment of PCa cells with IFN γ recapitulated some of the aspects of the molecular and phenotypical changes observed in pre-mir-221 transfected PCa cells. However pre-mir-221 transfection did not lead to the upregulation of IFN γ expression nor could it increase the IFN γ levels found in conditioned media from treated cells. Moreover we observed a sensitisation of PCa cells for IFN γ mediated growth inhibition in mir-221 overexpressing cells.

From these experiments we conclude that mir-221 overexpression in PCa cells leads to anti-proliferative and pro-apoptotic effects. Moreover we could

show that mir-221 overexpression induces the IFN γ signalling cascade without an endogenously induced IFN γ expression. Our results further demonstrate that mir-221 expression sensitizes PCa cells to the anti-proliferative effects of IFN γ , suggesting that mir-221 could have therapeutic potential by multiplying the effect of IFN γ in prostate cancer.

V 4.3

miR-96 reguliert Apoptose im Prostatakarzinom durch Inhibierung von FOXO1

Schäfer A^{1,2,3}, Jung M¹, Stephan C¹, Erbersdobler A⁴, Yousef GM⁵, Jung K^{1,2}

¹ Klinik für Urologie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin

² Berliner Forschungsinstitut für Urologie

³ Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität, Berlin

⁴ Universitätsklinikum, Rostock

⁵ St. Michael's Hospital, Toronto, Kanada

Ziel. miR-96 ist im Prostatakarzinom im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert. Zudem ist eine hohe Expression der miR-96 ein unabhängiger prognostischer Marker für ein biochemisches Rezidiv. In dieser Studie wurde die Funktion der miR-96 in der Kanzerogenese des Prostatakarzinoms untersucht.

Methoden. Prostatakrebszelllinien (LNCaP) wurden mit synthetischer premiR-96, anti-miR-96-Inhibitor oder einer Kontroll-miRNA transient transfiziert und der Phänotyp analysiert. Mögliche Targetgene wurden in silico identifiziert. Eine Bindung der miR-96 an die 3'-UTR von FOXO1 wurde mittels eines Luciferasereporterassays nachgewiesen. Die Protein- und mRNA-Expression von FOXO1 nach miR-96-Transfektion wurde mittels Western Blot und Real Time quantitativer PCR verifiziert.

Ergebnisse. LNCaP-Zellen zeigen nach Überexpression der miR-96 eine erhöhte Proliferationsrate. Diese konnte auf eine verminderte Fraktion apoptotischer Zellen in den transfizierten Kulturen zurückgeführt werden. Durch in silico Target-Prädiktion und Gene Ontology (GO) Analysen wurde FOXO1 als ein mögliches pro-apoptisches Target identifiziert. FOXO1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Expression pro-apoptischer Gene, wie Bax und FasL reguliert. Die Aktivität von FOXO1 wird durch den PI3K-AKT-Signaltransduktionsweg gesteuert. Im Luciferasereporterassay konnte die Bindung der miR-96 an zwei Bindungsstellen in der FOXO1-3-untranslatierten Region nachgewiesen werden. Diese Bindung ging einher mit einer erniedrigten Expression von FOXO1 auf mRNA- und Proteinebene.

Fazit. In dieser Studie konnte erstmals die anti-apoptische Funktion der miR-96 im Prostatakarzinom dargestellt werden. Die onkogene Relevanz der miRNA lässt sich durch ihre Regulation des FOXO1-Transkriptionsfaktors erklären. Globale mRNA- und Protein-Expressionsanalysen könnten zur Identifikation weiterer anti-apoptischer miR-96-Targetgene dienen.

V 4.4

Untersuchungen zur Funktion des C-terminal verkürzten Androgenrezeptors Q640X in humanen PCa-Zellen

Streicher W, Zengerling F, Schütz SV, Schrader AJ, Schrader M, Cronauer MV
Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Ulm

Die Entstehung hormonrefraktärer Prostatakarzinom (PCa-)Zellen während einer Hormonablationstherapie stellt die Hauptursache für den Tumorprogress und die hohe Mortalitätsrate des fortgeschrittenen PCa dar. Ein kürzlich beschriebener Mechanismus welcher es kastrationsresistenten PCa-Zellen erlaubt in Abwesenheit androgener Stimuli zu überleben, ist die Expression C-terminal-verkürzter Androgenrezeptor(AR-)Isoformen. C-terminal verkürzte AR entstehen in PCa-Zellen entweder durch alternatives Splicing oder durch Punktmutationen welche zu einem vorzeitigen Stop-Codon führen. Erste experimentelle Daten deuten darauf hin dass C-terminal verkürzte AR bis zu einer Länge von 725 Aminosäuren (AS) die Fähigkeit besitzen auch ohne Bindung von Androgen in den Kern zu wandern, um dort Gene zu aktivieren. Da solchen AR der überwiegende Teil der Ligandenbindedomäne (LBD) fehlt können sie weder Androgene noch Antiandrogene binden. Somit

bleibt bei diesen, auch als AR-LBD bezeichneten Rezeptoren, jede Art der Androgenablation wirkungslos.

Erste Reporterexperimente mit ARQ640X einem 640 AS langen AR-LBD zeigen, dass dieser im Gegensatz zum AR-Wildtyp (ARwt) in der Lage ist, verschiedene androgenabhängige Reportergenkonstrukte in Abwesenheit von Androgenen zu aktivieren (Reportergenaktivität ARQ640X/Leervektor: 3XARE=424x; Probasin=1,2x, PSA=9x; MMTV=81x; PEM=74x). Der Aktivierung von Reporter genen durch ARQ640X geht, wie mittels Mammalian-Two-Hybrid-(M2H-)Assay gezeigt, eine Dimerisierung von ARQ640X-Molekülen voraus. In Abwesenheit von Androgenen führt eine Cotransfektion von ARQ640X und ARwt zu einer deutlichen Verstärkung ARQ640X-generierter Signale in einem PSA-Reporterassay, (Reportergenaktivität ARQ640X/Leervektor=1; ARwt/Leervektor=0,3; (ARwt+ARQ640X)/Leervektor=3,8). M2H-Versuche zeigen zudem, dass ARwt mit ARQ640X unter androgenfreien Bedingungen heterodimerisieren kann. Des Weiteren ist die Kernlokalisation eines GFP-markierten Wildtyp-AR bei co-exprimiertem ARQ640X deutlich erhöht (Nukleäre Lokalisation GFP-ARwt: in Abwesenheit ARQ640X=25%; in Anwesenheit von ARQ640X=43%).

Vorliegende Experimente zeigen, dass ARQ640X sowohl alleine als auch im Verbund mit ARwt in der Lage ist, androgenabhängige Gene in Abwesenheit von Hormon zu aktivieren. Die funktionelle Charakterisierung weiterer AR-LBD könnte neue Wege aufzeigen wie kastrationsresistente AR-positive PCa-Zellen unter androgenablatierten Bedingungen überleben können.

V 4.5

Epigenetische Inaktivierung des potenziellen Tumorsuppressors RASSF10 in der Prostatakarzinogenese

Dansranjavin T, Wagenlehner F, Steger K, Sturm K, Weidner W,
Dammann R, Schagdarsurengin U

Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie,
Justus-Liebig-Universität, Gießen

Einleitung. Die Mitglieder der RASSF-Familie können aufgrund einer RAS-Assoziations-Domäne eine Effektorfunktion für das häufig tumorassoziierte RAS-Protein ausüben. In dieser Studie wurde die epigenetische Inaktivierung und die tumorsuppressive Funktion des RASSF10-Gens in Prostatakarzinom-(PCa-)Zelllinien und Primärgeweben untersucht.

Methoden. Die Methylierung des RASSF10-Genpromotors wurde mittels einer Bisulfit-Pyrosequenzierung in PCa-Zelllinien DU145, LNCAP, 22RV1 sowie Primärtumoren von insgesamt 83 PCa-Patienten quantitativ analysiert. Bei 52 PCa-Patienten konnten zusätzlich auch Gewebeproben aus angrenzenden tumorfreien Arealen untersucht werden. In PCa-Zelllinien wurde der Effekt von 5-Azadeoxycytidin (5-AZA) und Trichostatin A (TSA) einzeln und in Kombination auf die mRNA-Expression des RASSF10-Gens untersucht. Mit Hilfe des Expressionsvektors pCMV-Tag1 wurde der Effekt von RASSF10-Überexpression auf Koloniebildung, Apoptose (TUNEL) und Zellzyklus (Propidiumjodid-Einbau) analysiert.

Ergebnisse. RASSF10 war in LNCAP Zellen mit durchschnittlich 77% am stärksten methyliert (20,7% in 22RV1, 6,14% in DU145). Alle 3 Zelllinien wiesen keine RASSF10 mRNA Expression auf. In LNCAP führte erst eine kombinierte Behandlung mit TSA und 5-AZA zu einer deutlichen Reexpression von RASSF10. Eine Überexpression des RASSF10 mit pCMV-Tag1 führte im Vergleich zum Leervektor zu einer Abnahme der Koloniezahl von 101±13 auf 56±16 (p=0,018) und zu einer 2,2-fachen Zunahme der Apoptoserate. In 11 von 52 gepaarten Proben (21%) war die RASSF10-Methylierungsrate in PCa im Vergleich zum korrespondierenden tumorfreien Gewebe erhöht. Umgekehrt war die RASSF10-Methylierungsrate nur in 3 von 52 Fällen (5,6%) in den tumorfreien Arealen im Vergleich zu PCa erhöht. In Primärtumoren zeigte sich außerdem eine altersassoziierte Methylierungsverstärkung des RASSF10-Gens. In der Altersgruppe 52 bis 66 Jahre (n=28) war in einer Probe (3,5%) und in der Altersgruppe 67 bis 78 Jahre (n=55) in 13 Proben (23,6%) RASSF10-Genpromotor stark methyliert (p<0,001).

Fazit. Deutliche Abnahme der Koloniebildung und Steigerung der Apoptoserate als Folge der RASSF10-Überexpression, deuten auf eine tumorsuppressive Rolle des RASSF10 in PCa. In PCa-Gewebeproben und in kor-

respondierenden tumorfreien Gewebeproben konnte eine mit maligner Transformation einhergehende Methylierungssteigerung des RASSF10-Genpromotors nachgewiesen werden. Zusätzlich scheint eine altersabhängige Zunahme der RASSF10 Methylierung in der Prostatakarzinogenese eine wichtige Rolle zu spielen.

V 4.6

Fibulin-5 is differentially expressed in invasive growing prostate carcinoma cells and modulates tumor cell migration

Jung V, Hach CE, Saar M, Kamradt J, Stöckle M, Unteregger G
Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universität des Saarlandes,
Homburg/Saar

Introduction. Fibulin-5 is an extracellular matrix protein playing an important in normal embryonic development. An altered fibulin-5 expression seems also to be associated with tumor formation by modulating proliferation and motility. Downregulation of fibulin-5 has been reported in several malignancies including prostate cancer (PCa). We investigated fibulin-5 expression in cell lines and in primary PCa samples using our 3D invasion model. Modulation of migration of PCa cell lines by fibulin-5 was studied using membranes coated with NH-terminal peptides.

Materials and methods. Fresh biopsies from 12 radical prostatectomies were subjected to our 3D-invasion model and expression of fibulin-5 was assessed by qRT-PCR in non-invading and invasive growing tumor cells. To investigate the role of fibulin-5 on tumor cell migration, Fluoroblock® membranes were coated with short peptides of fibulin-5. PC-3, LNCaP, DU-145 and A549 (a lung cancer cell line serving as a positive control) cells were applied onto these inserts and migration was quantified by fluorescence reading after calcein staining.

Results. No fibulin-5 signals were detected by qRT-PCR and immunostaining in LNCaP and PC-3 cell lines. In contrast, expression in DU-145 was comparable to positive control A 549. Invasive growing primary prostate tumor cells exhibit in all cases a lower fibulin-5 expression compared to the non-invasive cells. 3/12 invasive growing samples did not to express fibulin-5. After coating with fibulin-5 peptides migration varied between the different cell lines. Whereas migration of LNCaP and PC-3 was markedly decreased, no effects on migration were seen for DU-145 and A 549.

Conclusion. Our results confirmed the downregulation of fibulin-5 in prostate cancer samples. The reduced fibulin-5 expression in all invasive tumor cells underlines the assumption that fibulin-5 downregulation is associated with the invasive behaviour. Modification of the membranes by fibulin-5 coating demonstrates that tumor cell motility can be regulated by the cellular environment. Thus, the expression profile of fibulin-5 may reflect the invasive potential of individual prostate tumor cells.

V 4.7

Kumulative Analyse risikoassoziierter "common variants" mit dem Prostatakarzinom

Rinckleb AE^{1,2}, Luedeke M^{1,2}, Surowy HM², Vogel W^{1,2},
Hoegel J², Herkommer K³, Kote-Jaray Z⁴, Eeles RA⁴, Kubisch C²,
Schrader M¹, Maier C^{1,2}

¹ Klinik für Urologie, Ulm

² Institut für Humangenetik, Universität Ulm

³ Urologische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München

⁴ Institute of Cancer Research, Sutton, UK

Einleitung. Die komplexe Ätiologie des Prostatakarzinoms macht die Risikoprädiktion zu einem schwierigen Thema. Es ist bekannt, dass das Erkrankungsrisiko neben Alter, Rasse, Lebenswandel und Umwelteinflüssen auch von einer positiven Familiengeschichte beeinflusst wird. Kaum bekannt sind allerdings die genetischen Grundlagen, speziell mutmaßliche Hochrisikogene wie BRCA2, die familiäre Häufungen durch Mendel'sche Erbgänge erklären ließen. Genomweite Assoziationsstudien haben 25 signifikant mit dem Prostatakarzinom assoziierte Einzelbasenvarianten („single nucleotide polymorphisms“, SNP) hervorgebracht. Die Varianten sind überwiegend sehr

häufig („common variants“) in der Population zu finden und leisten einzeln betrachtet jeweils nur einen geringen Risikobeitrag, könnten aber kumulativ ausgewertet durchaus zur Risikoprädiktion beitragen.

Methodik. Die Genotypisierung der 25 SNPs im Ulmer Kollektiv (379 familiäre und 329 sporadische PCa-Fälle; 509 Kontrollen, davon 214 altersangepasste und 295 aus der Population, m/f), erfolgte im Rahmen des internationalen PRACTICAL-Konsortiums. Für die Ermittlung des kumulativen relativen Risikos über logistische Regression wurden diejenigen SNPs herangezogen, die einzeln betrachtet eine Assoziation mit der PCa-Erkrankung zeigten ($p=0,1$).

Ergebnisse. Von den 25 genotypisierten SNPs wurden 12 in die kumulative Analyse miteinbezogen [allelische Odds Ratios (OR): 1,16–1,59; p-Werte: 0,0003–0,0875]. Daraus ergab sich eine theoretisch mögliche Anzahl an Risikoallelen (RAs) pro Individuum von 0 bis 24. In der Kontrollgruppe betrug sie im Median 10, was als Standardwert der Population festgelegt wurde (entspricht OR=1). Dem gegenübergestellt zeigten Individuen mit mehr/weniger als 10 RAs in dieser Studie ein signifikant höheres/niedrigeres relatives Risiko für PCa (11/12 RAs: OR=1,86; $p=0,0005$; 13/14 RAs: OR=3,04; $p<0,0001$; =15 RAs: OR=5,44; $p=0,0003$; =7 RAs: OR=0,44; $p=0,0034$). Die Gruppe von Individuen mit =15 RAs beinhaltet etwa 4,7 % der Fälle, 1,7 % der Populationskontrollen und 0,5 % der altersangepassten Kontrollen.

Fazit. Die kumulative Analyse der „common variants“ erfolgte vollkommen modellfrei. Dennoch konnte eine Untergruppe an Individuen identifiziert werden, die eine PCa-Suszeptibilität in der Größenordnung einer Hochrisikokomutation tragen (OR=5,44). Eingehendere Untersuchungen zu funktionellen Zusammenhängen einzelner SNPs könnten dazu beitragen, tatsächliche Interaktionen zu charakterisieren und eine verbesserte Risikomodellierung zu ermöglichen. Zukünftige prospektive Studien werden sich damit befassen, inwieweit dieses System, auch unter Einbezug weiterer Faktoren wie Familienhistorie und Biomarkern, zur Risikoprädiktion geeignet ist.

Hier steht eine Anzeige.

