

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss von Dihydrotestosteron auf die Expression  
des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 (PAR2)  
in stromalen und epithelialen  
Zelllinien der Prostata**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2009

vorgelegt von Herrn Robert Würdinger  
geboren am 16.11.1979 in Bad Laer

---

---

***IN LIEBE MEINER MUTTER***

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität des Saarlandes am

\_\_\_\_\_

---

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

Referent: Herr Univ.-Prof. Dr. Gunther Wennemuth

1. Koreferent:

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
	<i>Summary</i>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Pathologische Veränderungen der Prostata</b>	<b>5</b>
2.1.1	Anatomie und zonale Aufgliederung der Prostata	5
2.1.2	Präkanzerosen	7
2.1.2.1	Prostatische Intraepitheliale Neoplasie (PIN )	7
2.1.2.2	Atypische Adenomatöse Hyperplasie (AAH )	7
2.1.3	Das Prostatakarzinom	8
2.1.4	Ätiologie des Prostatakarzinoms	9
2.1.5	Benigne Prostatahyperplasie (BPH)	11
2.1.6	Ätiologie der benignen Prostatahyperplasie (BPH)	11
2.1.7	Androgenabhängigkeit prostatischer Veränderungen	12
<b>2.2</b>	<b>Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR)</b>	<b>15</b>
2.2.1	Allgemeines	15
2.2.2	Die Familie der Proteinase aktivierten Rezeptoren (PAR1-4)	19
2.2.3	Der Proteinase aktivierte Rezeptor-2 (PAR2)	20
2.2.4	Die Signaltransduktion des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 (PAR2)	21
<b>2.3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>25</b>
3.1.1	Allgemeine Geräte	25
3.1.2	PC-Programme	26
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	26
3.1.4	Puffer und Lösungen	27
3.1.5	Verwendete Antikörper	28
3.1.6	Versuchsmaterial	29
3.1.6.1	Proben für Fluoreszenzfärbungen	29
3.1.6.2	Zelllinien	29
3.1.6.3	Primer	30
3.1.6.4	PAR2-Agonist S9192	32

<b>3.2</b>	<b>Methodik</b>	<b>33</b>
3.2.1	Übersicht	33
3.2.2	Fluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten	34
3.2.2.1	Durchführung	34
3.2.3	Zellkultur für PCR-Verfahren	35
3.2.3.1	Anzucht der Prostatazellen	35
3.2.3.2	Stimulation der Prostatazellen	36
3.2.4	Total-RNA-Präparation aus Prostatazellen mit Aufreinigung der Präparation von genomischer DNA	38
3.2.4.1	RNA-Präparation	38
3.2.4.2	DNase-Verdau	39
3.2.4.3	Fällung der RNA	40
3.2.5	Herstellung der cDNA ; Reverse Transkription	40
3.2.6	Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (RT- PCR)	42
3.2.6.1	Durchführung der semi-quantitativen RT-PCR	43
3.2.7	Real Time-PCR (QPCR)	46
3.2.7.1	Durchführung der QPCR	47
3.2.8	Fluoreszenzphotometrische Kalziummessungen mit Fura-2	51
3.2.8.1	Eigenschaften des Farbstoffes	51
3.2.8.2	Prinzip der Zwei-Wellenlängenmessung	52
3.2.8.3	Versuchsaufbau und Messtechniken	52
3.2.8.4	Kalibrierung des Gerätes	53
3.2.9	Vorbereitung und Durchführung Fluoreszenzphotometrischer Messungen mit Fura-2	54
3.2.9.1	Kultivierung der Prostatazellen für Küvetten-und Einzelzellmessungen	54
3.2.9.2	Beladung der Prostatazellen	55
3.2.9.3	Fluoreszenzphotometrische Messungen an Prostatazellen	56
3.2.10	Proliferationsassay durch [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Inkorporation	57
3.2.10.1	Durchführung des Proliferationsassays	57
3.2.11	Statistik	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Fluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten</b>	<b>59</b>
4.1.1	Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im murinen Dünndarmpräparat (Positivkontrolle)	59
4.1.2	Immunreaktion des PAR2-Antikörpers in humanem Prostatagewebe	62
4.1.2.1	PAR2 in humanem Prostatagewebe	62
4.1.2.2	PAR2 in pathologisch verändertem Prostatagewebe	63

---

<b>4.2</b>	<b>Semi-quantitative RT-PCR</b>	<b>68</b>
4.2.1	Quantifizierung mit HGAPDH	68
4.2.1.1	Quantifizierung am Beispiel von PC3	68
4.2.2	Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern	70
4.2.2.1	Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie PC3	70
4.2.2.2	Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie LNCaP	72
4.2.2.3	Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie DU145	74
4.2.2.4	Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie hPCPs	76
<b>4.3</b>	<b>Real Time-PCR (QPCR)</b>	<b>78</b>
4.3.1	QPCR mit PAR2-Primern	79
4.3.1.1	Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie PC3	79
4.3.1.2	Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie LNCaP	81
4.3.1.3	Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie DU145	83
4.3.1.4	Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie hPCPs	85
<b>4.4</b>	<b>Fluoreszenzphotometrische Messungen mit Fura-2</b>	<b>88</b>
4.4.1	Küvettenmessungen mit dem physiologischen PAR2-Agonisten Trypsin	88
4.4.1.1	[Ca <sup>+</sup> ]-Antwort nach Trypsinstimulation von epithelialen Prostatakarzinomzellen PC3	89
4.4.1.2	[Ca <sup>+</sup> ]-Antwort nach Trypsinstimulation von epithelialen Prostatakarzinomzellen LNCaP	90
4.4.1.3	[Ca <sup>+</sup> ]-Antwort nach Trypsinstimulation von epithelialen Prostatakarzinomzellen DU145	91
4.4.1.4	[Ca <sup>+</sup> ]-Antwort nach Trypsinstimulation von stromalen BPH-Zellen (hPCPs)	92
4.4.2	Einzelzellmessung mit dem synthetischen PAR2-Agonisten S9192	94
4.4.2.1	S9192-Antwort in hPCPs-Zellen	95
<b>4.5</b>	<b>Proliferationsassay durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>127</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Zonale Aufgliederung der Prostata. _____	6
Abbildung 2. Mechanismen der PAR-Aktivierung. Modifiziert: (Macfarlane et al. 2001).__	16
Abbildung 3. Signaltransduktion von PAR2. Modifiziert: (Steinhoff et al. 2005). _____	21
Abbildung 4. Schematische Darstellung der Anzucht und Stimulation der untersuchten Zelllinien für die PCR-Verfahren. _____	37
Abbildung 5. Verlauf einer Schmelzkurve am Beispiel von HGAPDH. _____	48
Abbildung 6. Verlauf einer Amplifikationskurve am Beispiel von HGAPDH. _____	49
Abbildung 7. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers in Paraffindünnschnitten eines murinen Dünndarms (Positivkontrolle). _____	60
Abbildung 8. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt eines murinen Dünndarms (Positivkontrolle). _____	61
Abbildung 9. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt einer normalen humanen Prostata. _____	62
Abbildung 10. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt einer atypischen adenomatösen Hyperplasie der Prostata (AAH). _____	64
Abbildung 11. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt eines Prostatakarzinoms (PCa). _____	65
Abbildung 12. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt einer benignen Prostatahyperplasie (BPH). _____	66
Abbildung 13. Quantifizierung der epihelialen Zelllinie PC3 (Größe 300bp). _____	68

---

Abbildung 14. Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie PC3. _____	70
Abbildung 15. Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie LNCaP. _____	72
Abbildung 17. Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie DU145. _____	74
Abbildung 17. Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie hPCPs. _____	76
Abbildung 18. QPCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie PC3. _____	79
Abbildung 19. QPCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie LNCaP. _____	81
Abbildung 20. QPCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie DU145. _____	83
Abbildung 21. QPCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie hPCPs. _____	85
Abbildung 22. $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin in PC3-Zellen. _____	89
Abbildung 23. $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin in LNCaP-Zellen. _____	90
Abbildung 24. $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin in DU145-Zellen. _____	91
Abbildung 25. $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin in hPCPs-Zellen. _____	92
Abbildung 26. Einzelzellmessung mit S9192 in hPCPs-Zellen. _____	95
Abbildung 27. Proliferationsassay durch $[^3H]$ -Thymidin-Inkorporation in hPCPs-Zellen. _____	96



---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1. Aktivierende Proteinasen, hemmenden Proteinasen, aktivierende Peptide und Lokalisation von PAR.</b>	<b>18</b>
<b>Tabelle 2. Übersicht der in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Erarbeitung der Fragestellung.</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 3. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers in den untersuchten Geweben der Prostata.</b>	<b>67</b>
<b>Tabelle 4. Prozentuale Expressionsänderungen von PAR2 in der Zelllinie PC3.</b>	<b>71</b>
<b>Tabelle 5. Prozentuale Expressionsänderungen von PAR2 in der Zelllinie LNCaP.</b>	<b>73</b>
<b>Tabelle 6. Prozentuale Expressionsänderungen von PAR2 in der Zelllinie DU145.</b>	<b>75</b>
<b>Tabelle 7. Prozentuale Expressionsänderungen von PAR2 in der Zelllinie hPCPs.</b>	<b>77</b>
<b>Tabelle 8. Relative Expression von PAR2 in PC3-Zellen.</b>	<b>80</b>
<b>Tabelle 9. Zusammenfassung der relativen Expression von PAR2 in LNCaP-Zellen.</b>	<b>82</b>
<b>Tabelle 10. Zusammenfassung der relativen Expression von PAR2 in DU145-Zellen.</b>	<b>84</b>
<b>Tabelle 11. Zusammenfassung der relativen Expression von PAR2 in hPCPs-Zellen.</b>	<b>87</b>
<b>Tabelle 12. Prozentualer Anstieg der Zellproliferation durch Stimulation mit dem PAR2- Agonisten S9192 in hPCPs-Zellen.</b>	<b>98</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Type Culture Collection, Manassas,VA
BSA	Bovines Serum Albumin
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
cDNA	copyDNA
ch	Charcoal;(Aktivkohle)
CY3	Carbocyanin 3
Ci	Curie
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> -Anstieg	intrazellulärer Kalziumanstieg
DHT	Dihydrotestosteron
DIC	Differential Interference Contrast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
Fura-2-AM	Fura-2-AcetoxyMethyl-Ester
GPCRs	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGAPDH	humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HKG	Housekeeping Gen
HHBSS	HEPES-Buffered Hanks Balanced Salt Solution
HPSF	High Purity Salt Free
MMPs	Metallomatrixproteine

---

MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
PAR	Proteinase aktivierte Rezeptoren
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIN	Prostatische Intraepitheliale Neoplasie
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
P/S/A	Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TGF- $\beta$	Tumor growth factor beta
TMPRSS2	Transmembrane Protease, Serine 2
IGF	Insuline like growth factor
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
QPCR	Quantitative (real time) PCR
WHO	World Health Organisation

# 1 Zusammenfassung

## **Einfluss von Dihydrotestosteron auf die Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 (PAR2) in stromalen und epithelialen Zelllinien der Prostata**

**Autor: Robert Würdinger**

Pathologische Veränderungen der Prostata, wie die benigne Prostatahyperplasie und das Prostatakarzinom, zählen zu den häufigsten Erkrankungen des alternden Mannes. Beiden Erkrankungen werden hormonabhängige Wachstumseigenschaften zugeschrieben. Das während der Pubertät für das Wachstum der Prostata zuständige Hormon ist Dihydrotestosteron. Es wird unter Mitwirken der 5 $\alpha$ -Reduktase aus der Vorstufe Testosteron gebildet. Die genannten proliferierenden Erkrankungen der Prostata, entwickeln sich in einem Lebensabschnitt des Mannes, der durch einen Abfall des Serumspiegels an Androgenen gekennzeichnet ist. Neben endogenen und exogenen Einflüssen, spielen endokrine Faktoren, wie Steroid- und Peptidhormone, sowie lokal in den Zellen wirkende Faktoren, wie beispielsweise Insulin-like growth factor (IGF) und Fibroblast growth factor (FGF), eine wichtige Rolle bei der Proliferation der Prostata des alternden Mannes. Die Pathogenese der benignen Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms werden heute als multifaktorielles Geschehen verstanden. Außerdem wurden in humanem Prostatagewebe Rezeptoren nachgewiesen, die zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. Ihnen werden eine Mitbeteiligung bei Entzündungen, Zellwachstum, Metastasierung und auch der Karzinogenese zugeschrieben. Diese Rezeptoren werden als Proteinase-aktivierte Rezeptoren bezeichnet. Bisher konnten insgesamt vier Subtypen (PAR1,-2,-3,-4) beschrieben werden.

Ziel dieser Arbeit war durch immunhistochemische Färbungen die topografische Lokalisation des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 (PAR2) in pathologisch verändertem Gewebe der Prostata darzustellen. Weiterhin wurde in Zelllinien des Prostatakarzinoms (PC3, DU145 und LNCaP) und der Benigen

Prostatahyperplasie (hPCPs) mittels PCR untersucht, ob die Expression des Rezeptors durch Dihydrotestosteron beeinflussbar ist.

In dieser Arbeit konnten deutliche Unterschiede in der Lokalisation von PAR2 in pathologisch veränderten Geweben der Prostata detektiert werden. Neben der bekannten Expression von PAR2 in den untersuchten Prostatakarzinomzelllinien konnte auch in der stromalen Prostatazelllinie hPCPs das Vorkommen von PAR2 nachgewiesen werden. Außerdem wurde für die stromale Zelllinie hPCPs eine durch Dihydrotestosteron beeinflusste Expression von PAR2 gezeigt, während der Rezeptor in den epithelialen Zelllinien des Prostatakarzinoms von diesem Hormon unabhängig exprimiert vorlag. Subphysiologische Konzentrationen von Dihydrotestosteron induzierten eine Überexpression von PAR2 in der stromalen Zelllinie. Die funktionelle Aktivität von PAR2 leitete eine Proliferation der stromalen hPCPs-Zellen ein. Die Ergebnisse zeigten, dass das Expressionsverhalten und die Funktion von PAR2 zusammengenommen einen wichtigen Hinweis auf die PAR2-vermittelte Regulation mitogener Prozesse im *in vitro*-Modell der benignen Prostatahyperplasie liefern.

## Summary

**The effect of dihydrotestosterone in the expression of proteinase activated receptor-2 (PAR2) in stromal and epithelial cell lines of the prostate**

**Author: Robert Würdinger**

Pathological changes of the prostate like benign prostate hyperplasia and prostate carcinoma are considered to be one of the most common diseases of the aging male. These diseases are attributed to growth properties that are considered to be hormone dependent. The hormone, responsible for the growth of the prostate during puberty is called dihydrotestosterone. It is produced by the effect of 5 $\alpha$ -reductase oxydating testosterone. Proliferative changes of the prostate like benign prostate hyperplasia and prostate cancer are detected at an age at which a decrease in the serum androgen level can be observed. Therefore other factors beside androgens could have a contributing role in the pathological growth of the prostate. The pathogenesis of benign prostate hyperplasia and prostate cancer is thought to be multifactorial. Endogenous and exogenous factors have a pivotal role in the proliferation of the prostate. Moreover, endocrinol factors such as steroid-and peptide hormones, and locally acting factors as insulin-like growth factor (IGF) and fibroblast growth factor (FGF), exhibit similar important roles. Cell lines linked to prostate carcinoma expose receptors that belong to the family of G-protein coupled receptors (GPCRs) and have a contributing role in inflammation, cell growth, metastasis and carcinogenesis. These receptors are called proteinase activated receptors (PAR). Until now four members (PAR1,-2,-3 and -4) have been described.

The aim of this study was to describe the topographical localization of proteinase activated receptor-2 (PAR2) in pathologically affected tissues of the prostate utilizing immunohistochemical staining. Furthermore an androgen dependent (dihydrotestosterone) expression of PAR2 in cell lines of prostate carcinoma (PC3, DU145, LNCaP) and benign prostate hyperplasia (hPCPs) was examined via PCR.

In the current study, a major difference in the localization of PAR2 in various pathological tissue of the prostate has been revealed. Beside the already proven expression of PAR2 in epithelial prostate carcinoma cell lines (PC3, DU145 and LNCaP), the existence of this receptor also was detected in the human stromal prostate cell line hPCPs. Moreover, a dihydrotestosterone dependent expression of the receptor was shown in stromal cell line hPCPs, while on the other hand the expression seemed to be independent of this hormone in epithelial cell lines. Subphysiological concentrations of dihydrotestosterone caused higher expression of PAR2 in hPCPs-cells. The functional activity of PAR2 induced a proliferation of these cells. The results showed that PAR2 can be considered as an important factor playing a role in PAR2-mediated regulation of mitogenic processes in benign prostate hyperplasia.

## 2 Einleitung

### 2.1 Pathologische Veränderungen der Prostata

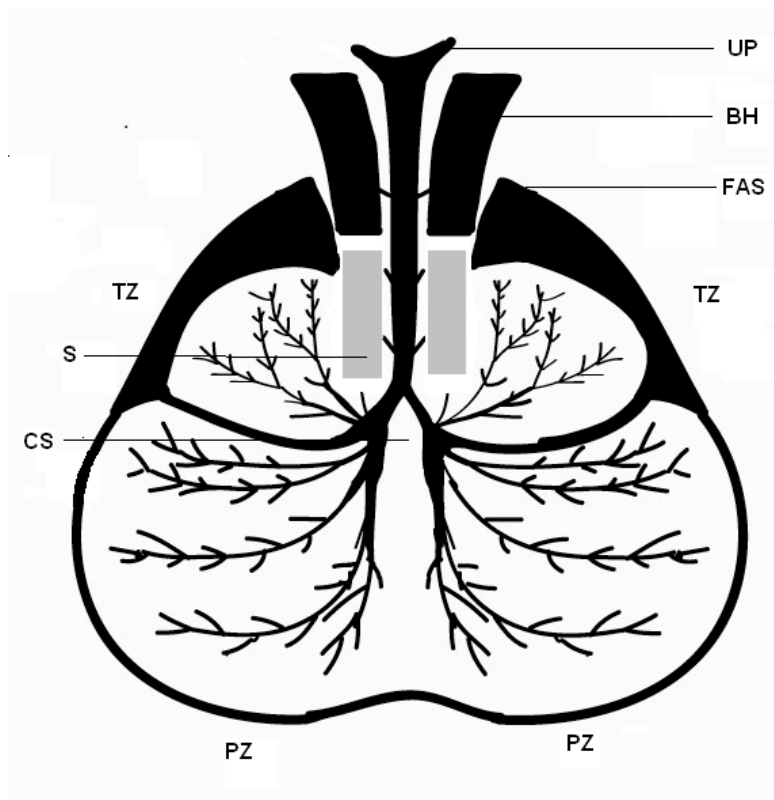
#### 2.1.1 Anatomie und zonale Aufgliederung der Prostata

Die Prostata ist die größte akzessorische Geschlechtsdrüse des Mannes. In ihr wird ein saures Sekret (pH- Wert 6,4) produziert, das zusammen mit in den Nebenhoden gespeicherten Spermatozoen und dem Sekret der Samenblase (*Vesicula seminalis*), als männliches Ejakulat ausgestoßen wird. Das Prostatasekret enthält zahlreiche Enzyme, wie z.B. Phosphatase, aber auch Cholesterin und Zink, die für die Beweglichkeit der Spermatozoen von großer Bedeutung sind (*Aumüller and Riva 1992*). Bei einer Größe von ca. 2 cm Durchmesser liegt das Organ subperitoneal unterhalb der Harnblase und umschließt dort den Harnleiter. Es ist aus epithelialelem und stromalem Gewebe zusammengesetzt. Das epitheliale Gewebe besteht aus ca. 30 bis 50 tubuloalveolären Drüsen, die mit ihren Ausführungsgängen in den *Colliculus seminalis* der Samenblase münden. Das stromale Gewebe der Prostata ist hauptsächlich aus glatter Muskulatur und Bindegewebe mit retikulären, elastischen und kollagenen Fasern aufgebaut. Die Drüsenzini sind von einer dünnen Bindegewebsschicht umgeben, die glatte Muskulatur enthält. Die Prostata ist von einer derben Bindegewebkapsel, die ebenfalls Muskulatur enthält, umgeben. Diese Kapsel bildet die äußere Organbegrenzung und wird vor allem im apikalen Bereich und an der Kapselbasis von zahlreichen Nervenfasern durchdrungen (*Drenckhahn D. 1994*).

Makroskopisch wird die Prostata in vier Zonen untergliedert: Eine „zentrale Zone“, eine „Transitionszone“, eine „periphere bzw. äußere Zone“ und eine „nichtglandulären Zone“ (*McNeal 1965*). Die zentrale Zone liegt dorsokranial, hat eine konische Form und umgibt den *Ductus ejaculatorius*. Die dort befindlichen Drüsen sind sehr weitlumig und machen ein Viertel der gesamten Drüsenmasse aus. Die Transitionszone liegt mediolateral der Urethra und beinhaltet englumige Drüsen, umgeben von straffem Stromagewebe. Die periphere bzw. äußere Zone umgibt die zentrale Zone und beinhaltet lockeres Drüsen- und



Stromagewebe. In diesen Zonen spielen die Tumorinvasion und Tumordinfiltration eine wichtige Rolle. Außerdem sind sie von großer Relevanz in der Unterscheidung von gutartigen und bösartigen Veränderungen des Prostatagewebes (McNeal 1969; McNeal 1978). Die zwei bekanntesten pathologischen Veränderungen der Prostata nehmen von unterschiedlichen Lokalisationen her ihren Ursprung. Benigne Prostatahyperplasien (BPH), die zu den gutartigen Veränderungen gehören, befinden sich vornehmlich in der Transitionszone und Prostatakarzinome nehmen ihren Ursprung meistens in der peripheren Zone. Ein sehr geringer Teil der Karzinome lässt sich auch in der Transitionszone (Transitionskarzinome) oder in der zentralen Zone lokalisieren (McNeal 1969; Greene et al. 1995).



**Abbildung 1. Zonale Aufgliederung der Prostata.** (McNeal 1965; Aumüller 1989).  
**PZ:** Periphere Zone; **TZ:** Transitionszone; **zentrale Zone** von **PZ** umgeben; **UP:** urethrales prostatishes Segment; **BH:** Blasen Hals; **FAS:** fibromuskuläres aglanduläres anteriores Stroma; **S:** präprostatrischer Sphinkter; **CS:** Colliculus seminalis.

## 2.1.2 Präkanzerosen

### 2.1.2.1 *Prostatische Intraepitheliale Neoplasie (PIN)*

Bostwick und Brawer führten 1987 den Begriff der PIN ein. Die PIN beschreibt hyperproliferative Abschnitte der Prostata, in denen anaplastische Zellkerne des Drüsenepithels zu finden sind. Diese Areale wurden in der peripheren Zone der Prostata beobachtet (*Bostwick and Brawer 1987*). Eine Vorstufe der PIN könnte die proliferative, inflammatorische Atrophie sein, die häufig bei rezidivierenden Entzündungen der Prostata vorkommt (*De Marzo et al. 1999*). Anfänglich wurde die PIN in drei Grade aufgeteilt (PIN I, II, und III) (*Bostwick and Brawer 1987*). Die Einteilung in zwei Grade erfolgte 1987 durch die *American Cancer Society Konsensus Konferenz* in die Low-grade PIN (LG-PIN) und die High-grade PIN (HG-PIN) (*Drago J.R. 1987*). Der Low-grade PIN wird kein Entartungsrisiko zugesprochen. Sie gilt als harmloser Befund und wird von Pathologen kaum noch verwandt, wohingegen die HG-PIN als obligate Präkanzerose angesehen wird (*Epstein et al. 1995*). Unklar ist, ob das Prostatakarzinom aus einer HG-PIN entsteht oder ob eine HG-PIN in einem Prostatakarzinom assoziiert vorliegt (*Paul R. 2001*).

Histomorphologische Kriterien einer HG-PIN sind:

- Veränderungen der Epithelarchitektur mit verschiedenen kribriformen, glandulären, azinären und tubulären Wachstumsmustern
- Kernvergrößerungen
- Prominente, meist exzentrisch gelegene Nukleolen
- Intakte Basalzellschicht (*Bostwick et al. 1993a*)

### 2.1.2.2 *Atypische Adenomatöse Hyperplasie (AAH)*

Atypisch glanduläre Proliferationen der Prostata wurden sowohl in Karzinomen, aber auch in benignen Hyperplasien der Prostata beobachtet. Die atypischen Läsionen, die in der anterozentralen Zone (Transitionszone) der Prostata liegen

und dort glanduläre Karzinome fingieren, werden AAH genannt. Kennzeichen der AAH ist die Proliferation neu gebildeter kleiner Azini ohne Kernaplasie. Ein Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom konnte jedoch nicht so eindeutig festgestellt werden wie bei der PIN (*Bostwick et al. 1993b*). Im Gegensatz zur PIN findet sich die AAH hauptsächlich in der Transitionszone und der zentralen Zone der Prostata. Aus diesem Grund wird die AAH als Präkanzerose für die selten vorkommenden Transitionskarzinome vermutet (*Helpap and Riede 1995*).

### **2.1.3 Das Prostatakarzinom**

Das Prostatakarzinom ist mit ca. 3 % die zweithäufigste Todesursache des Mannes durch Karzinome nach dem 50. Lebensjahr weltweit. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts in Berlin erkranken allein in Deutschland jährlich fast 49.000 Männer an einem Prostatakarzinom (*RKI 2006*). Die Häufigkeit klinisch diagnostizierter Prostatakarzinome ist wesentlich niedriger, als die Inzidenz latenter Karzinome, die erst im Rahmen von Autopsien bei Patienten festgestellt werden (*RKI 2006*). Einige Patienten versterben innerhalb weniger Monate nach Karzinomdiagnose, weil eine sehr schnelle Tumorprogression besteht, während andere Patienten nur eine sehr langsame unbemerkte Tumorgenese aufweisen und letztlich an tumorunabhängigen Ursachen versterben. Dieses Phänomen der Mortalität und Inzidenz der Prostatakarzinome zeigt die großen Schwierigkeiten, Prognosen über diesen Tumor zu stellen. Die ungewisse Prognose des Krankheitsverlaufs zeigt wie wichtig es ist die Pathogenese des Prostatakarzinoms intensiver zu erforschen und neben altbewährten Methoden der Prostatakarzinomdiagnostik (PSA-Wert, Sonographie und Digitale Rektale Untersuchung) weitere Parameter zu finden, die eine Aussage über den Status der Erkrankung erlauben und eine geeignete individuelle Therapieform ermöglichen.

Das Prostatakarzinom nimmt seinen Ursprung im Drüsengewebe. Die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) wird als *Carcinoma in situ* der Prostata betrachtet (*Epstein et al. 1995*). Wird in Folge einer hochgradigen intraepithelialen Neoplasie (HG-PIN) die Basalmembran durchbrochen, spricht

man von einem invasiven Karzinom, das sich meist multifokal manifestiert. Ein Fortschreiten der Invasion führt zum Befall der Prostatakapsel und anschließend zur Infiltration der Samenblasen. Über den lymphogenen Weg können die Zellen des Primärtumors streuen und zu Metastasen in benachbarten Lymphknotenstationen führen. Eine Streuung der Tumorzellen über die Blutbahn kann in entfernten Körperregionen Fernmetastasen entstehen lassen. Häufig ist dabei der Knochen befallen (*Bostwick and Brawer 1987*).

#### **2.1.4 Ätiologie des Prostatakarzinoms**

Die Ursachen für die Entstehung von Prostatakarzinomen sind noch weithin unverstanden. Diverse Studien beschäftigten sich in der Vergangenheit mit dem Einfluss exogener und endogener Risikofaktoren auf die Entstehung von Prostatakarzinomen. Dabei wurden Lebensgewohnheiten und Ernährungsverhalten (endogen) und Umwelteinflüsse (exogen) berücksichtigt. Zu den etablierten Risikofaktoren des Prostatakarzinoms zählen bis heute das Alter des Mannes, die familiäre Häufung und die ethnische Herkunft. Es besteht eine Korrelation zwischen der Inzidenz des Prostatakarzinoms und dem Lebensalter. Die Häufigkeit dieser Erkrankung steigt im Laufe des Lebens an, wobei weniger als 1% der Karzinome bei Männern unter 50 Jahren diagnostiziert werden konnten (*Bratt et al. 1998*). Der Altersgipfel für Malignome liegt zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr. Studien konnten zeigen, dass auf eine Anzahl von 100.000 Männern allein in Deutschland jährlich 45 Männer im Lebensalter zwischen 45 und 49 Jahren erkranken. In der Gruppe der 50-54 Jährigen erkranken 170, und in der Gruppe der 70-75 Jährigen 5130 Männer an einem Prostatakarzinom (*Dhom 1992*).

Eine positive Familienanamnese trägt ebenfalls zu einem erhöhten Risiko für Prostatakrebs bei (*Waterbor and Bueschen 1995*). Schätzungen zufolge treten ca. 10-15% aller Prostatakarzinome familiär auf. Mindestens ein Verwandter ersten Grades ist dann ebenfalls am Prostatakarzinom erkrankt. Das Risiko direkter Verwandter mit positiver Familienanamnese ebenfalls an einem Karzinom zu

erkranken, ist viermal höher als bei Männern ohne positiver Familienanamnese (*Waterbor and Bueschen 1995; Villers et al. 1997*).

Für die ethnische Herkunft fällt im internationalen Vergleich auf, dass die Inzidenz bei Amerikanern und Kanadiern am höchsten liegt, wohingegen Asiaten deutlich weniger an Prostatakarzinomen erkranken. Im Vergleich zu Japanern lag die Inzidenzrate bei Afroamerikanern etwa 30 mal höher. Ähnliche Unterschiede weisen die Mortalitätsraten auf (*Wingo et al. 1995*). Obwohl die weltweiten Unterschiede für die Inzidenz und Mortalität noch weitgehend unverstanden sind, werden verschiedene Faktoren dafür verantwortlich gemacht.

Neben ethnologischen Faktoren spielen auch exogene Einflüsse für die Karzinomentstehung eine bedeutende Rolle. Der vermutlich wichtigste exogene Einfluss scheint die Ernährung zu sein. Fettarme und ballaststoffreiche Nahrung soll der Karzinomentstehung entgegenwirken können, wohingegen sich das Karzinomrisiko bei der Aufnahme gesättigter tierischer Fetter drastisch erhöht. Eine Erhöhung des Serumandrogenspiegels bei ballaststoffarmer und fettreicher Nahrung wird dabei als Ursache angesehen (*Key 1995*). Nicht nur durch Nahrung erhöhte Serumandrogenspiegel, sondern auch ethnische Unterschiede in den Hormonkonzentrationen sind von großer Wichtigkeit. Wu und Mitarbeiter fanden 1995 in einer Fall-Kohorten-Studie eine Ursache in der unterschiedlichen Aktivität der 5-alpha-Reduktase der ethnischen Bevölkerungsgruppen. Es ist das Enzym, das Testosteron zu DHT (Dihydrotestosteron) umwandelt. Das Verhältnis von DHT zu Testosteron war bei Afroamerikanern am höchsten und bei Asiaten am niedrigsten (*Wu et al. 1995*). Den Einfluss von Androgenen auf das Wachstum von Prostatakarzinomen beobachteten Huggins und Hodges schon in den 40er Jahren und setzten dies in der Therapie des Malignoms um (s.u.) (*Huggins and Hodges 2002*).

### **2.1.5 Benigne Prostatahyperplasie (BPH)**

Histopathologische Veränderungen des stromalen Prostatagewebes und damit die gutartige Vergrößerung im Sinne einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) zählen neben dem Prostatakarzinom zu den häufigsten Erkrankungen des alternden Mannes. Zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr lässt sich bei ca. 90% der Männer eine gutartige Vergrößerung der Prostata diagnostizieren (*Berry et al. 1984*). Eines der Hauptsymptome ist die sogenannte „untere Harntraktsymptomatik“ (LUTS; *lower urinary tract symptom*) (*Madersbacher et al. 1998*). Ab dem 30. Lebensjahr etwa bilden sich im Bereich der Transitionszone neue Drüsenkomplexe, die den Hauptteil der BPH darstellen und zu Miktionsbeschwerden führen können (*McNeal 1978*). Histologisch zeigen sich benigne Knoten, die nicht mehr als 2% der Gesamtmasse des Organs umfassen. Diese Knoten können sowohl aus Stromagewebe (*fibroblastische, mesenchymale Hyperplasie*), als auch aus Drüsengewebe (*glanduläre Hyperplasie*) aufgebaut sein. Meist liegt eine Hyperplasie beider Gewebekompartimente vor (*Oelke 2007*). Es wurde spekuliert, ob es sich bei dieser gutartigen Erkrankung um eine echte Hyperplasie mit Zunahme der Zellzahl, oder um eine Verminderung der Apoptose handelt (*Bartsch et al. 1979*). Shapiro und Mitarbeiter konnten beispielsweise feststellen, dass sich das Verhältnis stromaler Zellen zu epithelialen Zellen im hyperplastischen Gewebe kaum verändert und somit nicht nur auf stromaler Ebene eine Fehlregulation des Wachstums ursächlich war (*Shapiro et al. 1997*).

### **2.1.6 Ätiologie der benignen Prostatahyperplasie (BPH)**

Die Ätiologie der benignen Prostatahyperplasie ähnelt sehr der des Prostatakarzinoms. Neben endogenen und exogenen Faktoren spielen auch hier ethnologische und genetische Faktoren eine wichtige Rolle (*Ekman 1989*). Da bis heute noch Uneinigkeit über die Entstehung von benignen Prostatahyperplasien herrscht, werden diese Erkrankungen, und auch die Entstehung der Prostatakarzinome, als multifaktorielle Ereignisse beschrieben (*Marcelli and Cunningham 1999*).

Es wurde bereits eine große Anzahl von Hypothesen etabliert, die die Entstehung gutartiger Vergrößerungen der Prostata hinterfragen. Einige dieser Theorien sollen hier aufgeführt, jedoch nicht weiter erläutert werden:

1. Dihydrotestosteron-Hypothese (*Krieg et al. 1993*)
2. Östrogen-Hypothese (*Huggins 1967*)
3. Embryonales Wiedererwachen („embryonic reawakening“) (*McNeal 1978*)
4. Hypothese der Fehlregulation von Wachstumsfaktoren (*Tenniswood 1986*)

All diese Hypothesen sind Ansätze für das Verständnis der Pathophysiologie der BPH und liefern ebenso Ansätze für die Therapie dieser Erkrankung. Die Pathogenese der BPH wird sehr eng mit Veränderungen des Androgenhaushaltes des alternden Mannes in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund beschäftigte sich diese Arbeit ausschließlich mit der am meisten etablierten Hypothese, der DHT-Hypothese, und versucht Ansätze für die Therapie auf molekularbiologischer Ebene zu finden.

### **2.1.7 Androgenabhängigkeit prostaticher Veränderungen**

Hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens zählt die Prostata zu dem Geschlechtsorgan mit der höchsten Androgenabhängigkeit. Neben der anatomischen Einteilung gibt es eine weitere Einteilung, die das Organ in Anlehnung ihrer androgenen Stimulierbarkeit in eine steroidhormonabhängige periurethrale Innenzone (Östrogene) und Außenzone (Testosteron) aufteilt. Androgene sind für die Entwicklung, Funktion und das Wachstum der Prostata elementar (*Aumüller 1989*). Eine Verminderung des Steroidhormonspiegels durch Kastration führt zu einer Atrophie des Organs, eine anschließende Erhöhung der Steroidserumkonzentration durch Substitution kann eine normalisierte Funktion des Organs einleiten (*Huggins and Hodges 2002*). Ein intakter Androgenhaushalt ist ein Hauptfaktor für die Entwicklung einer gesunden Prostata. Prostatiche Veränderungen, wie die benigne Prostatahyperplasie und auch das Prostatakarzinom, entwickeln sich in einem

Lebensalter, das durch eine Senkung des Serumandrogenspiegels gekennzeichnet ist (*Rumpold H. 2002*). Es wird angenommen, dass neben Androgenen weitere Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Interaktionen und auch Rezeptoren an der Pathogenese der Prostata beteiligt sein können (*Vermeulen 1991; Hermann and Berger 1999; Marcelli and Cunningham 1999*).

Die Androgenabhängigkeit des Prostatakarzinoms wurde 1941 zuerst von Huggins und Hodges erkannt, indem nach beidseitiger Hodenentfernung bei betroffenen Patienten ein Rückgang des Tumorwachstums festgestellt werden konnte. Seit dem gilt die Ausschaltung der endokrinen Hodenfunktion als Goldstandard für die palliative Behandlung des fortgeschrittenen metastasierenden Prostatakarzinoms (*Huggins and Hodges 2002*). Bei fehlender testikulärer Funktion ist keine Karzinogenese zu beobachten. Ross und auch Altwein unterstützen unabhängig voneinander ebenfalls diese These, indem sie feststellten, dass Männer, bei denen vor Eintritt in die Pubertät die Hoden entfernt wurden, kein Prostatakarzinom entstehen konnte (*Ross et al. 1983; Altwein et al. 1997*). Spätere Untersuchungen ergaben, dass Prostatakarzinome in eine androgenabhängige und eine androgenunabhängige Form unterschieden werden konnten (*Cabrespine et al. 2004*).

Auch für die Entstehung einer BPH wurden hormonelle Ungleichgewichte, allerdings zwischen Östrogenen und Androgenen, diskutiert. Denn vor allem im Alter kommt es zu einem erhöhten Östrogenspiegel, aufgrund der Verschiebung der Ratio von Androgenen/Östrogenen, der auf die Zellen der periurethralen Zone wirken kann. Dort kommen vermehrt Östrogenrezeptoren vor (*Ekman 2000*). Auch wenn nur wenige Östrogenrezeptoren in der Prostata exprimiert werden, scheinen diese in dem Organ für das Stammzellwachstum von Bedeutung zu sein. Weiterhin bewirkt ein erhöhter Östrogenspiegel eine Aktivierung der stromalen Muskelzellen, die wiederum zu einer Proliferation der Bindegewebsfasern führen können (*Zhao et al. 1992*). Steroidhormone fungieren neben Proteinhormonen und Glykoproteinormonen als endokrine Faktoren, die für das Wachstum der Prostata verantwortlich gemacht werden. Neben Ihnen sind auch lokal autokrin und parakrin wirkende Faktoren, wie fibroblast growth factor (FGF), inslin-like growth factor (IGF), epidermal growth factor (EGF) und



indirekt luminal wirkende Faktoren, wie Zink, Kallikreine und auch Prostaglandine am Wachstum und der Differenzierung der Prostata beteiligt (*Hermann et al. 2000*). Es wurden in den letzten Jahrzehnten diverse Hypothesen zur Pathogenese der BPH und auch des PCa postuliert, die auf die Veränderung der sexualsteroidhormonalen Verfügbarkeit basieren. Sehr interessant ist die Testosteron/DHT-Hypothese, die besagt, dass Testosteron und damit sein intrazellulärer Metabolit Dihydrotestosteron (DHT) für die Entwicklung und das Wachstum der Prostata während der Pubertät verantwortlich gemacht wird (*Marcelli and Cunningham 1999*). Testosteron diffundiert als freies Hormon in die Zellen und wird dort durch die 5- $\alpha$ -Reduktase irreversibel in DHT umgewandelt. Das DHT wirkt aufgrund seiner höheren Affinität zum Androgenrezeptor etwa 5-10 mal stärker als Testosteron. Allein die Konzentration von DHT ist etwa um das 5-fache höher als die des Testosterons in dem Organ (*Bartsch et al. 2000*). Als aktiver Metabolit vermag DHT intrazellulär an den Androgenrezeptor zu binden und nach Translokation in den Zellkern die Transkription verschiedener Gene, wie beispielsweise PSA, EGF und Myc, zu induzieren (*Grossmann et al. 2001*). Antiöstrogene und auch antiandrogene Therapieformen zeigten, dass die androgenabhängige Form des Karzinoms und auch die benigne Prostatahyperplasie durch Steroidhormonentzug behandelbar seien. Die Methode führt zu einer Aktivierung des programmierten Zelltods und damit zu einem Untergang des sekretorischen Epithels des Organs (*Breul and Paul 1998*). Die Therapie durch Androgenentzug kann bei Karzinomen dazu führen, dass ein Gefälle zugunsten hormonunabhängig wachsender Zellen entsteht, wodurch ein androgensensitiver Tumor letztlich in einen androgeninsensitiven Tumor übergehen konnte. Dieser Vorgang kann allerdings auch spontan auftreten und ist noch weitgehend unverstanden (*Taplin and Balk 2004*). Therapeutisch werden je nach Schweregrad beider Krankheitsbilder sowohl Medikamente als auch chirurgische Interventionen eingesetzt. Die Chemotherapie wird bei einem Prostatakarzinom kaum angewendet. Vereinzelt konnten mit dieser Therapie Erfolge verzeichnet werden (*Gilligan and Kantoff 2002*). Für die androgenunabhängige Form lässt sich ausschließlich die Entfernung der

Prostata als Therapiealternative in Erwägung ziehen.

Bis heute wurden noch keine Konzepte entwickelt, die die BPH-Entstehung verhindern oder eine bereits vorhandene BPH rückgängig machen können. Für die konservative Therapie der BPH kommt das Medikament Finasterid<sup>®</sup> zum Einsatz und wird bei Symptomen der BPH von der WHO empfohlen. Es ist ein Inhibitor der 5 $\alpha$ -Reduktase (TYPII), die in der Prostata vorkommt, und die Umwandlung von Testosteron zu DHT verhindert, was einem weiteren Wachstum der Prostata entgegenwirken kann (*Bartsch et al. 2000*).

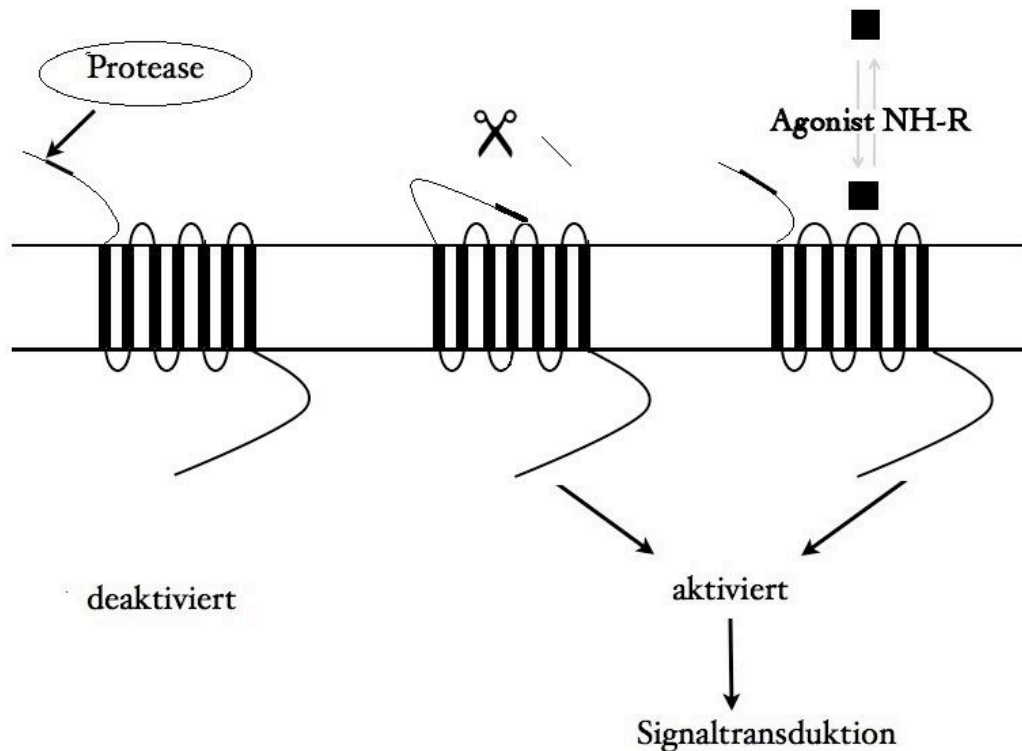
## 2.2 Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR)

### 2.2.1 Allgemeines

Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR) gehören zur Familie der Sieben-Transmembranhelikalen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Bis heute wurden insgesamt vier Proteinase aktivierte Rezeptoren beschrieben. Die Nomenklatur erfolgte in der Reihenfolge ihrer Entdeckung. So wurde der im Jahre 1991 zuerst beschriebene Rezeptor als PAR1 bezeichnet (*Rasmussen et al. 1991; Vu et al. 1991*). Drei weitere Mitglieder konnten in den folgenden Jahren identifiziert werden (PAR2, -3, und -4) (*Nystedt et al. 1994; Nystedt et al. 1995b; Ishihara et al. 1997; Kahn et al. 1998; Xu et al. 1998*).

Proteinase aktivierte Rezeptoren werden extrazellulär an ihrem N-terminalen Ende durch Serin-Proteinasen gespalten, um anschließend durch Selbstaktivierung intrazellulär G-Protein gekoppelte Signaltransduktion vermitteln zu können. Diese enzymatische Aktivierung durch Proteolyse der Rezeptoren ist für alle PAR identisch und für die Familie der GPCR ein völlig neuer Aktivierungsmechanismus. Durch die proteolytische Spaltung entsteht ein neuer N-Terminus (*tethered ligand*), der die Rezeptoren selbst zu aktivieren vermag (*Macfarlane et al. 2001*). Der „neue Ligand“ interagiert intramolekular mit dem 2. extrazellulären Loop des hiesigen Rezeptors und vermittelt anschließend die für die Rezeptoren spezifische Signaltransduktion (*Al-Ani et al.*

1999). Alternativ zur Aktivierung über proteolytische Spaltung können auch spezifische Agonisten eine Signaltransduktion ins Zellinnere vermitteln (Abb.2).



**Abbildung 2. Mechanismen der PAR-Aktivierung. Modifiziert: (Macfarlane et al. 2001).** Proteinasen spalten den Rezeptor extrazellulär am N-Terminus, so dass ein „tethered ligand“ entsteht, der den Rezeptor aktivieren kann. Ebenso können exogen zugefügte synthetische Agonisten eine Aktivierung und damit eine Signaltransduktion nach intrazellulär vermitteln.

Proteinase aktivierte Rezeptoren werden als „Einmalrezeptoren“ bezeichnet. Dies bedeutet, dass sie nach ihrer Aktivierung nicht noch einmal aktiviert werden können, sondern im Anschluss intrazellulär lysosomal abgebaut werden. Die Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in Alarmsituationen des Körpers, wie z. B. Trauma und Entzündungen (Coughlin and Camerer 2003).

Genetische Modelle ausgewählter Agonisten und Antagonisten von Proteinase haben gezeigt, dass sie und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Gerinnung, Entzündung und Schmerz spielen. Aus diesem Grund werden synthetische Agonisten und Antagonisten Proteinase aktivierter Rezeptoren als nützliche therapeutische Agentien bei der Behandlung von Erkrankungen vermutet (*Cottrell et al. 2002*). Die proteolytische Spaltung der Proteinase aktivierten Rezeptoren wird durch eine eng umschriebene Gruppe von Enzymen vermittelt, die Serin in ihrem aktiven Zentrum enthalten. Diese Serin-Proteinase spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen biologischen Vorgängen, insbesondere der Blutgerinnung und Wundheilung. Die Möglichkeit dieser Enzyme durch Proteolyse als Rezeptoraktivatoren von Proteinase aktivierten Rezeptoren zu fungieren, beschreibt eine neue Funktion für die Familie der Serin-Proteinase (*Ossovskaya and Bunnett 2004*).

PAR1, PAR3 und PAR4 werden auch als „Thrombinrezeptoren“ bezeichnet. PAR2 reagiert als einziger Rezeptor primär auf trypsinähnliche Serin-Proteinase inklusive Trypsin und Mastzellen-Tryptase (*Steinhoff et al. 1999*). Die proteolytische Spaltung des Rezeptors bewirkt nicht immer eine Aktivierung. In Abhängigkeit der Enzymverfügbarkeit, die als Liganden fungieren, können die Rezeptoren sowohl aktiviert, als auch inaktiviert werden. Beispielsweise spaltet der Koagulationsfaktor Thrombin PAR1 auf Thrombozyten. Dieser kann anschließend die Plättchenaggregation und Hämostase induzieren. Das Cathepsin G des neutrophilen Granulozyten hingegen spaltet PAR1 an einer anderen Stelle als Thrombin und generiert dadurch einen für Thrombin unsensiblen PAR1, von dem angenommen wird die Blutgerinnung einleiten zu können (*Ossovskaya and Bunnett 2004*). Eine große Anzahl von Proteinase, einschließlich der Gerinnungskaskade, Entzündungszellen und Verdauungstrakt können Proteinase aktivierte Rezeptoren spalten und aktivieren. Die beteiligten Enzyme und Proteinase sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1. Aktivierende Proteinasen, hemmenden Proteinasen, aktivierende Peptide und Lokalisation von PAR. Modifiziert: (Ossovskaya and Bunnett 2004)**

	<b>PAR- 1</b>	<b>PAR- 2</b>	<b>PAR- 3</b>	<b>PAR- 4</b>
<b>aktivierende Proteinasen</b>	Thrombin, FXa, APC, Granzyme A, Gingipain-R, Trypsin	Trypsin, Tryptase, FVIIa, FXa, MT-SP1, Proteinase 3, Akrosin, Gingipain-R,	Thrombin	Thrombin, Trypsin, Cathepsin G, Gingipain-R
<b>inaktivierende Proteinasen</b>	Cathepsin G, Plasmin, Elastase, Proteinase-3, Trypsin	Elastase, Cathepsin G	Cathepsin G	
<b>aktivierende Peptide</b>	SFLLRN TFLLRN	SLIGKV	None	GYPGQV AYPGKF
<b>Lokalisation</b>	Blutplättchen, Endothel, Epithel, Fibroblasten, Myozyten, Neuronen, Astrozyten	Epithel, Endothel, Fibroblasten, Myozyten, Neuronen, Astrozyten	Blutplättchen (murin), Endothel, Myozyten, Astrozyten	Blutplättchen (human), Endothel, Myozyten, Astrozyten

### 2.2.2 Die Familie der Proteinase aktivierten Rezeptoren (PAR1-4)

Bis heute wurden vier Untertypen der Proteinase aktivierten Rezeptoren beschrieben. Drei von ihnen sind Thrombinrezeptoren (PAR1, PAR3, PAR4), der vierte Rezeptor (PAR2) lässt sich von anderen Serin-Proteinasen als Thrombin, in diesem Fall Trypsin, aktivieren. Früher als „Thrombinrezeptor“ bekannt, wurde PAR1 als erster und am besten erforschte Rezeptor der PAR-Familie aus RNA von thrombinsensiblen Zellen des Menschen, des Hamsters und aus den Oozyten des *Xenopus* isoliert (*Rasmussen et al. 1991; Vu et al. 1991*). Sein Aktivierungsmechanismus entspricht in den Grundzügen dem der anderen drei Subtypen dieser Rezeptorfamilie. Proteinase aktivierte Rezeptoren werden nicht nur durch ausgewählte Proteinase, sondern auch durch Peptide mit entsprechender Aminosäuresequenz aktiviert. Einzig für PAR3 konnten noch keine aktivierenden Peptide entdeckt werden (Tab.1). Im Gegensatz zu PAR1 wurde PAR2 intuitiv geklont und erst anschließend festgestellt, dass dieser durch Trypsin aktiviert werden konnte (*Nystedt et al. 1994; Nystedt et al. 1995a; Nystedt et al. 1995b*). PAR3 wurde in Genablationsstudien als zweiter Thrombinrezeptor identifiziert (*Ishihara et al. 1997*). Mäuse, denen PAR1 in Thrombozyten fehlte, reagierten dennoch auf Thrombin (*Connolly et al. 1996*). Daher wird PAR3 als sehr wichtiger Regulator der Thrombin-Antwort sowohl bei Menschen als auch bei Nagetieren angesehen (*Ishihara et al. 1997*). Liegt eine erhöhte Expression von humanem PAR3 vor, ähnelt die Antwort auf Thrombin dem ursprünglichen Mechanismus von PAR1 allein. Aktuelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass PAR3 in murinen Thrombozyten bei niedrigen Thrombinkonzentrationen ausschließlich zur Erleichterung der Spaltung von PAR4 dient und nicht direkt G-Proteine aktivieren kann (*Nakanishi-Matsui et al. 2000*). PAR4 kommt sowohl in humanen, als auch in murinen Thrombozyten vor und dient vermutlich dazu, in PAR3-KnockOut-Mäusen kontinuierlichen auf Thrombin reagieren zu können (*Kahn et al. 1998; Xu et al. 1998*).

Neben den erwähnten Gemeinsamkeiten der Proteinase aktivierten Rezeptoren zeigen die einzelnen Rezeptoren auch spezifische Besonderheiten. Wie bereits erwähnt, werden drei der Rezeptoren durch Thrombin aktiviert. Zwei von ihnen,

PAR1 und PAR3, weisen in Expressionsstudien eine ähnliche Dosis-Antwort-Kurve für Thrombin auf. Der dritte Thrombinrezeptor, PAR4, erfordert eine 10 bis 100-fach höhere Konzentration an Thrombin um aktiviert werden zu können. Offenbar fehlt es diesem Rezeptor an der „*hirudin-like-sequence*“, welche mit der Anionenbindungsstelle des Thrombin interagieren kann und so eine Spaltung des Rezeptors erleichtert (*Kahn et al. 1998; Xu et al. 1998; Nakanishi-Matsui et al. 2000*).

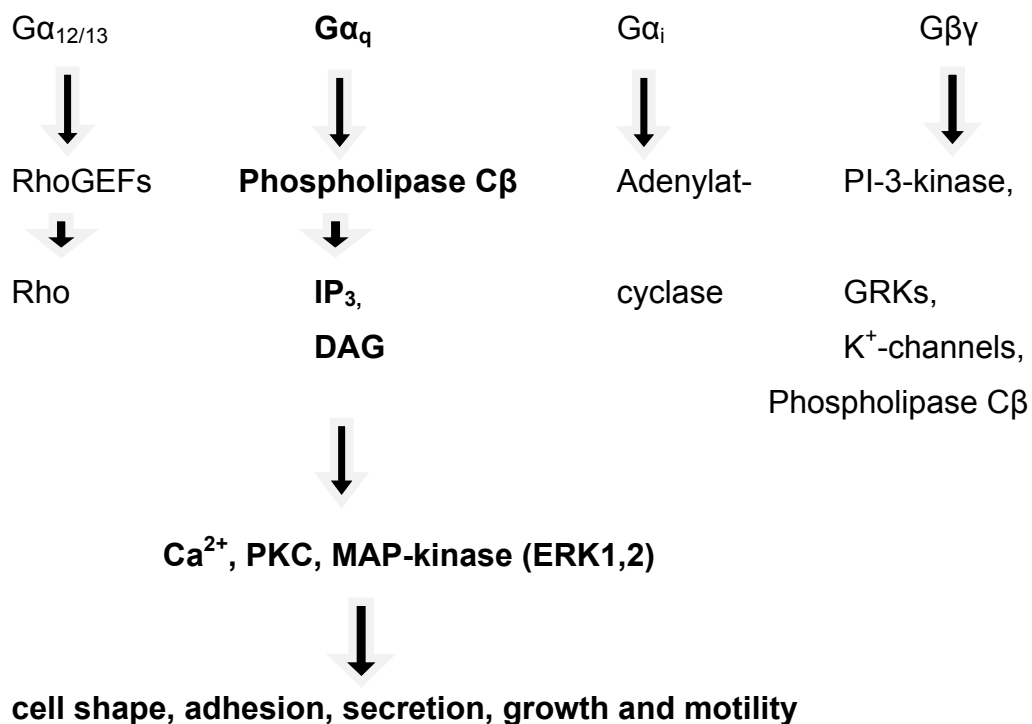
Die Entdeckung der Proteinase aktivierten Rezeptoren impliziert eine neue Schlüsselrolle für Gewebe- und systemisch wirkende Serin-Proteinasen. Diese sind somit nicht nur in der Lage Proteine zu spalten, sondern fungieren auch als potentielle Aktivatoren einer Unterfamilie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (PAR), die extrazelluläre Stimuli in intrazelluläre Signaltransduktion verwandeln können (*Macfarlane et al. 2001; Hollenberg and Compton 2002*).

### **2.2.3 Der Proteinase aktivierte Rezeptor-2 (PAR2)**

Der zweite Untertyp der Proteinase aktivierten Rezeptoren wird PAR2 genannt. Dieser Rezeptor lässt sich durch Trypsin, Tryptase und viele weitere trypsinähnliche Serin-Proteinasen aktivieren. Er wurde ursprünglich als „Trypsinrezeptor“ beschrieben und unterscheidet sich damit eindeutig von den anderen Mitgliedern seiner Familie (*Nystedt et al. 1994; Nystedt et al. 1995b*). PAR2 konnte in unterschiedlichen Organen und Zellen der Entzündung und Immunantwort nachgewiesen werden (*Nystedt et al. 1995a; Bohm et al. 1996; Mirza et al. 1996; Steinhoff et al. 1999*). In vitro Untersuchungen wiesen die Anwesenheit des Rezeptors auch in Modellen des Prostatakarzinoms und benigner Prostatahyperplasie nach (*Wilson et al. 2004; Myatt and Hill 2005; Wilson et al. 2005*).

## 2.2.4 Die Signaltransduktion des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 (PAR2)

Die Aktivierung von PAR2 vermittelt sowohl verschiedene Zellantworten, wie Proliferation und Differenzierung, als auch die Produktion und Ausschüttung zellspezifischer Proteine (IL6, GM-CSF) und Wachstumsfaktoren (Hollenberg 2005). Die Signaltransduktionswege von PAR2 entsprechen den für die GPCR typischen. Sie sind an die Gq/11-Familie der G-Proteine gekoppelt, die eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) induzieren können. Im Weiteren vermittelt die Aktivierung Second messenger, wie Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG), die für eine Mobilisation von  $Ca^{2+}$  und eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) verantwortlich gemacht werden (Bohm et al. 1996; Molino et al. 1997).



**Abbildung 3. Signaltransduktion von PAR2. Modifiziert: (Steinhoff et al. 2005)**  
Die Aktivierung von PAR2 führt zur G-Protein gekoppelten Signaltransduktion der G $\alpha_q$ -Familie mit weiterer Aktivierung der Phospholipase C,  $IP_3$  und DAG. Dies führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und Aktivierung von Kinasen, die für die Differenzierung von Zellen verantwortlich sind.



Der Aktivierungsmechanismus setzt verschiedene Kinasenaktivitäten in Gang, die wiederum eine sehr wichtige Rolle bei der Regulierung entzündlicher Geschehen spielen (*Kanke et al. 2001; Kanke et al. 2005; De Campo and Henry 2006*). Den Proteinase aktivierten Rezeptoren wird auch eine wichtige Beteiligung für die Motilität und Metastasierung von Tumorzellen zugeschrieben. Vor allem PAR1 ist in Bezug auf die Tumorgenese genauer untersucht worden. Da PAR2 sehr oft in Assoziation mit PAR1 in unterschiedlichen Geweben vorkommt, wird auch diesem Rezeptor eine Schlüsselfunktion in der Tumorgenese beigemessen (*Shi et al. 2004; Rattenholl et al. 2007*). Hier erfolgt beispielsweise eine Aktivierung über Tumor-abhängige Serin-Proteinase und Metallomatrixproteine (MMPs) (*Wilson et al. 2004; Wilson et al. 2005*). Allerdings sind die Möglichkeiten der Aktivierung Proteinase aktivierter Rezeptoren und die daraus resultierenden Funktionen in den unterschiedlichen Organen und Zellen sehr komplex aufgebaut. Potentielle Aktivatoren reichen von den ursprünglichen Proteinase wie Thrombin und Trypsin, bis hin zu Gerinnungsfaktoren und Enzymen, die von pathogenen Keimen sezerniert werden (*Lourbakos et al. 2001*). Wie unterschiedliche Proteinase wirken, kann schlussendlich noch nicht gesagt werden, jedoch wurde nachgewiesen, dass nicht immer eine Aktivierung des Rezeptors erfolgt, sondern dass viele Proteinase auch direkte und indirekte Inhibitionen hervorrufen können (*Ramachandran and Hollenberg 2008*). Neben pathophysiologischen Vorgängen sind PAR auch an physiologischen Prozessen beteiligt (*Coelho et al. 2003*).

## 2.3 Fragestellung

Die Ätiologie von Prostataveränderungen ist bis heute weitgehend unverstanden. Vor allem ist unklar, welche Faktoren die Entstehung von Prostatakarzinomen und benignen Prostatahyperplasien induzieren und diese Erkrankungen unterhalten können. Diese proliferierenden Erkrankungen der Prostata werden mit Ungleichgewichten des Hormonhaushaltes im Alter in Zusammenhang gebracht. Dies begründet die konservative Therapie beider Erkrankungen mit Medikamenten, die Androgenrezeptoren direkt und indirekt beeinflussen und somit einer Proliferation entgegenwirken können. Neue therapeutische Angriffspunkte, die ebenfalls direkt oder indirekt abhängig vom Hormonhaushalt und an der Proliferation des Organs beteiligt sind, können der Schlüssel für eine neue medikamentöse Therapieform sein und die Behandlung von Prostataerkrankungen revolutionieren. Ein denkbarer Angriffspunkt ist ein Untertyp der Proteinase aktivierten Rezeptoren (PAR2). PAR2 wird, ähnlich wie PAR1, eine proliferationsmodulierende Wirkung in Prostatakarzinomzelllinien zugeschrieben (*Liu et al. 2003; Cottrell et al. 2004*). Im Weiteren ist in dem Rezeptor eine Rolle als Initiator proinflammatorischer und inflammatorischer Prozesse und eine funktionelle Beteiligung in der Motilität und Metastasierung von Tumorzellen nachgewiesen worden (*Coelho et al. 2003; Shi et al. 2004*). Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in dem Versuch, eine durch DHT beeinflusste Expression dieses Rezeptors in *in vitro*-Modellen des Prostatakarzinoms (PCa) und der benignen Prostatahyperplasie (BPH) zu detektieren. Des Weiteren sollen weiterführende Untersuchungen zeigen, ob eine funktionelle Aktivität von PAR2 in den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden kann.

Konkret wurden in dieser Dissertation folgenden Fragen bearbeitet:

- 1. Gibt es Unterschiede in der Expression und Lokalisation des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 (PAR2) in normalen und pathologisch veränderten Geweben der Prostata?**
- 2. Lässt sich die Expression von PAR2 in den untersuchten *in vitro*-Modellen des Prostatakarzinoms (PC3, LNCaP, DU145) und der benignen Prostatahyperplasie (hPCPs) durch Dihydrotestosteron beeinflussen?**
- 3. Induziert die Stimulation mit dem physiologischen PAR2-Agonisten Trypsin eine Kalziummobilisation in den untersuchten Zelllinien?**
- 4. Lässt sich durch Stimulation mit dem synthetischen PAR2-Agonisten S9192 (NH-SLIGKV) eine physiologische Aktivität des Rezeptors nachweisen?**
- 5. Wie wirkt sich die funktionelle Aktivität von PAR2 auf die Mitogenese der untersuchten Zelllinien aus?**

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Allgemeine Geräte

Brutschränke	HeraCell 150, Heraeus, Hanau
Cleanworkbench	Herasafe, Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop	Nikon Eclipse E600, Nikon GmbH, Düsseldorf
Scanner	DX 4400 EPSON; Japan
UV- Transilluminator	UVP Inc. Polaroid; Californien, USA
Thermoblock	KTMR-133, HLC-Biotech, Bovenden
Tischzentrifuge	Biofuge primo, HERAUS; Hanau
PCR- Block PTC-100	Programmable Thermal Controller; MJ, Research Inc.; Waltham, MA, USA
PCR- Block PTC-200	Pettier Thermal Cyclers ; MJ, Research Inc. ; Waltham, MA, USA
QPCR- Block	STRATAGENE Mx3000P®; Texas, USA
Gel Kammer	PHARMACIA Gel Elektrophoresis Apparate; Erlangen
Invertoskop	Diaphot 300, Nikon; Düsseldorf
Monochromator- System	Deltascan, PTI (Photon Technology Instruments); Wedel

### 3.1.2 PC-Programme

Auswertung der Agarosegele	GelScan 3D Free Edition V2.5,1997 Marburg
QPCR	MxPro™ QPCR Software; Frederick, MD,USA
Kalziummessungen	Felix™, PTI; Wedel, Deutschland
Fotobearbeitung	CoreIDRAW®X4 Corel Corp. 2008; USA  Corel PHOTO-PAINT® X4 Corel Corp. 2008; USA
Textverarbeitung	Microsoft Word 2007; Microsoft, USA
Tabellenkalkulation	Microsoft Excel 2007; Microsoft, USA  CoreIDRAW®X4, Corel Corp. 2008; USA
Literaturverwaltung	EndNote X1, Thomson Corp.; USA
Statistik	SPSS Statistics 16.0, SPSS Inc.; USA

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle Materialien und Reagenzien, die von den Standard-Materialien abweichen, sind nachfolgend von folgenden Firmen gesondert aufgeführt: BOEHRINGER, Mannheim; SIGMA, Deisenhofen; MERCK, Darmstadt; MOLECULAR PROBES, Leiden; INVITROGEN, Karlsruhe und Roth; PROMEGA, Heidelberg; BIOLINE, USA. Die verwendeten Materialien und Puffer sind wie folgt dargestellt:

FKS, Charcoal, DMEM, DMSO, DNase I- Puffer, EDTA, FKS, Fura-2 AM, HEPES, HHBSS, ImmoMix™, Loading Buffer, M-MLV- Buffer, M-MLV- RT, MOPS, Natriumazid, Oligo<sub>dt15</sub> Primer, Pluronic® F-127, RPMI, RNasin®, RNaseOut®, RNX- Buffer, SYBRGreen™, TRIS, TRIzol®, Trypsin.

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

#### PBS: 10x Stammlösung

80 g NaCl (58,44 g/mol)  
2 g KCl (74,55 g/mol)  
14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (137,99 g/mol)  
2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (136,09 g/mol)  
auf 1L auffüllen, pH 7,4

#### TBE: 5x Lösung

54 g Tris  
27,5 g Borsäure  
20 ml 0,5 M EDTA pH 8.0  
auf 1Liter H<sub>2</sub>O

#### Charcoal- getripptes FKS

100 ml 10% FKS mit  
100 ml Charcoal-Gemisch versetzen,  
schütteln, bei 56°C 30 Min.  
inkubieren bis sich Charcoal  
absetzt und Überstand entnehmen.

#### Charcoal-Gemisch

100 ml enthalten:  
100 mM Tris-HCL  
1 mM EDTA  
2,5 g Charcoal (Sigma C3345)  
0,25 g Dextran T500 (Pharmacia  
Biotech.)

#### PCR Laufpuffer

200 ml 5x TBE auf 1 Liter H<sub>2</sub>O

---

<u>BSA 10 %:</u>	50 ml	PBS /Tween
	5 g	BSA
	0,005 g	Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )

<u>HHBSS- Puffer:</u>	8,006 g	NaClO
	403 g	KCl
	0,101 g	MgSO <sub>4</sub>
	0,10 g	MgCl <sub>2</sub>
	0,060 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,114 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	4,766 g	HEPES
	auf 1l Aqua dest.	

### 3.1.5 Verwendete Antikörper

Der Primärantikörper für die Fluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten wurde von der Firma SERAMUN Diagnostica GmbH, Heidesee entwickelt.

#### **Primärantikörper:**

Anti-PAR2 Hyperimmunserum, polyklonaler Antikörper eines Kaninchens mit der Bezeichnung K61.

Der Sekundärantikörper wurde von der Firma Acris Antibodies, Hiddenhausen bezogen.

#### **Sekundärantikörper:**

Anti-Kaninchen, mit Carbozyanine (Cy3) gekoppelter IgG-Antikörper, Ziege.

### 3.1.6 Versuchsmaterial

#### 3.1.6.1 Proben für Fluoreszenzfärbungen

Die für die Fluoreszenzfärbung gefertigten Dünnschnitte der Prostata wurden mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Leica SM2000 R, Wetzlar) am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg angefertigt.

Die Proben der erkrankten Prostata wurden vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Marburg zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.6.2 Zelllinien

Die androgenunabhängige Zelllinie PC3 (ATCC, USA) entstammt einer Knochenmetastase eines 62-jährigen Prostatakarzinompatienten und wurde 1979 erstmals von Kaighn und Mitarbeitern isoliert und beschrieben (*Kaighn et al. 1978*).

Die epitheliale Prostatakarzinomzelllinie DU145 (ATCC, USA) war die erste etablierte Prostatazelllinie humanen Ursprungs. Sie verfügt ebenfalls über ein androgenunabhängiges Wachstumsverhalten und entstammt einer Hirnmetastase eines 69 Jahre alten Patienten (*Stone et al. 1978*).

Die ebenso humane Zelllinie LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*) (ATCC, USA) wurde 1980 erstmals von der Arbeitsgruppe Horoszewicz isoliert und beschrieben. Sie wurde als eine hormonsensitive Prostatazelllinie bezeichnet und entstammt einem Lymphknoten eines Prostatakarzinompatienten (*Horoszewicz et al. 1980*).

Die hPCPs-Zellen (*human Primary Culture of the Prostate stromal compartment*) wurden aus einem Prostata-Adenom (BPH) isoliert und 1989 erstmals von der Arbeitsgruppe Aumüller am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg beschrieben (*Janssen et al. 2000*).



3.1.6.3 *Primer*

Die Primer für die PCR-Methoden wurden von der Firma MWG, Hölle und Hüttner AG, bezogen. In folgenden Tabellen sind die jeweiligen Spezifitäten der Primer zu entnehmen:

1.) Für die semi-quantitative PCR wurde folgendes „*Housekeeping Gen*“ verwendet (300 bp-Amplifikate):

**3-HGAPDH**      5´ - CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT - 3´

Gesamtmenge	Konzentration (1 ml Lösungsvolumen)	58 pmol/µl	Länge	20 – mer
11,9 OD	Lösungsvolumen für 100 pmol/µl	580 µl	GC- Anteil	60 %
350 µg	Molmasse	6038 g/mol	Maßstab	0.05 µmol
58,0 nmol	T <sub>m</sub>	61,4 °C	Reinigung	HPSF

**5-HGAPDH**      5´ - CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA - 3´

Gesamtmenge	Konzentration (1 ml Lösungsvolumen)	54 pmol/µl	Länge	20 – mer
11,5 OD	Lösungsvolumen für 100 pmol/µl	540 µl	GC- Anteil	55 %
327 µg	Molmasse	6062 g/mol	Maßstab	0.05 µmol
54,0 nmol	T <sub>m</sub>	59,4 °C	Reinigung	HPSF

2.) Für die QPCR wurde folgendes „*Housekeeping Gen*“ eingesetzt:

**3-HGAPDH**      5' - GCC CAA TAC GAC CAA ATC C - 3'

Gesamtmenge	Konzentration (1 ml Lösungsvolumen)	37 pmol/μl	Länge	19 – mer
7,7 optische Dichte	Lösungsvolumen für 100 pmol/μl	367 μl	GC- Anteil	52,6 %
210 μg	Molmasse	5711 g/mol	Maßstab	0.01 μmol
36,7 nmol	T <sub>m</sub>	56,7 °C	Reinigung	HPSF

**5-HGAPDH**      5' - AGC CAC ATC GCT CAG ACA - 3'

Gesamtmenge	Konzentration (1 ml Lösungsvolumen)	27 pmol/μl	Länge	18 – mer
5,4 optische Dichte	Lösungsvolumen für 100 pmol/μl	272 μl	GC- Anteil	55,6 %
148 μg	Molmasse	5438 g/mol	Maßstab	0.01 μmol
27,2 nmol	T <sub>m</sub>	56,0 °C	Reinigung	HPSF

3.) Für die semi-quantitative PCR wurden folgende PAR2-Primer verwendet (525bp-Amplifikate):

**PAR2-525-for**      5' - CCC TTT GTA TGT CGT GAA GC - 3'

Gesamtmenge	Konzentration (1 ml Lösungsvolumen)	30 pmol/μl	Länge	20 – mer
6,3 optische Dichte	Lösungsvolumen für 100 pmol/μl	305 μl	GC- Anteil	50 %
186 μg	Molmasse	6099 g/mol	Maßstab	0.01 μmol
30,5 nmol	T <sub>m</sub>	57,3 °C	Reinigung	HPSF

**PAR2-525-rev**      5' - TTC CTG GAG TGT TTC TTT GAG G - 3'

Gesamtmenge	Konzentration (1 ml Lösungsvolumen)	38 pmol/μl	Länge	22 – mer
8,6 optische Dichte	Lösungsvolumen für 100 pmol/μl	379 μl	GC- Anteil	45,5 %
257 μg	Molmasse	6778 g/mol	Maßstab	0.01 μmol
37,9 nmol	T <sub>m</sub>	58,4 °C	Reinigung	HPSF

4.) Für die QPCR wurden folgende PAR2-Primer verwendet:

**realPAR2- for**

5' - TTG GTA AGG TTG ATG GCA CA - 3'

Gesamtmenge	Konzentration (1 ml Lösungsvolumen)	41 pmol/µl	Länge	20 – mer
9,5 optische Dichte	Lösungsvolumen für 100 pmol/µl	415 µl	GC- Anteil	45 %
258 µg	Molmasse	6212 g/mol	Maßstab	0.01 µmol
41,5 nmol	T <sub>m</sub>	55,3 °C	Reinigung	HPSF

**realPAR2- rev**

5' - CGG AAA AGA AAG ACC CAC AG - 3'

Gesamtmenge	Konzentration (1 ml Lösungsvolumen)	14 pmol/µl	Länge	19 – mer
3,6 optische Dichte	Lösungsvolumen für 100 pmol/µl	144 µl	GC- Anteil	50 %
89 µg	Molmasse	6162 g/mol	Maßstab	0.01 µmol
14,4 nmol	T <sub>m</sub>	57,3 °C	Reinigung	HPSF

3.1.6.4 *PAR2-Agonist S9192*

Das PAR2-aktivierende Peptid wurde von der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis; USA, bezogen.

S9192, Ser-Leu-Ile-Gly-Lys-Val-amide (SLIGKV-NH<sub>2</sub>), ist ein PAR2-aktivierendes Peptid, welches die „*tethered ligand*“-Sequenz von humanem PAR2 nach der proteolytischen Spaltung nachahmt, spezifisch bindet und den Rezeptor dadurch aktiviert (*Hollenberg and Compton 2002*). Neben der Proliferation von Zellen bewirkt der synthetische Agonist auch einen intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration (*Bohm et al. 1996; Bono et al. 1997*).

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Übersicht

Zur Erarbeitung der Fragestellung dienten die in Tabelle 2 aufgeführten Methoden:

**Tabelle 2.** Übersicht der in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Erarbeitung der Fragestellung.

<b>Ziel</b>	<b>angewandte Methodik</b>
Nachweis von PAR2 in normalen und pathologisch veränderten Geweben der Prostata	<b>Fluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten mit PAR2-Antikörper</b>
Einfluss von DHT auf die Expression von PAR2 in den untersuchten Zelllinien	<b>Semi-quantitative PCR und QPCR</b>
Kalziummobilisation durch PAR2-Agonisten (Trypsin/S9192) in den untersuchten Zelllinien	<b>Kalziummessungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2</b>
Untersuchung des Wachstumsverhaltens durch funktionell aktiven PAR2 in den untersuchten Zelllinien	<b>Proliferationsassay mit PAR2-Agonist durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation</b>

### **3.2.2 Fluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten**

Für die Fluoreszenzfärbungen wurden Präparate der Prostata verwendet, die von der Histopathologie der Universitätsklinik Marburg zur Verfügung gestellt wurden. Die Herstellung der Dünnschnitte erfolgte mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Leica SM2000 R, Wetzlar) im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg. Die Dicke der Schnitte betrug je nach Präparatbeschaffenheit zwischen 4-8 µm. Für den Nachweis von PAR2 wurden je 3 unabhängige Präparate pathologisch veränderten Gewebes der Prostata untersucht. Die Ergebnisse zeigen typische Beispiele der Verteilungsmuster von PAR2 in den untersuchten Geweben.

#### *3.2.2.1 Durchführung*

Zur Herstellung der Dünnschnitte wurden die benötigten Objektträger beschichtet, um einen Verbund zwischen Träger und Dünnschnitt zu erreichen. Dabei wurden die Objektträger zunächst mit Aceton für 5-10 Min. entfettet. Anschließend wurden diese in ein APES/Aceton-Gemisch (2%ig) für ebenfalls 5-10 Min. eingelegt, mit A. dest. abgespült und über Nacht bei 70°C im Wärmeschrank getrocknet.

Die Dünnschnitte wurden auf die Objektträger gebracht und über Nacht getrocknet. Anschließend wurden sie von Ihrem Einbettmedium (Paraffin) befreit. Dabei wurde das Paraffin 2x 5 Min. durch Xylol und je 3 Min. durch eine absteigende Alkoholreihe (Isopropyl 95%; 80%; 70%) entfernt, danach mit A. dest. gespült und 3x 5 Min. in einer Küvette mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Dies erfolgte durch Beträufeln der Dünnschnitte mit einer 10% BSA in PBS-Lösung mit 0,01g NaN<sub>3</sub> (Natriumazid), die für ca. 10-30 Min. bei Raumtemperatur auf dem Schnitt verblieb. Die Inkubation erfolgte in einer „feuchten Kammer“, damit die Schnitte nicht austrockneten. Anschließend wurde die Lösung von dem Präparat abgespült. Danach konnte der Erstantikörper K61 auf die Präparate gegeben werden. Hierbei wurden folgenden Konzentrationen verwendet (1:100; 1:500

und 1:1000). Die Inkubation erfolgte für ca. 1h bei Raumtemperatur in einer „feuchten Kammer“. Alternativ konnte auch für 24-48 h bei 4°C inkubiert werden. Erneut wurden die Präparate abgespült und darauf für 3x 5 Min. bei Raumtemperatur in einer mit PBS/Tween-Lösung gefüllten Küvette gewaschen. Der Cy3-konjugierte Zweitantikörper wurde dann für 1h bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten „feuchten Kammer“ in einem Verhältnis von 1:200 (100µl/Präparat) auf die Präparate gegeben. Anschließend wurden die Proben erneut für 3x 5 Min. gewaschen und dann erfolgte die Kernfärbung mit DAPI in der Verdünnung 1:100. Die Präparate wurden erneut mit A. dest. gespült und für 3x 5 Min. in einer Küvette mit PBS gewaschen. Anschließend konnten die Präparate mit Propylgalat eingedeckt und abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Immunreaktionen des PAR2-Antikörpers wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse E600, Düsseldorf) betrachtet und mit einer Kamera (Nikon D1) digital aufgezeichnet.

### **3.2.3 Zellkultur für PCR-Verfahren**

#### *3.2.3.1 Anzucht der Prostatazellen*

Die Zelllinien PC3 und DU145 wurden in 75 cm<sup>3</sup> Kulturflaschen in DMEM high glucose (4,5 g/l) mit 10% FKS (fetales Kälberserum) und 10 ml/l P/S/A- Sodium (Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B) im Brutschrank bei 37°C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5% CO<sub>2</sub> enthielt, kultiviert. Die Zelllinien wuchsen adhärent auf dem Boden der Kultivierungsflaschen. Alle zwei bis drei Tage wurde das Kulturmedium gewechselt. Wenn die Kultivierungsflaschen voll bewachsen waren, wurde 3x mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gespült, um tote Zellen und Stoffwechselprodukte zu entfernen und anschließend 3x mit 3%Trypsin/EDTA nachbehandelt. Nach dem letzten Spülen durften die Zellen nur noch benetzt sein. Danach wurden die Flaschen für maximal 3 Min. auf eine 37°C Heizplatte gestellt. Anschließend konnten die Zellen durch Klopfen vom Boden der Kultivierungsflaschen gelöst und unter dem Mikroskop auf die Anzahl kontrolliert werden. Mit FKS-haltigem

Kulturmedium wurde nach der Kontrolle die Trypsinaktivität gestoppt und die Zellsuspensionen mit frischem Medium in neue Kulturflaschen verteilt. Nach Kultivierung konnten die Zellen im Verhältnis 1:4 gesplittet werden.

Im Unterschied zu den Zelllinien PC3 und DU145 wurde die Zelllinie LNCaP nur einmal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und auch nur einmal mit Trypsin/EDTA gespült. Anschließend konnten die Zellen maximal für 1 Min. auf die 37°C Heizplatte gestellt werden.

Die stromale Zelllinie hPCPs wurden in RPMI 1640 mit 10% FKS und P/S/A kultiviert, anschließend im Verhältnis 1:2 gesplittet. Daraufhin erfolgte ein dreimaliges Spülen mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  und ein zweimaliges Spülen mit Trypsin/EDTA. Die Kultivierungsflaschen wurden ebenfalls für 1 Min. auf die 37°C Heizplatte gestellt.

#### 3.2.3.2 *Stimulation der Prostatazellen*

In dieser Arbeit wurden die zu untersuchenden Zelllinien PC3, DU145, LNCaP und hPCPs jeweils in 6 unterschiedlich stimulierte Proben aufgeteilt. Die Stimulation der Zellen erfolgte zu gleichen Anfangsbedingungen.

Es erfolgte für jeweils 3 Proben ein 24-stündiger Vorlauf in Kulturmedium mit 10% gestripptem FKS (chFKS) und 10% normalem FKS. Das gestrippte Medium wurde durch Inkubation mit Aktivkohle (Charcoal) aus fetalem Kälberserum gewonnen. Damit konnten in diesem Medium Steroidhormonkonzentrationen unter der Nachweisgrenze erreicht werden. Ein Einsatz mit chFKS entspricht somit einem Steroidentzug. Wie in Abbildung 4 dargestellt, wurden nach dem Vorlauf jeweils zwei Proben zusätzlich weitere 24h in den verschiedenen Kulturmedien mit Dihydrotestosteron (DHT) in aufsteigender Konzentration stimuliert (DHT(-log[M])= 7 und 11), während jeweils eine Probe weitere 24h in einem Gemisch aus Ethanol (1:1000 von 7‰) in Kulturmedium mit chFKS bzw. Ethanol (1:1000 von 7‰) in Kulturmedium mit Normalserum (FKS) stimuliert wurde (entspricht: DHT (-log[M])= 0).

Es sollte untersucht werden inwieweit eine Inkubation mit FKS oder chFKS und

unterschiedlichen DHT-Konzentrationen einen Einfluss auf die Expression von PAR2 in den untersuchten Zelllinien nimmt.

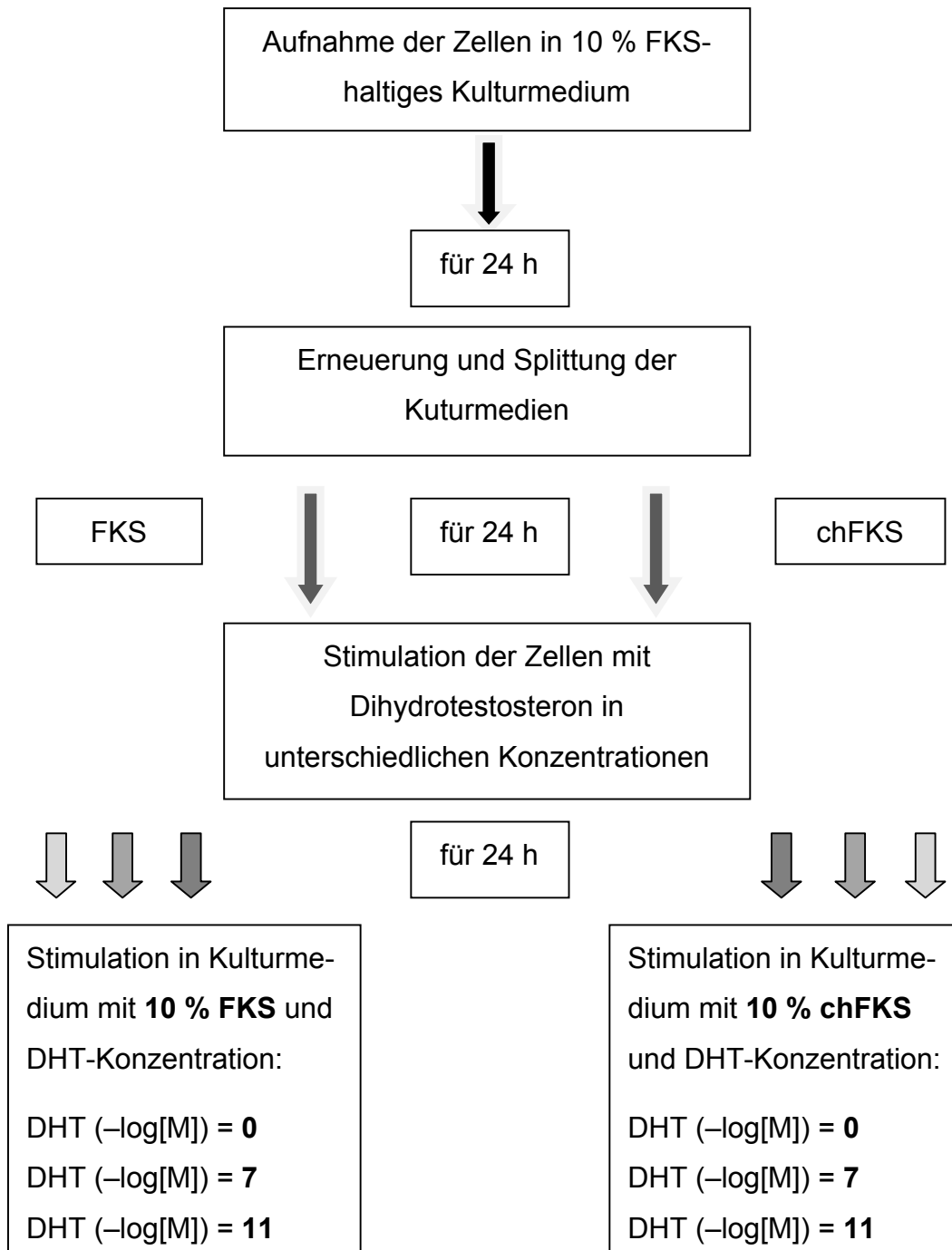


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Anzucht und Stimulation der untersuchten Zelllinien für die PCR-Verfahren.



### **3.2.4 Total-RNA-Präparation aus Prostatazellen mit Aufreinigung der Präparation von genomischer DNA**

#### *3.2.4.1 RNA-Präparation*

Die Total-RNA-Präparation aus den Zellen erfolgte durch die TRIzol™-Methode modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (*Chomczynski and Sacchi 1987*).

Für die totale RNA Präparation wurden jeweils 6 Cups pro Zelllinie vorbereitet und ihrer Stimulation entsprechend gekennzeichnet. Für die ersten Schritte wurden 1,5ml Cups zur Aufnahme der gelösten Zellsuspension benötigt. Um die Zellen aus den Brutflaschen zu lockern, wurden jeweils 400µl TRIzol® Reagenz in die Flaschen gegeben. Der gesamte Boden der Kultivierungsflasche wurde benetzt. Anschließend konnten mit einem Zellschaber die Zellen herausgelöst und mit Hilfe einer Pipette in die vorbereiteten Cups gegeben werden. Mit einer 1ml Insulinspritze und der dazugehörigen Kanüle wurde nun eine so genannte „Spritzenpassage“ durchgeführt, um sicherzustellen, dass sich Zellverbände vollständig auflösten. Dabei wurde die Zellsuspension in den Cups solange durch die Insulinspritze geführt, bis eine Zellsuspension entstand, die sehr leicht durch die Insulinspritze zu führen war. Anschließend wurde diese Suspension 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde unter dem Abzug in jedes Cup 120µl Chloroform gegeben, die Proben durchgemischt und erneut 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Chloroform sorgte für eine Trennung der Suspension in Fett- und Proteinbestandteile. Dabei entstanden im Cup 3 Phasen. Das Chloroform war der schwerste Bestandteil der Lösung und fiel als klare Phase bis zum Boden des Cups durch. In der mittleren Phase wurden Lipide ausgefällt. Diese Schicht erschien milchig und trüb. Die relevante Schicht war die obere klare Phase, denn hier befanden sich die Proteine, die für die Präparation der RNA verwendet werden konnten. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben bei 4°C und 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase in eine neue 6-Cup-Reihe pipettiert, immer unter Beachtung der vorher festgelegten Probenomenklatur. Es wurden dann die µl-Mengen bestimmt, aus denen anschließend der Reaktionsansatz für den DNase-Verdau errechnet werden

konnte. Mit Hilfe des DNase-Verdau wurde genomische DNA aus dem Reaktionsansatz entfernt und somit aufgereinigt. Für eine komplette Aufreinigung der RNA bedurfte es oft mehrerer DNase-Verdau-Maßnahmen.

#### 3.2.4.2 *DNase-Verdau*

Um eine Aufreinigung der extrahierten RNA von genomischer DNA zu erreichen, diente ein DNase-Verdau:

Die Rechnung für den DNase-Verdau berücksichtigte einen Reaktionsansatz von 250µl. Für einen Reaktionsansatz von 250µl wurden 25µl 10xDNase-Puffer, 1µl RNAsin<sup>®</sup> (Promega, Heidelberg) und 3µl DNase-I (RNase-frei, Boehringer, Mannheim) benötigt. Mit Hilfe des Dreisatzes konnten dann die jeweiligen µl-Mengen der Reagenzien auf die µl-Menge der zu verdauten RNA bestimmt werden. Das Verhältnis der einzelnen Reagenzien zueinander war wichtig. Wurden die µl-Mengen der Reagenzien (10xDP, RNAsin<sup>®</sup>, DNaseI) errechnet, konnten diese zu den jeweiligen Cups dazugegeben werden und dann 30 Min. bei 37°C im Heizblock inkubiert werden. Der Inhalt der Cups wurde nun zu jeweils 50% auf neue Cups verteilt und mit der gleichen Menge Chloroform extrahiert. Wieder wurden die Cups bei 4°C und 12000 x g 15 Min. zentrifugiert. Danach konnte erneut der Überstand in neue Cups überführt und noch einmal mit derselben Menge Chloroform extrahiert werden. Anschließend wurde wie zuvor angegeben zentrifugiert.

### 3.2.4.3 Fällung der RNA

Für die Fällung der RNA wurde die obere wässrige Phase abgenommen, in neue Cups überführt und zu 50% des Volumens mit Isopropanol versetzt, geschüttelt und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben 30 Min. bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Der dadurch entstandene wässrige Überstand konnte vorsichtig dekantiert und abpipettiert werden. Schon jetzt war in den meisten Fällen bereits ein RNA-Pellet sichtbar. Dieses Pellet wurde mit 70% Ethanol versetzt, geschüttelt und erneut 15 Min. bei 12000 x g zentrifugiert. Das Ethanol wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abgegossen und das Pellet an der Luft getrocknet. Nachdem das Pellet komplett getrocknet war, konnte es in 50µl RNAsin<sup>®</sup>/H<sub>2</sub>O aufgenommen werden (bei größeren Mengen RNA konnte auch in 100µl Lösung aufgenommen werden). Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich das Pellet vollständig auflöste. Die RNAsin<sup>®</sup>/H<sub>2</sub>O-Lösung war im Vorfeld vorzubereiten (5µl RNAsin<sup>®</sup> / 500µl H<sub>2</sub>O in 1,5ml Cup). Es bestand nun die Möglichkeit die Proben bei -20°C auf Eis zu lagern.

### 3.2.5 Herstellung der cDNA ; Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription (RT) dient das Enzym *Reverse transcriptase* dazu, aus mRNA einzelsträngige cDNA herzustellen, um im Anschluss in einer PCR spezifische Sequenzen eines Materials zu amplifizieren. Dadurch ist es möglich, Genexpression auf Transkriptionsebene nachzuweisen. Mit Hilfe des AMOC- Verfahrens (*arithmetic multiplication of cDNA*) ist es möglich nach der reversen Transkription eine deutlich höhere Ausbeute von cDNA zu erlangen (Mangan 1993).

Zur Herstellung der cDNA wurden pro Probe jeweils 4µg RNA umgeschrieben. Anhand der zuvor berechneten Mengen an RNA konnten nun die für die Umschreibung benötigten Cups vorbereitet werden. Jeder Cup enthielt 20µl Reaktionsansatz. Der Reaktionsansatz enthielt 2µl Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer (Promega, Heidelberg) und 4µg RNA (µl-Menge variierte wegen unterschiedlich

berechneten RNA-Mengen) und wurde mit H<sub>2</sub>O auf 20µl Reaktionsansatz aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 10 Min. bei 70°C inkubiert und danach auf Eis gelegt. Nun konnten 20µl des ebenfalls vorbereiteten Supermixes, der für die Umschreibung in cDNA notwendig war, in die jeweiligen Cups gegeben werden. Diese 20µl setzten sich wie folgt zusammen:

1. 8µl M-MLV 5x Puffer;
2. 1µl RNAsin<sup>®</sup>;
3. 2µl Nukleotide;
4. 8(8,5)µl H<sub>2</sub>O
5. 1(0,5)µl M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Heidelberg); (wird erst während der Umschreibung zu den Cups gegeben; siehe unten).

Im Thermocycler erfolgte die Umschreibung der Proben dann über das AMOC-Verfahren. Das Programm gestaltet sich wie folgt:

1. 10 Min. bei 70°C inkubieren
2. 3 Min. bei 95°C inkubieren
3. 3 Min. auf Eis legen
4. jeweils 1µl M-MLV RT zu den Cups geben (siehe oben)
5. 30 Min. bei 37°C inkubieren
6. 10 Min. bei 70°C inkubieren

Die so umgeschriebene cDNA konnte nun für die Versuche der PCR eingesetzt werden.

### 3.2.6 Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (RT- PCR)

Seit ihrer Entdeckung ist die Polymerasekettenreaktion (PCR) zu einer der wichtigsten Techniken der modernen Molekularmedizin geworden (*Mullis and Faloona 1987*). Sie ist eine in vitro Technik zur gezielten Vermehrung eines DNA-Genomfragmentes, das zwischen zwei Regionen mit bekannter Nukleotidsequenz liegt. Diese Technik ermöglicht die Amplifikation von geringsten Mengen an Nukleinsäuren von den unterschiedlichsten Materialien.

Jede PCR folgt dem folgenden Prinzip: Man benötigt zunächst ein Template (DNA oder cDNA). Durch eine sehr hohe Temperatur erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) des zu untersuchenden Materials, damit sich anschließend am 5' und 3' Ende des zu amplifizierenden Bereichs die spezifischen Primer (Oligonukleotide) anlagern können. Dieser Vorgang, das so genannte „*Annealing*“, ist nötig, damit sich die nun einzelsträngige DNA mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) in Anwesenheit von freien Desoxynukleotid-Triphosphaten wiederherstellen kann („*Elongation*“). Ein PCR-Verlauf besteht also immer aus diesen oben genannten drei Schritten. Die Denaturierung erfolgt meist für 2-4 Min. bei einer Temperatur von ca. 94°C. Abhängig vom untersuchenden Material (Template) wird die Temperatur auf die jeweilige Annealingtemperatur gesenkt, um eine Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA zu ermöglichen. Anschließend folgt eine Temperaturerhöhung auf 72°C, dies ist das Temperaturoptimum für die hitzestabile Taq-Polymerase für den Prozess der Elongation. Das Enzym stammt aus dem thermophilen Bakterium „*Thermophilus aquaticus*“ und kann kurzfristig bis auf eine Temperatur von 96°C erhitzt werden ohne einen Aktivitätsverlust zu erleiden. Die Komplementierung der DNA läuft an beiden Strängen der vorherigen dsDNA, so dass bereits nach einem Zyklus die Anzahl der dsDNA verdoppelt wird. Am Ende jeder PCR erfolgt eine finale Elongation für 7-10 Min.

### 3.2.6.1 Durchführung der semi-quantitativen RT-PCR

Um eine Aussage über eine androgenabhängige Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 in den unterschiedlich mit Dihydrotestosteron (DHT) stimulierten Zelllinien treffen zu können, war es nötig eine Quantifizierung der stimulierten Proben mit Hilfe eines „*Housekeeping Gen*“ (HKG) durchzuführen. Diese Methode liefert eine Normalisierung der untersuchten Expressionsergebnisse. Man kann für die Quantifizierung der PCR zwischen kompetitiven und relativen RT-PCRs wählen. Für die kompetitive RT-PCR benötigt man ein künstliches Transkript, welches sich von der Länge des zu suchenden Fragmentes auf dem Template unterscheidet. In dieser Arbeit wurden für die Quantifizierung relative RT-PCRs mit dem „*Housekeeping Gen*“ (HKG) HGAPDH durchgeführt.

Für die Quantifizierung wurden 25µl Reaktionsansätze pipettiert. Jeder Reaktionsansatz enthielt folgende Anteile:

- |  |          |
|--|----------|
| 1. NH <sub>4</sub> - Puffer 10x Konz.      | 2,5 µl   |
| 2. MgCl <sub>2</sub> 50 mM                 | 1,0 µl   |
| 3. Nukleotide 10mM                         | 0,5 µl   |
| 4. HGAPDH- Primer 3´                       | 0,5 µl   |
| 5. HGAPDH- Primer 5´                       | 0,5 µl   |
| 6. Taq- Polymerase                         | 0,125 µl |
| 7. cDNA                                    | 0,5 µl   |
| 8. mit H <sub>2</sub> O auf 25µl auffüllen |          |

Die Durchführung der PCR mit den HKG-Primern erfolgte in dem ThermoCycler (PTC 100/200) unter folgenden Bedingungen:

1. 4 Min.	96°C	initiale Denaturierung
2. 30 sec	94°C	Denaturierung
3. 30 sec	59°C	Annealing
4. 45 sec	72°C	Elongation
5. 28 x ad 2.		
6. 5 Min.	72°C	finale Elongation
7. 10- ∞ Min.	10°C	Finish

Nachdem die PCR in dem ThermoCycler abgeschlossen war, wurde jede Probe mit 6µl Loading Buffer versehen und anschließend die Taschen des Agarosegels beladen. Das Gel befand sich in einer Gelkammer, die die Amplifikationsprodukte elektrophoretisch auftrennte. Die Quantifizierung der HKG-Gele wurde nach fotografischer Digitalisierung mit Hilfe des Computerprogramms GelScan 3D V2.5 durch Messung der optischen Dichte der durch Ethidiumbromid fluoreszierenden Banden durchgeführt und ausgewertet. Eine Angleichung der gemessenen Intensitäten wurde dann durch Optimierung der µl-Menge an cDNA korrigiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Intensitäten der Banden untereinander auf dem 1,5% Agarosegel möglichst keine Unterschiede aufwiesen, um anschließend die PCR mit dem PAR2-Primer durchführen zu können. Für diese Versuche wurden die korrigierten Mengen an cDNA übernommen. Nach der relativen Quantifizierung erfolgten die PCRs für die Detektion einer androgenabhängigen Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 (PAR2) in Prostatakarzinomzelllinien PC3, LNCaP, DU145 und hPCPs-Zellen einer benignen Prostatahyperplasie auf 1,5% Agarosegel.

Auch die Reaktionsansätze mit den PAR2-Primern wurden in 25µl Ansätzen hergestellt. Jeder Reaktionsansatz enthielt folgende Anteile:

- |   |                            |
|---|----------------------------|
| 1. RNX- Puffer                              | 2,5 µl                     |
| 2. MgCl <sub>2</sub> 50 mM                  | 1,0 µl                     |
| 3. Nukleotide 10mM                          | 0,5 µl                     |
| 4. PAR2- Primer 3'                          | 0,5 µl                     |
| 5. PAR2- Primer 5'                          | 0,5 µl                     |
| 6. Platinum Taq – Polymerase                | 0,125 µl                   |
| 7. cDNA                                     | unterschiedliche µl-Mengen |
| 8. mit H <sub>2</sub> O auf 25 µl auffüllen |                            |

Die Proben wurden nach der Pipettierung direkt in den ThermoCycler gegeben. Die Durchführung der PCR mit den PAR-Primern erfolgte im ThermoCycler unter folgenden Bedingungen:

- |               |      |                        |
|---------------|------|------------------------|
| 1. 4 Min.     | 96°C | initiale Denaturierung |
| 2. 30 sec     | 94°C | Denaturierung          |
| 3. 30 sec     | 62°C | Annealing              |
| 4. 45 sec     | 72°C | Elongation             |
| 5. 28x ad 2.  |      |                        |
| 6. 5 Min.     | 72°C | finale Elongation      |
| 7. 10- ∞ Min. | 10°C | Finish                 |



### 3.2.7 Real Time-PCR (QPCR)

Die Echtzeit-PCR (QPCR) liefert gegenüber der semi-quantitativen RT-PCR die Möglichkeit einer simultanen Quantifizierung. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs wie SYBRGreen™ (Bioline, Luckenwalde) der in doppelsträngige DNA interkaliert, wird die Messung der Amplifikate in Echtzeit ermöglicht. Der Komplex aus DNA und dem Farbstoff absorbiert blaues Licht der Wellenlänge 494 nm und emittiert grünes Licht der Wellenlänge 521 nm (*Arya et al. 2005*). Der Fluoreszenzanstieg wird mit Hilfe des QPCR-Blocks während und am Ende eines jeden PCR-Zyklus gemessen. Mit Hilfe der dazugehörigen Software wird der für die Auswertung der PCR wichtige Schwellenwert, der sogenannte  $C_t$ -Wert, ermittelt. Dieser Wert ist der zyklenabhängige Zeitpunkt, bei dem sich das Fluoreszenzsignal gerade noch vom Hintergrund abhebt. Er ist umgekehrt proportional zur vorhandenen Nukleinsäuremenge (*Pfaffl 2004*). Der Vorteil der Real Time-PCR liegt auf der Hand, wenn man bedenkt, dass eine Auswertung über Agarosegele wegfällt, die Daten für die Auswertung sofort verfügbar sind und das Kontaminationsrisiko der Proben durch weniger Pipettierschritte verringert wird. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die amplifizierte DNA während der exponentiellen Phase zu quantifizieren. Der Reaktionsansatz für die PCR ist der normalen PCR sehr ähnlich, außer dass der Farbstoff SYBRGreen™-Fluoreszin zugesetzt wird. In dieser Arbeit wurde für die Reaktionen der PCR Kit der Firma BIOLINE verwendet.

Folgender 20 µl Reaktionsansatz wurde pro Probe pipettiert:

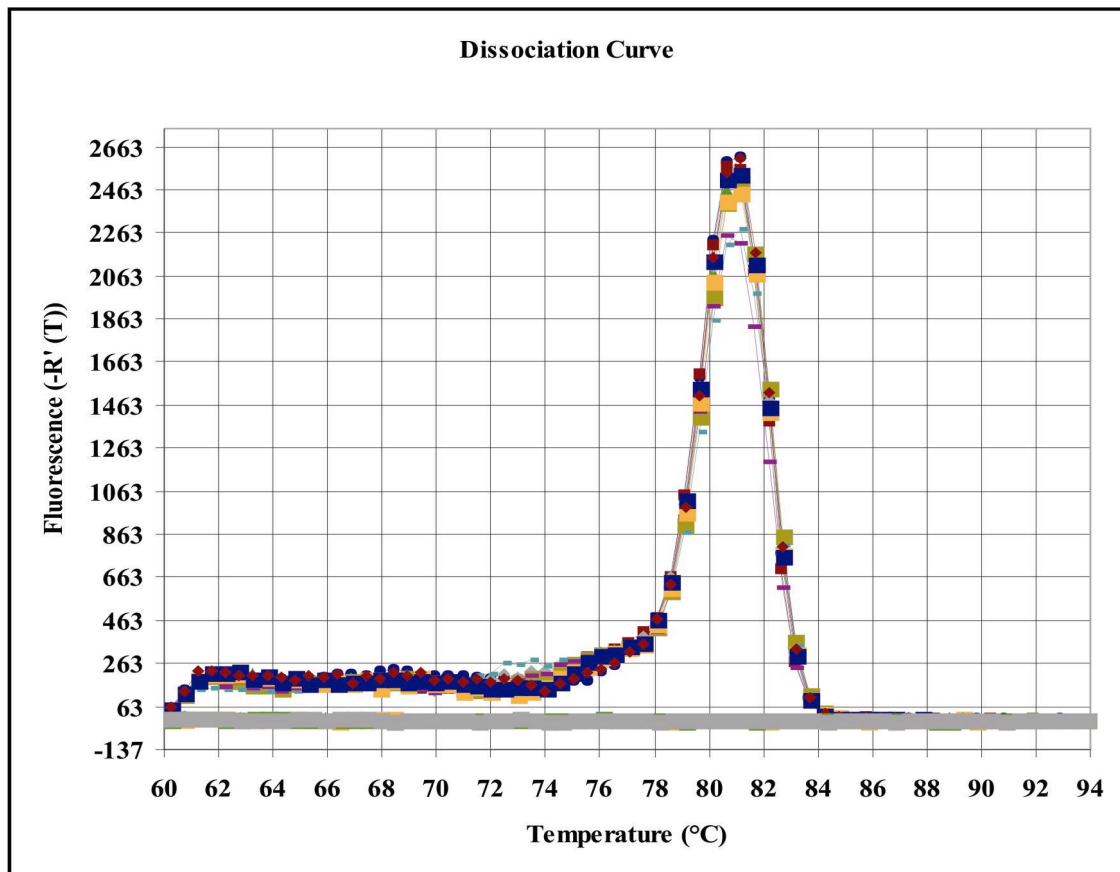
1. 10 µl ImmoMix™ (BIOLINE)
2. 0,4 µl SYBRGreen™
3. 1 µl Primermix (je 5 pmol/µl) (PAR2 und HGAPDH)
4. 7,6 µl H<sub>2</sub>O
5. 1 µl cDNA

Es wurden insgesamt 38 Zyklen zur Amplifikation von PAR2 angesetzt.

### 3.2.7.1 Durchführung der QPCR

Um Pipettierungenauigkeiten zu umgehen, wurde jeder Reaktionsansatz in Triplets für den Versuch mit PAR2-Primern und parallel dazu mit HKG-Primern pipettiert. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse gemittelt, verrechnet und anschließend miteinander verglichen (s.u.).

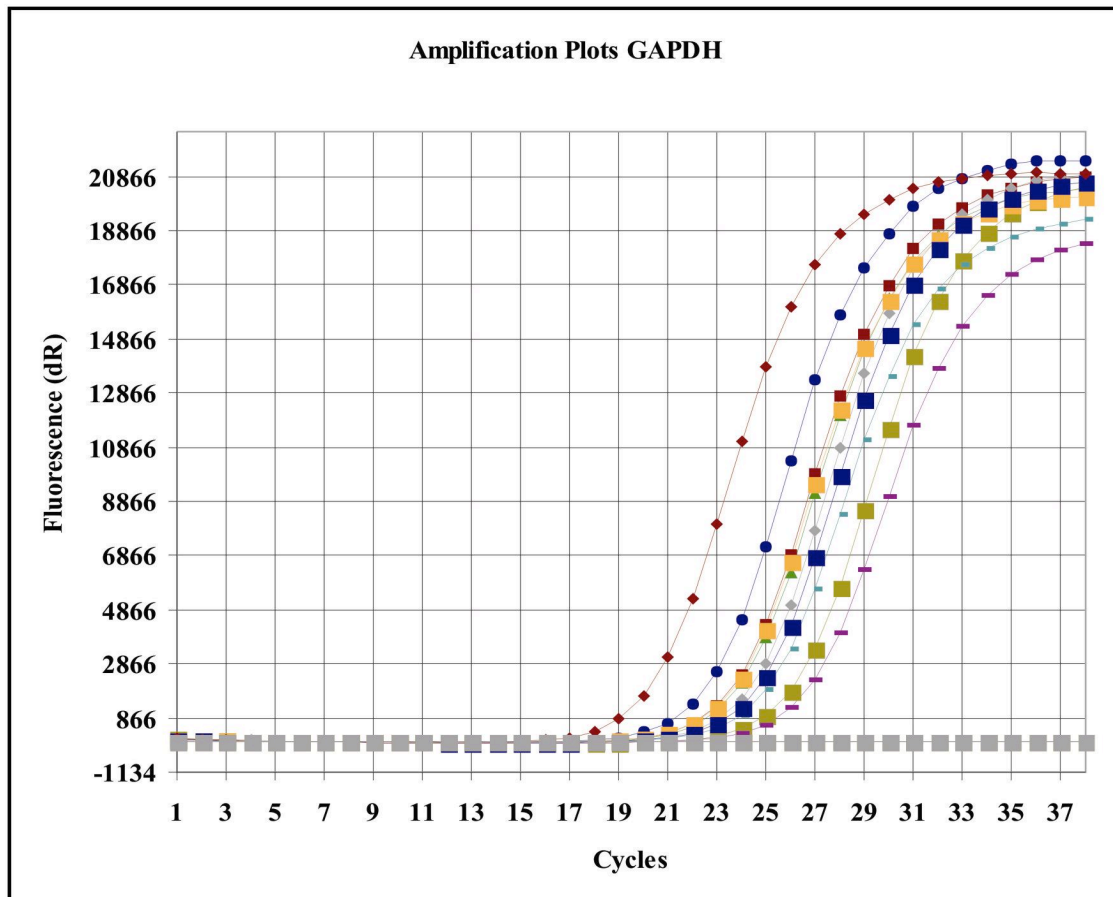
Nach jedem Versuch wurden durch den QPCR-Block Mx3000P eine Schmelzkurve und eine Amplifikationskurve generiert. Diese Kurven können optisch einer Kontrolle der einzelnen Proben und Reaktionsansätze dienen. Aus der Schmelzkurve kann man eine Aussage über die Homogenität der amplifizierten Produkte ersehen und zeigen, ob wirklich nur das gewünschte Produkt amplifiziert wurde oder ob Unreinheiten vorhanden waren. Eine homogene Schmelzkurve kann eine Reaktionseffizienz von 100% äußern. Das Gerät erhöht kontinuierlich die Temperatur von 50°C auf 100°C und dokumentiert die Fluoreszenzemission, die sich bei steigender Temperatur durch das Aufschmelzen der Amplifikate verringert. So entsteht ein Maximalwert, der sich graphisch durch das Auftragen der Fluoreszenzemission gegen die Temperatur darstellen lässt. Wenn weitere Maxima zu erkennen sind, weisen diese auf Amplifikate unerwünschter Produkte hin. Im Idealfall überlagern sich nur die Kurven, für die auch das gleiche Primerpaar eingesetzt wurde. In Abbildung 5 ist exemplarisch eine Schmelzkurve dargestellt.



**Abbildung 5. Verlauf einer Schmelzkurve am Beispiel von HGAPDH.** Alle Kurven zeigen nur ein deutliches Maximum. Die Maxima der einzelnen Kurven überlagern sich, so dass gewährleistet ist, dass nur das gewünschte Produkt amplifiziert wurde.

Des Weiteren generiert das System eine Amplifikationskurve. Diese Kurve dokumentiert den Anstieg der Fluoreszenzemission des an die kontinuierlich neu amplifizierten DNA-Fragmente bindenden SYBRGreen™ und damit auch den charakteristischen Verlauf einer PCR-Reaktion. Klassischerweise liegt zunächst ein linearer Anstieg vor, in dem die PCR-Reaktion unter optimalen Bedingungen ablaufen kann. Nach einigen Zyklen erreicht die Kurve einen Sättigungsbereich. Diese Plateauphase entsteht durch Limitation der PCR-Komponenten (Pfaffl 2001). Wie man anhand der Kurvenverläufe erkennen kann, lassen sich in dieser Phase keine Unterschiede in den Proben erkennen. Für eine PCR, die auf Agarosegelen ausgewertet würde, könnte man keine

Aussagen über das Amplifikat treffen, da die Amplifikate aller Proben identisch wären. Die Quantifizierung bei einer QPCR wird durch die mitgelieferte Software automatisch innerhalb des linearen Bereichs der Fluoreszenzkurve vorgenommen.



**Abbildung 6. Verlauf einer Amplifikationskurve am Beispiel von HGAPDH.** Typischer Verlauf einer PCR-Reaktion. Der zunächst lineare Anstieg der Amplifikate geht ab einer bestimmten Zyklenzahl in eine Plateauphase über. Hier sind keine Aussagen über unterschiedlich stimulierte Amplifikate mehr möglich.

Ähnlich wie bei der semi-quantitativen PCR auf Agarosegelen müssen die Ausgangsmengen an Gesamt-DNA der einzelnen Proben gegen HGAPDH abgeglichen werden, um eine Normalisierung der Expressionsergebnisse zu erreichen und eine Fehlinterpretation in der Analyse zu verhindern. Für diese relative Quantifizierung wurde für jede PAR2-PCR-Probe eine identisch

stimulierte HGAPDH-PCR-Probe mitgeführt. Auch diese wurde jeweils 3 Mal pipettiert. Wenn anschließend die Differenz von  $C_t$ -Gen und  $C_t$ -HGAPDH für jede Probe berechnet wurde, konnten die Proben untereinander verglichen werden. Dies ergab den  $\Delta C_t$ -Wert aus dem sich anschließend die absolute Expression zum Referenzgen (fold expression) des gesuchten Produkts ergeben hatte. Die fold expression ließ sich mit folgender Formel berechnen:

$$\text{RATIO(Zielgen/Referenzgen)} = 2^{-(C_t^{\text{Gen}} - C_t^{\text{Referenz}})} = 2^{-(\Delta C_t)} = \text{fold expression}$$

Zum Vergleich stimulierter und unstimulierter Werte war es nötig die  $\Delta C_t$ -Werte von den Proben der einzelnen Stimulationen mit den  $\Delta C_t$ -Werten der Kontrolle (unstimulierte Zelle) zu verrechnen, indem die Werte voneinander subtrahiert wurden (*Livak and Schmittgen 2001*).

$$\text{RATIO(Zielgen/Referenzgen)} = 2^{-(\Delta C_t^{\text{Gen}} - \Delta C_t^{\text{Referenz}})} = 2^{-(\Delta \Delta C_t)} = \text{relat. Expression}$$

Diese Differenz lieferte den Unterschied an Zyklen zur Erreichung des Schwellenwertes, der wiederum Auskunft über die relative PAR2-Expression nach Stimulation mit DHT in unterschiedlichen Konzentrationen ergab.

### 3.2.8 Fluoreszenzphotometrische Kalziummessungen mit Fura-2

Mit Hilfe dieser Methode können Zellaktivitäten gemessen werden. Durch Stimulation mit dem physiologischen PAR2-Agonisten Trypsin in unterschiedlichen Konzentrationen (3nM; 33nM; 33mM) wurde der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den untersuchten Zelllinien gemessen. Neben der Verwendung des physiologischen Agonisten wurden auch Messungen mit dem spezifischen PAR2-Agonisten S9192 (NH-SLIGKV) durchgeführt.

#### 3.2.8.1 *Eigenschaften des Farbstoffes*

Fura-2 ist ein kalziumsensitiver Fluoreszenzfarbstoff, der durch seine komplexbildenden Eigenschaften mit Kationen Bindungen eingehen kann. Dies ermöglicht eine Quantifizierung von intrazellulären Kalziumionen sowie indirekt eine Darstellung von Kalziumströmen in Zellen denen stimulierende Substanzen zugeführt werden. Je nach Bindung in seinem komplexbildenden Bereich verschiebt sich das UV-Absorptionsspektrum des Farbstoffs hin zu kürzeren Wellenlängen. Er zeichnet sich durch eine hohe Selektivität für freie Kalziumionen aus. Das Absorptionsmaximum für kalziumfreies Fura-2 liegt bei einer Anregungswelle von 362 nm. Die Intensität der Fluoreszenzemission bei kalziumgebundenem Fura-2 hingegen ist am größten, wenn es mit Licht der Wellenlänge 340 nm angeregt wird. Diese Werte werden photometrisch im Intensitätsbereich von 510 nm gemessen. Da sich die Intensitäten der Fluoreszenzemission bei Anregung des Farbstoffs mit Licht der Wellenlänge 362 nm und bei Änderungen der Kalziumkonzentrationen zwischen 0 und 1mM kaum unterscheiden, wird die Intensitätsmessung bei einer Welle der Länge 380 nm durchgeführt. Durch die Bindung von  $Ca^{2+}$  an den Farbstoff Fura-2 zeigt sich in diesem Bereich eine deutlichere Änderung in der Fluoreszenzintensität. Bei etwa 360 nm liegt der sog. „Isosbestische Punkt“, an dem die Fluoreszenz des Farbstoffs unabhängig von der Kalziumkonzentration ist (*Grynkiewicz et al. 1985*). Mit entsprechender Hardware (Photometersystem der Firma PTI; Wedel, Deutschland) und Software (Felix<sup>TM</sup> der Firma PTI; Wedel, Deutschland) kann die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration gemessen und graphisch dargestellt werden.

### 3.2.8.2 *Prinzip der Zwei-Wellenlängenmessung*

Im Normalzustand reichert eine Zelle vor allem freies Fura-2 passiv im Zytosol an, wenn sie mit dem Stoff beladen wird, da die Kalziumkonzentration in diesem Zustand extrazellulär höher ist als intrazellulär. In diesem Fall ist die Intensität der Fluoreszenzemission im Bereich 510 nm bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm höher als bei 340 nm. Kommt es durch eine Anregung der Zelle zum Kalziumeinstrom, dann erhöht sich der Anteil des gebundenen Farbstoffs und somit auch die Intensität der Fluoreszenzemission, die durch Licht der Wellenlänge 340 nm erzeugt wurde. Graphisch dargestellt, steigt die Kurve an, während die Kurve fällt, die durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 380 nm erzeugt wurde, in dem der Anteil des kalziumfreien Farbstoffs und damit auch die Intensität der Fluoreszenzemission absinkt.

Mit Hilfe eines Verhältniswertes, der so genannten „*Ratio*“, die sich aus dem Quotienten der beiden gemessenen Intensitäten berechnen lässt, können Fehler, die beispielsweise durch unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen und Objektdicken entstehen, herausgekürzt werden. Der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg kann dann in einem Intensitäts-Zeit Diagramm graphisch dargestellt werden und ein Anstieg der *Ratio* entspricht dem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration.

### 3.2.8.3 *Versuchsaufbau und Messtechniken*

Die Kalziummessungen fanden an einem Invertoskop (Diaphot 300, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) und einem Küvettensystem (PTI, Wedel, Deutschland) für photometrische Untersuchungen statt. Dieses Photometriesystem der Firma PTI (Wedel, Deutschland) besteht aus einem Monochromator-System (Deltascan, PTI), das aus dem Licht einer 100 W-Xenon-Lampe monochromatisches Licht erzeugt. Das Licht trifft in dem Monochromator-System auf eine rotierende Scheibe, die den Lichtstrahl abwechselnd durch eine Öffnung auf zwei verschiedene Monochromatoren projiziert. Das für die Fura-2 Messungen benötigte Licht mit den Wellenlängen

340 und 380 nm, wird durch ein Glasfaserkabel zum Mikroskop weitergeleitet, dort durch die in der Meßkammer befindlichen Probe gesendet, und anschließend von einem Photomultiplier (Mikroskop-Photometer D-104, PTI) aufgenommen, gemessen und verstärkt. Um nur die gesuchte Emission des Farbstoffs zu messen, wird das emittierte Lichtspektrum vor der Messung im Photomultiplier durch einen Dichroicfilter gesendet und so auf den Wellenlängenbereich um 510 nm reduziert. Das ankommende Licht gibt dann eine Aussage über die Fluoreszenzemissionsintensitäten und kann in ein digitales Signal umgewandelt werden, welches anschließend, mit einer speziell für fluoreszenzphotometrische Messungen entwickelten Software (Felix<sup>TM</sup>, PTI), ausgewertet wird. Die Fluoreszenzänderungen und auch der Verhältniswert (Ratio) zwischen diesen werden in einer Kurve graphisch dargestellt.

#### 3.2.8.4 Kalibrierung des Gerätes

Weil die Ratio ein relativer Wert ist und durch die Stimulation der Zellen während der Versuche das Ausmaß der Fluoreszenzänderungen gestört werden könnte, ist im Vorfeld eine Kalibrierung der Versuchseinrichtung notwendig. Diese wird nach Grynkiewicz mit Hilfe von Eichpufferlösungen, die exakt definierte Kalziumkonzentrationen enthalten, durchgeführt (*Grynkiewicz et al. 1985*). Mit Hilfe der ermittelten Dissoziationskonstanten zwischen Kalzium und dem kalziumgebundenen Fura-2 ( $K_d$ ), sowie der Verhältniswerte der Fluoreszenzintensitäten in kalziumfreiem ( $R_{min}$ ) und kalziumgesättigtem ( $R_{max}$ ) Eichpräparat, kann die intrazelluläre Kalziumkonzentration berechnet werden:



$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times (R - R_{\min} / R_{\max} - R) \times (S_{f2} / S_{b2})$$

$K_d$ :	Dissoziationskonstante der Reaktion zwischen Kalzium und kalziumgebundenem Fura-2
$R$ :	gemessener Verhältniswert der Fluoreszenzemissionsintensitäten bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 340 und 380 nm (Ratio)
$R_{\min}$ :	durch Eichung ermittelter Verhältniswert der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit 340 und 380 nm im kalziumfreien Eichpräparat
$R_{\max}$ :	durch Eichung ermittelter Verhältniswert der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit 340 und 380 nm im kalziumgesättigten Eichpräparat
$S_{f2}$ :	durch Eichung ermittelte Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm im kalziumfreiem Eichpräparat
$S_{b2}$ :	durch Eichung ermittelte Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 340 nm im kalziumgesättigten Eichpräparat

### 3.2.9 Vorbereitung und Durchführung Fluoreszenzphotometrischer Messungen mit Fura-2

#### 3.2.9.1 Kultivierung der Prostatazellen für Küvetten- und Einzelzellmessungen

Die untersuchten Zellen wurden ähnlich wie unter Punkt 3.2.3.1 kultiviert. Nach konfluenter Bewachung der Kultivierungsflaschen wurde eine Subkultivierung vorgenommen. Dafür wurden die Zellen unter Verdünnung in neue Kultivierungsflaschen gegeben. Hierbei wurde das verwendete Kulturmedium abgenommen und 2x mit PBS gewaschen. Im Unterschied zu Punkt 3.2.3.1 wurde kein Trypsin und kein EDTA zu den Zellen gegeben um eine Ablösung dieser von der Unterlage zu erreichen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und anschließend als Lösung in ein Falcon-Röhrchen überführt und 10 Min. bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

entstandene Pellet in Kultivierungsmedium resuspendiert. Die neue Lösung wurde mit einer Pipette durchmischt und die Zellen für die Fluoreszenzmessungen auf runde Deckgläschen in 6-Well-Platten ausgesät.

#### 3.2.9.2 *Beladung der Prostatazellen*

Die Anwendung von Fura-2 erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers Molecular Probes (Leiden, Niederlande). Das Fura wurde in das Zytosol der Zellen eingebracht, um die intrazelluläre Kalziumkonzentration messen zu können. Hierfür war eine Inkubation in einer Fura-2 AM haltigen Pufferlösung notwendig, um eine Beladung der zu messenden Zellen zu erreichen. Für die Beladung wurde das Fura-2 AM (nicht kalziumsensible Acetoxymethyl (AM)-Esterform des Farbstoffs) verwendet. Der Farbstoff permeiert passiv durch die Zellmembran. Die Ester werden intrazellulär durch unspezifische Esterasen gespalten, so dass man einen kalziumsensiblen, polaren Farbstoff erhält, der in der Zelle verbleibt und sich im Zytosol anreichert.

Aus einer 5mmol/l Stammlösung (Fura-2 AM in Dimethylsulfoxid (DMSO)) wurde eine 5µmol/l Lösung in HHBSS-Puffer (PH 7,45) angesetzt. Um eine bessere Verteilung des Farbstoff im wässrigen Puffer zu erhalten, wurde der Inkubationslösung 3µl/ml 10% Pluronic® F-127 hinzugesetzt. So wird die Diffusion des in Wasser schlecht löslichen lipophilen Farbstoffes in die Zellen erleichtert (Yates *et al.* 1992). Anschließend wurden die Zellen für 30-45 Min. bei 32°C im Brutschrank inkubiert, danach die Fura-2 AM-Lösung abpipettiert und 3x mit frischem HHBSS-Puffer gewaschen, um extrazellulär zurückgebliebenes Fura-2 AM zu entfernen. Im Anschluß erfolgte eine 30 minütige Inkubation in HHBSS-Puffer, um eine vollständige Spaltung des Farbstoffes durch intrazelluläre Esterasen zu garantieren.

Im Anschluß wurden dem Puffer folgende Substanzen zugefügt:

CaCl <sub>2</sub>	0,185 mg/l
Glukose	1,090 mg/l
NaHCO <sub>3</sub>	0,252 mg/l

### 3.2.9.3 *Fluoreszenzphotometrische Messungen an Prostatazellen*

#### Küvettenmessungen mit Trypsin:

Für die Küvettenmessungen mit Trypsin wurden die zu untersuchenden Zellen (100.000 Zellen/ml) von den bewachsenen Deckgläschen abgeschabt und in eine mit HHBSS-Pufferlösung gefüllte Küvette gegeben. Die Fluoreszenzmessungen wurden wie nachfolgend erläutert ausgeführt. Unter fortlaufender Messung wurden Stimulationsversuche in den Endkonzentrationen 3nM, 33nM und 33mM Trypsin durchgeführt. Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse zeigen Summationskurven von je 3 Küvettenmessungen.

#### Einzelzellmessungen mit S9192:

Für die Einzelzellmessungen wurde ein mit den zu untersuchenden Zellen bewachsenes Deckgläschen in einer Messkammer plaziert und mit 500µl Pufferlösung beschichtet. Anschließend wurde an einem Invertoskop mit 40-fachem Immersionsobjektiv und 10-fachem Okular (Nikon, Diaphot 300) eine Zelle fokussiert (analog die Küvette) und mit Hilfe des Monochromator-Systems (Deltascan, PTI, Wedel, Deutschland) bei 340 und 380 nm Wellenlänge angeregt. Unter Verwendung des Photomultipliers wurde die Intensität des emittierten Lichts bei 510 nm verstärkt und computerunterstützt als Ratio aufgezeichnet.

Für die Stimulationsversuche mit dem synthetischen PAR2-Agonisten S9192 wurden erneut Deckgläschen in der Messkammer plaziert und mit 500µl Puffer überschichtet. Nach Fokussierung einer Zelle wurden unter fortlaufender Messung S9192 in einer Endkonzentration von 100µM hinzugefügt. Die Aktivität von S9192 wurde nach Erreichen des Fluoreszenzmaximums durch Perifusion mit HHBSS-Puffer beendet.

Bei beiden Messverfahren diente als Positivkontrolle vor jedem Stimulationsversuch eine Messung mit 4-Bromo-Calciumionophor A23187 (Sigma). Dazu wurden 120µl A23187 (50µmol/l HHBSS) unter fortlaufender

Messung zum Puffer hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden Messungen unter Zugabe von HHBSS-Puffer durchgeführt.

### **3.2.10 Proliferationsassay durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation**

Ein Proliferationsassay dient dazu die Veränderung der Teilungsgeschwindigkeit von Zellen, die durch exogen zugeführte Substanzen beeinflusst werden, darzustellen. Mit Hilfe dieser Methode kann gezeigt werden ob der Proteinase aktivierte Rezeptor-2 durch die aktivierende Wirkung des synthetischen PAR2-Agonisten S9192 einen mitogenen Effekt in den untersuchten Zelllinien bewirkt. Ein mitogener Effekt lässt sich durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation ermitteln.

#### *3.2.10.1 Durchführung des Proliferationsassays*

Die Prostatazellen wurden zu 1500 Zellen/Well in 96-Well-Mikrotiterplatten (Falcon, Heidelberg) in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS und P/S/A ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit serumfreien Kulturmedium gewaschen und anschließend in ebenfalls serumfreien Kulturmedium mit dem PAR2-Agonisten S9192 in unterschiedlichen Konzentrationen für zwei Tage inkubiert (S9192 (-log[M])= 11 bis (-log[M])= 5). Die Synthese der DNA wurde durch Inkorporation von [<sup>3</sup>H]-Thymidin an durch Trichloressigsäure ausgefallenes Material gemessen. Die Zellen wurden in den letzten 10h der Zellkultur mit 1µCi/Well (5 Ci/mmol) gepulst. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen, für 5 Min. bei 37°C trypsiniert und anschließend abgeerntet. In 5% TCA (Trichloressigsäure) wurde dann für 15 Min. bei 4°C die DNA ausgefällt. Die ausgefällte DNA wurde 2x mit 95% Ethanol gewaschen, in 1ml NaOH aufgelöst und in einem Flüssigszintillationszähler analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse stellt die prozentuale [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation gegenüber unstimulierten Zellen (nur PBS, ohne S9192) dar.

### 3.2.11 Statistik

Zur statistischen Analyse der Signifikanz des Unterschiedes von stimulierten und unstimulierten Stichproben diente die parametrische Errechnung in Form eines t-Tests für gepaarte Stichproben. Bei diesem Test werden die Mittelwerte zweier unterschiedlicher Variablen verglichen, die unmittelbar miteinander in Beziehung stehen. Es wird geprüft, ob die Erwartungswerte zweier Grundgesamtheiten ungleich, kleiner oder größer sind.

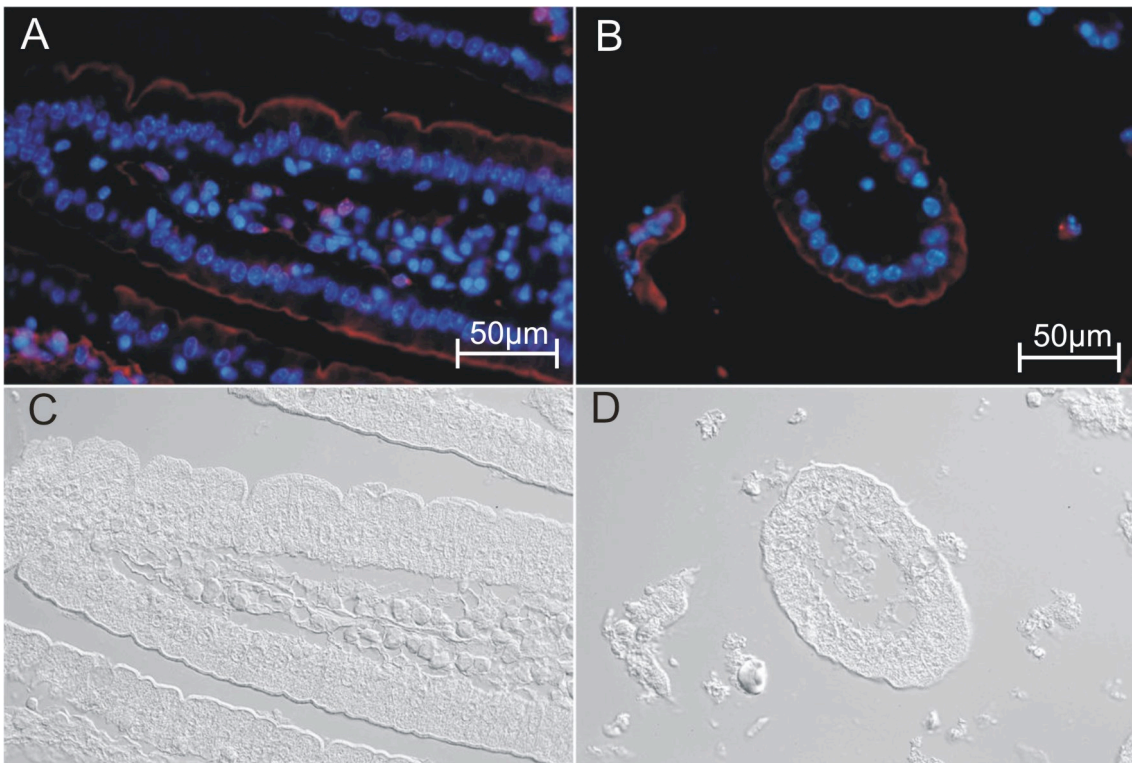
Die Nullhypothese besagt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Proben zu errechnen sind. Mit Hilfe dieses statistischen t-Tests kann begutachtet werden, ob die Nullhypothese verworfen werden kann und damit Unterschiede in den stimulierten Zellen zu erwarten sind. Kann die Nullhypothese nicht verworfen werden unterscheiden sich die Mittelwerte nicht voneinander und es ergibt sich ein t-Wert von Null. Das Signifikanzniveau (p-Wert) wurde  $p \leq 0,05$  gewählt. Dies bedeutet, dass die Nullhypothese bis zu einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zurückgewiesen wird. In diesem Bereich wird von signifikanten Unterschieden in den untersuchten Stichproben gesprochen. Die statistische Analyse wurde mit dem Statistikprogramm *SPSS Statistics 16.0* durchgeführt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Fluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten**

#### **4.1.1 Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im murinen Dünndarmpräparat (Positivkontrolle)**

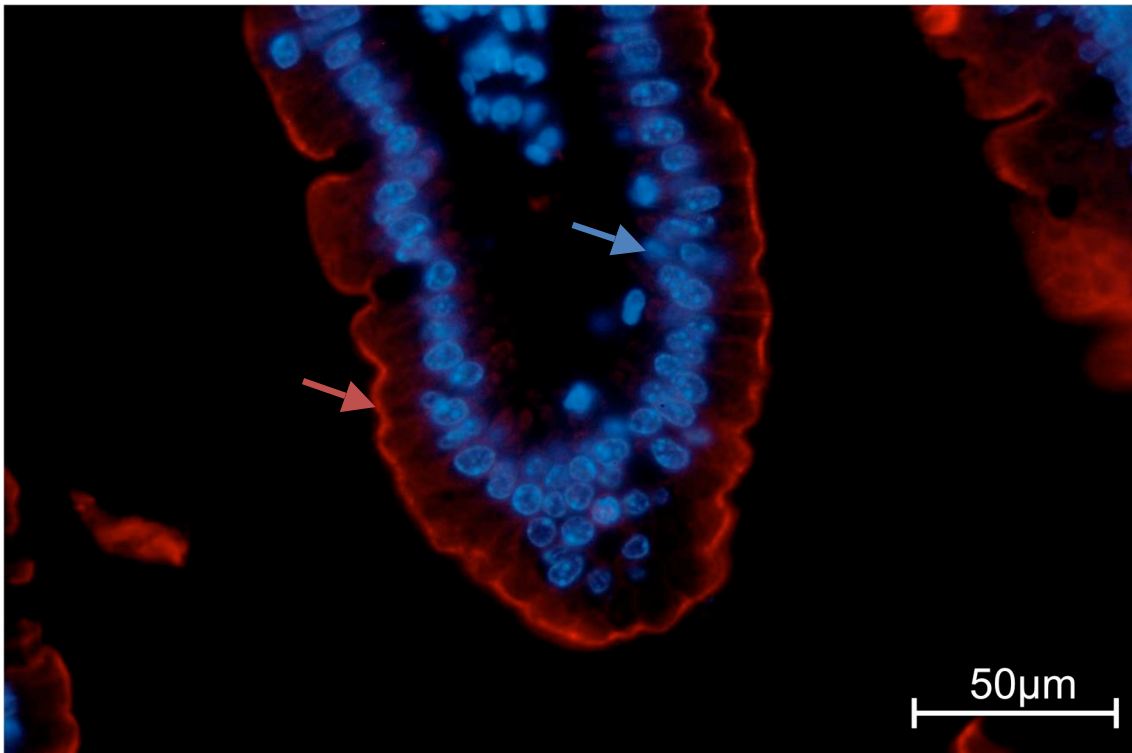
Die Anfertigung des polyklonalen PAR2-Antikörpers wurde bei der Firma SERAMUN Diagnostika, Heidensee, in Auftrag gegeben. Um die Spezifität des Antikörpers (K61) aus dem Kaninchen zu kontrollieren, wurde dieser in Geweben verwendet, wo die PAR2-Expression bereits nachgewiesen werden konnte. Als positive Gewebekontrolle dienten in dieser Arbeit Paraffindünnschnitte des murinen Dünndarms. Die Koppelung mit Cy3 (Carbozyanin-3) an IgG-Antikörper des Kaninchens lassen PAR2 in den Präparaten rot reagieren. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol) blau gefärbt.



**Abbildung 7. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers in Paraffindünnschnitten eines murinen Dünndarms (Positivkontrolle).**

**Bild A.** Immunreaktion des PAR2-Antikörpers K61 (rot) am Längsschnitt einer murinen Dünndarmzotte. Die Immunreaktion zeigt einen kontinuierlichen PAR2-Saum im apikalen Bereich der Enterozyten. Die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt (blau).

**Bild B.** Fluoreszenz des PAR2-Antikörpers im Querschnitt einer murinen Dünndarmzotte. **Bild C und D.** Untersuchte Dünnschnitte im Durchlicht (DIC-Differential Interference Contrast); (Vergrößerung: 200x).



**Abbildung 8. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt eines murinen Dünndarms (Positivkontrolle).**

*Vergrößerter Ausschnitt aus dem Dünnschnitt einer murinen Dünndarmzotte. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers (K61) im apikalen Bereich der Enterozyten (rot/Pfeil). Die Zellkerne sind basal gelegen und lassen sich deutlich mit DAPI (blau/Pfeil) anfärben (Vergrößerung: 400x).*

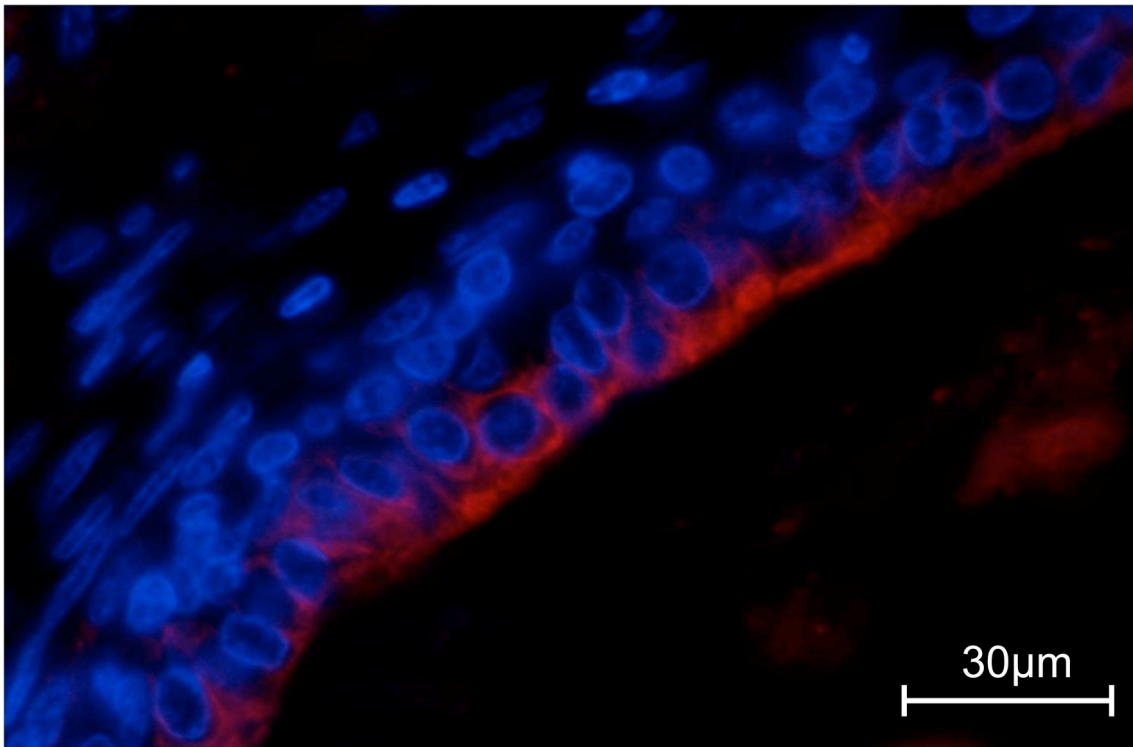
Die Abbildungen 7 und 8 zeigen den Proteinase aktivierten Rezeptor-2 (PAR2) in den Enterozyten einer murinen Dünndarmzotte. Die Zellkernfärbungen erfolgten in diesen und den nachfolgenden Abbildungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI. Die Topographie von PAR2 ließ sich in diesen Präparaten deutlich bestimmen und war im apikalen Bereich der Enterozyten zu sehen. Die Immunreaktion des Antikörpers erschien kontinuierlich und eine Verteilung des Rezeptors war eindeutig zu erkennen. Die Spezifität des PAR2-Antikörpers konnte erfolgreich in der Positivkontrolle getestet werden, so dass



weitere Färbungen an Prostatapräparaten erfolgten, die Aufschluss über topografische Unterschiede in der Lokalisation von PAR2 geben sollten.

#### 4.1.2 Immunreaktion des PAR2-Antikörpers in humanem Prostatagewebe

##### 4.1.2.1 PAR2 in humanem Prostatagewebe



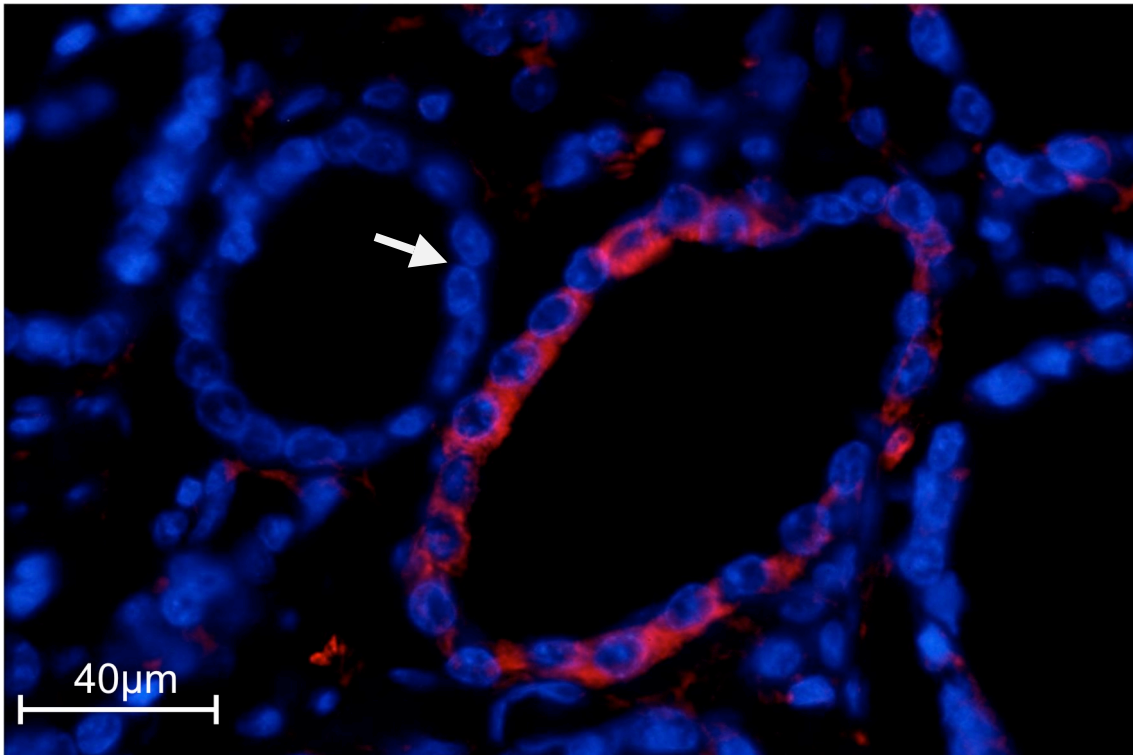
**Abbildung 9. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt einer normalen humanen Prostata.**

*Nachweis und Lokalisation von PAR2 (rot) in normalem humanem Prostatagewebe. Zu erkennen ist eine homogene PAR2-Immunreaktion im apikalen Bereich der Prostataepithelzellen; Zellkerne (blau); (Vergrößerung:600x).*

Abbildung 9 zeigt ein Beispiel des typischen Verteilungsmusters von PAR2 in normalen humanen Prostatagewebe als Vergleichsprobe für pathologisch veränderte Präparate der Prostata. In den Präparaten ließ sich eine eindeutige Verteilung von PAR2 erkennen. Topographisch gesehen befand sich PAR2 auf der apikalen Seite der Prostataepithelzellen. Im Stromalen Gewebe fand keine Immunreaktion des PAR2-Antikörpers statt. Die Zellen des Gewebestromas konnte man deutlich erkennen. Sie waren gekennzeichnet durch ihre länglichen Zellkerne.

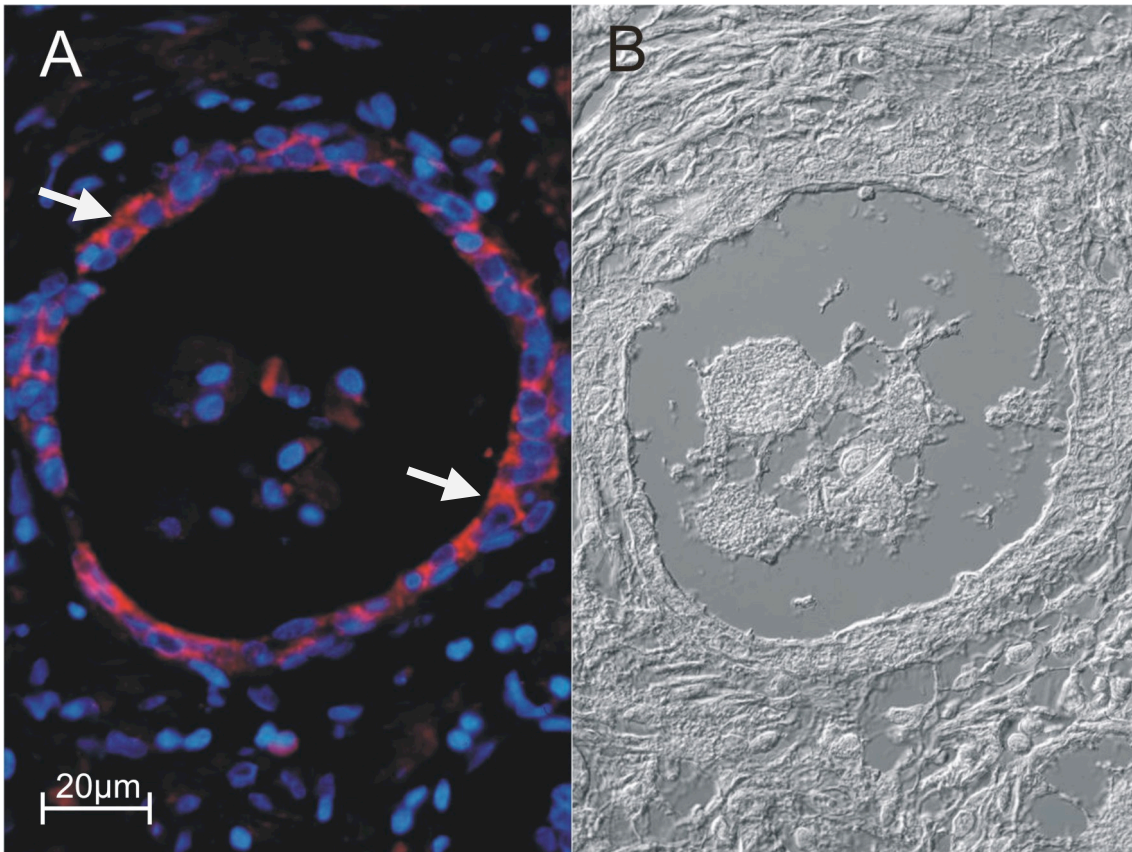
### 4.1.2.2 *PAR2 in pathologisch verändertem Prostatagewebe*

Für die Immunreaktion des PAR2-Antikörpers in pathologisch verändertem Prostatagewebe wurden Präparate von dem Institut für Pathologie der Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um jeweils 3 Präparate einer atypischen adenomatösen Hyperplasie (AAH), eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms (PCa) und einer benignen Prostatahyperplasie (BPH). Nachfolgend werden typische Beispiele im Verteilungsmuster von PAR2 in den Prostataerkrankungen gezeigt. Welche Unterschiede in der Lokalisation von PAR2 gegenüber normalem Prostatagewebe zu erkennen sind, zeigen folgende Abbildungen.



**Abbildung 10. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt einer atypischen adenomatösen Hyperplasie der Prostata (AAH).**

Der PAR2-Antikörper reagiert unregelmäßig und nicht ubiquitär in den Prostataepithelzellen dieser Erkrankung. Die Immunreaktion erscheint nicht kontinuierlich und ist nicht eindeutig apikal ausgerichtet. Eine Vielzahl von Drüsenlumina zeigen keine Immunreaktion des Antikörpers (Pfeil); Zellkerne (blau); (Vergrößerung:400x).



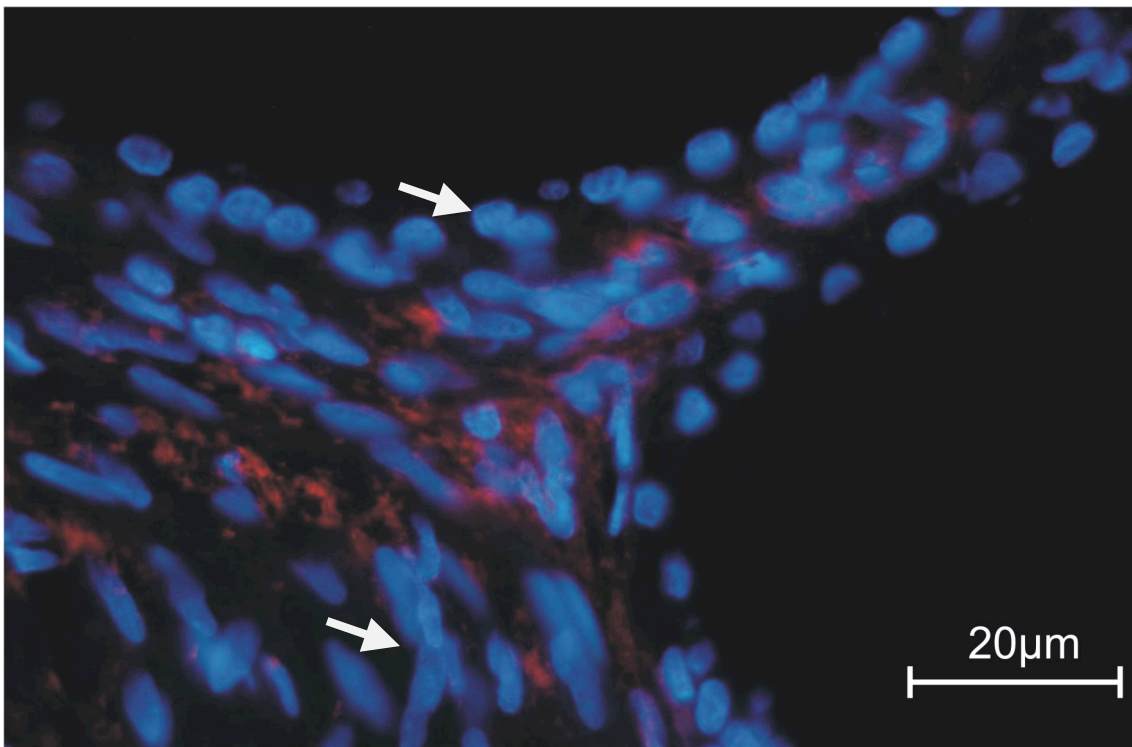
**Abbildung 11. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt eines Prostatakarzinoms (PCa).**

**Bild A.** Fluoreszenzfärbung mit PAR2-Antikörper (rot) im Präparat eines humanen Prostatakarzinoms. Die PAR2-Lokalisation ist unregelmäßig in den Epithelzellen. Sowohl luminal als auch basale Verteilung des Rezeptors sind auf diesem Dünnschnitt zu erkennen (Pfeile); Zellkerne (blau). **Bild B.** Präparat in chromatischem Durchlicht (DIC); (Vergrößerung: 200x).

In Abbildung 10 und 11 sind maligne Veränderungen der Prostata dargestellt. Die AAH kann als potentielle Präkanzerose neben der HG-PIN gewertet werden. Im Vergleich zu den Präparaten des PCa zeigte sich in den Dünnschnitten der AAH deutliche Unterschiede in der Anordnung und Größe der Zellkerne. Am Beispiel der AAH wirkten die Zellkerne hyperplastisch und rund, was für eine erhöhte Mitoserate sprechen könnte. In den Präparaten des

PCa waren eine unregelmäßige Verteilung und Entrundung der Zellkerne zu erkennen. Dies ist ein Indiz für die Auflösung eines Zellverbandes mit unkontrolliertem Zellwachstum und Durchbruch der Basalmembran.

Für beide Erkrankungen gilt in Bezug auf PAR2 eine nicht eindeutige Lokalisation an der apikalen Seite des Epithels, wie man es bei der Vergleichsprobe der normalen Prostata erkennen konnte (Abbildung 9).



**Abbildung 12. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers im Paraffindünnschnitt einer benignen Prostatahyperplasie (BPH).**

Ausschnitt aus einer benignen Prostatahyperplasie (BPH). Sowohl epitheliale Anteile, als auch stromale Anteile der Prostata wurden angeschnitten. Im Epithel dieses Präparates findet sich keine Immunreaktion. Die Lokalisation von PAR2 erscheint im stromalen Gewebe des Organs (rot). Deutlich zu erkennen sind die durch DAPI (blau) angefärbten Zellkerne des Epithels (rund) und des fibromuskulären Gewebes (länglich) (Pfeile); (Vergrößerung: 600x).

Neben den malignen Erkrankungen wurden in dieser Arbeit auch benigne Erkrankungen der Prostata (BPH) immunhistochemisch untersucht. Im Gegensatz zu den malignen Veränderungen, zeigten sich in den Präparaten der BPH gravierende Unterschiede in der Topographie von PAR2. Während sich der Rezeptor in malignen und normalen Geweben der Prostata hauptsächlich in den Epithelzellen darstellen ließ, befand sich in der benignen Veränderung der Prostata kein PAR2. Wie man der Abbildung 12 entnehmen kann, schien es zu einer vermehrten Expression von PAR2 im stromalen Gewebe der Prostata zu kommen.

Ob die Expression von PAR2 ebenso wie die Ätiologie der untersuchten Erkrankungen eine androgenabhängige Komponente besitzt, sollen die folgenden Untersuchungen in den *in vitro*-Modellen des Prostatakarzinoms und der benignen Prostatahyperplasie zeigen.

**Tabelle 3. Immunreaktion des PAR2-Antikörpers in den untersuchten Geweben der Prostata.**

Überblick über das topographische Vorkommen von PAR2 in den untersuchten Geweben der Prostata (n=3) (++) = stark vertreten; + = vertreten; - = nicht vertreten).

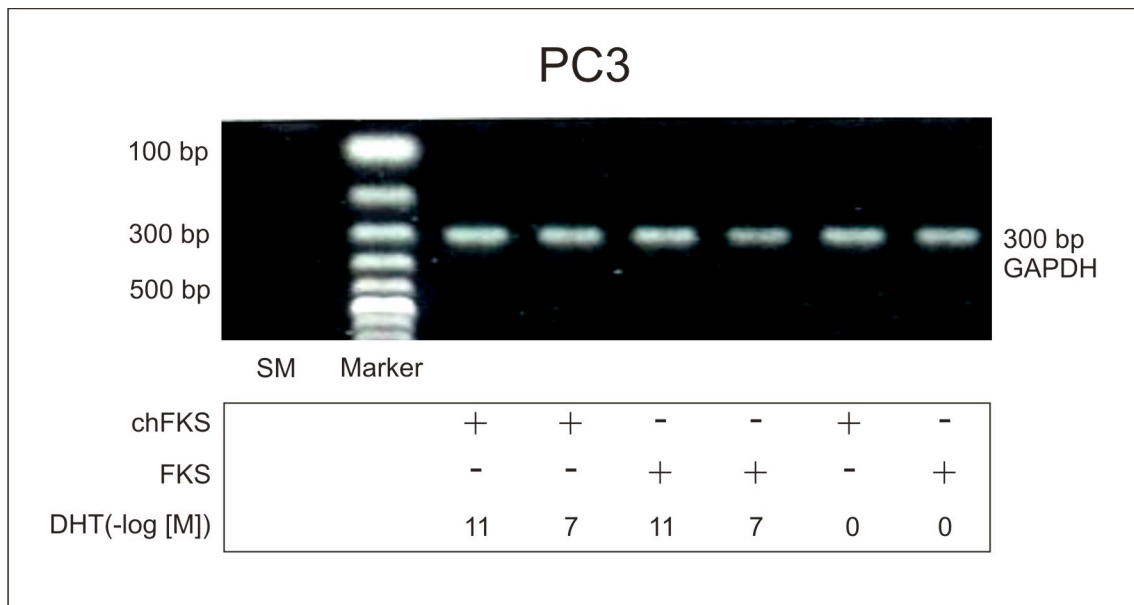
	Prostata	AAH	PCa	BPH
epithelial apikal	++	+	+	-
epithelial basolateral	-	+	++	-
epithelial diffus	-	++	++	-
stromal	-	-	-	++

## 4.2 Semi-quantitative RT-PCR

### 4.2.1 Quantifizierung mit HGAPDH

Wie unter Punkt 3.2.6.1. beschrieben, wurden bei diesen Versuchen die Dichten der durch Ethidiumbromid fluoreszierenden Amplifikate gemessen und miteinander verglichen. Die Messungen erfolgten mit dem Computerprogramm GelScan 3D V2.5.

#### 4.2.1.1 Quantifizierung am Beispiel von PC3



**Abbildung 13. Quantifizierung der epihelialen Zelllinie PC3 (Größe 300bp).**

Fluoreszenzabgleich mit dem „Housekeeping Gen“ HGAPDH der unterschiedlich stimulierten Proben für die Zelllinie PC3 auf 1,5% Agarosegel. Die Gelbanden mussten gleiche Fluoreszenzwerte aufweisen, um RT-PCR mit PAR2-Primern durchzuführen.

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestripptem fetalem Kälberserum;

**FKS** = Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteronkonzentration der stimulierten Proben;

**SM** = Supermix

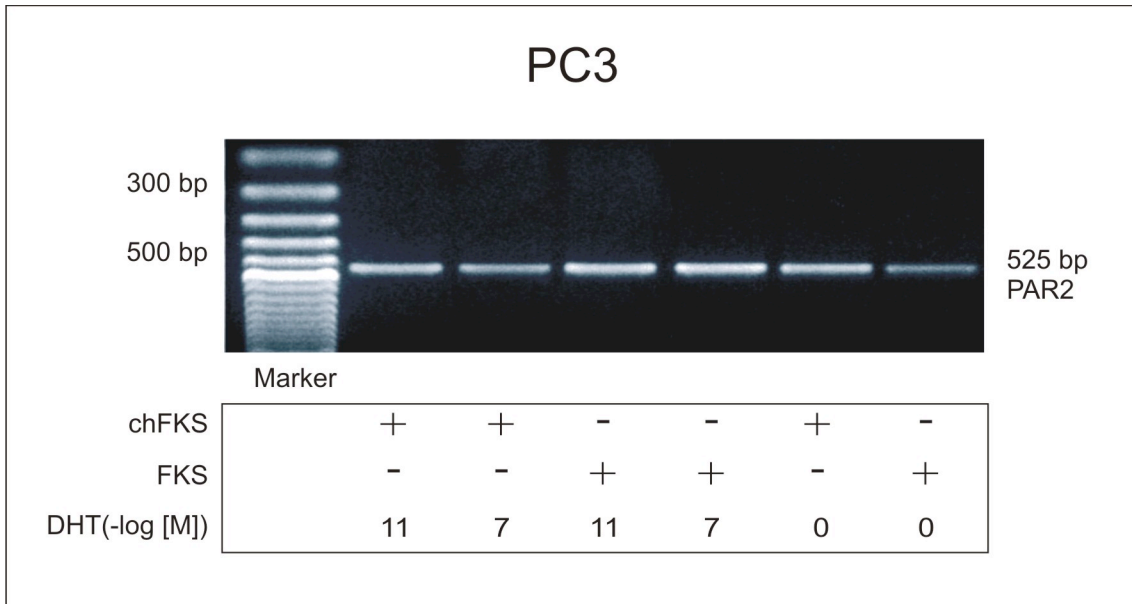
**Marker** = 100 bp Marker

Die Abbildung 13 zeigt ein 1,5% Agarosegel bei der ein Abgleich mit dem HKG HGAPDH am Beispiel von PC3 durchgeführt wurde. Der Abgleich erfolgte durch Anpassung der  $\mu$ l-Mengen der für die PCR benötigten cDNA der unterschiedlich stimulierten Proben der Zelllinie. Die Bandendichten wurden mit dem Computerprogramm GelScan 3D V2.5 quantifiziert. Die HKG-Primer amplifizierten HGAPDH-Fragmente der Größe 300bp. Um in den nachfolgenden Versuchen eine Aussage über eine androgenabhängige Expression von PAR2 treffen zu können, war es notwendig durch eine Quantifizierung aller einzelnen Proben eine identische Bandendichte auf dem 1,5% Agarosegel zu erreichen. Erst wenn alle Banden identische Fluoreszenzwerte aufwiesen, wurden RT-PCR mit den PAR2-Primern durchgeführt.



## 4.2.2 Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern

### 4.2.2.1 Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie PC3



**Abbildung 14. Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie PC3.**

Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 unter DHT-Einfluss auf 1,5% Agarosegel in der Zelllinie PC3; **FKS stimulierte Proben:** deutliche Fluoreszenzzunahmen; **chFKS stimulierte Proben:** Fluoreszenzreduktion und damit eine geringere Expression von PAR2 bei steigender DHT-Konzentration.

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestripptem fetalem Kälberserum;

**FKS** = Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteron-Konzentration der stimulierten Proben;

**SM** = Supermix

**Marker** = 100 bp Marker

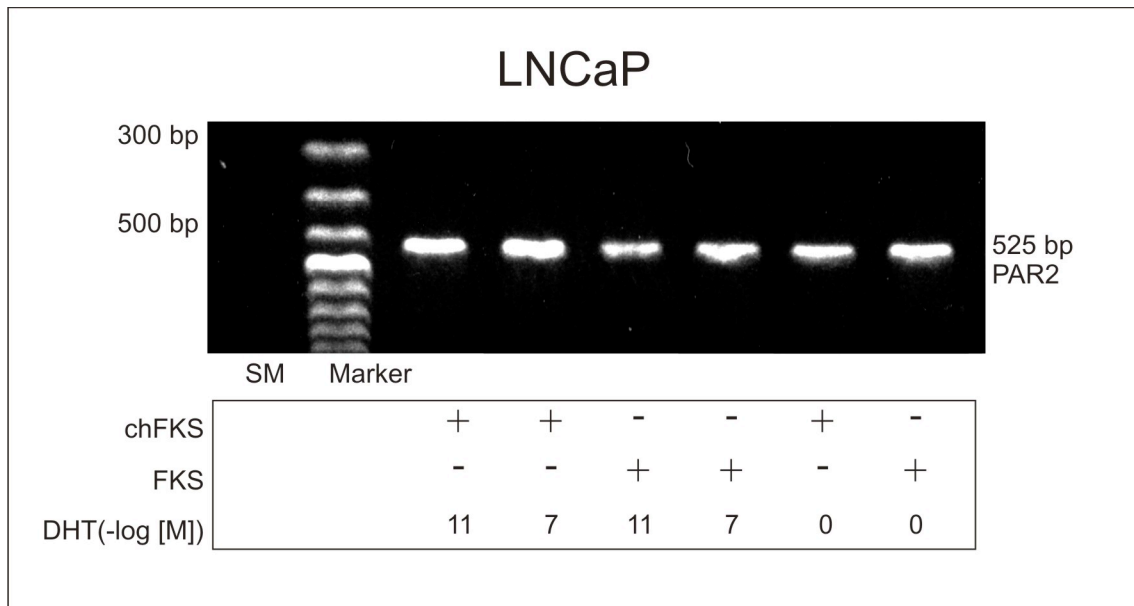
Die Abbildung 14 zeigt die Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 in der Zelllinie PC3 nach 24 stündiger Stimulation in DHT-haltigen Kulturmedien. Die Expression des Rezeptors wird sowohl in gestripptem Kulturmedium (chFKS) als auch in normalem Kulturmedium (FKS) mit unterschiedlichen DHT-Konzentrationen gezeigt. Die gemessene Intensität der fluoreszierenden

Banden nahm gesamthaft ab je höher die Konzentration von DHT ( $10^{-11}\text{M} = +2,23\%$ ;  $10^{-7}\text{M} = -25,57\%$ ) in der Zellkultur gewählt wurde. Dies sprach für eine geringere Expression von PAR2 in der untersuchten Zelllinie nach Stimulation mit DHT in aufsteigender Konzentration in gestripptem Kulturmedium (chFKS). Eine androgenabhängige Expression von PAR2 war in dieser Zelllinie unter Verwendung des gestrippten Mediums (steroidhormonfreies Medium) zu erkennen. Eine Aussage über eine androgenabhängige Expression von PAR2 in FKS-haltigem Kulturmedium konnte ebenfalls getroffen werden, da deutliche Unterschiede in der Dichte der stimulierten Probenbanden gegenüber der unstimulierten Probenbande gemessen werden konnten. Die Expression von PAR2 lag bei beiden untersuchten DHT-Konzentrationen mehr als doppelt so hoch exprimiert vor als bei der Kontrollprobe ( $10^{-11}\text{M} = +127,18\%$ ;  $10^{-7}\text{M} = +139,08\%$ ).

**Tabelle 4. Prozentuale Expressionsänderungen von PAR2 in der Zelllinie PC3.** Die Fluoreszenzunterschiede wurden mittels GelScan 3D gemessen und die optischen Dichten der fluoreszierenden Probenbanden mit der Kontrollprobe verglichen. Der Prozentsatz ergibt sich als relativer Fluoreszenzunterschied gegenüber der unstimulierten Kontrollprobe (Kontrolle = 100%).

Fluoreszenzunterschied in %	chFKS	FKS
DHT (-log[M]) = 11	+ 2,23 ↑	+ 127,18 ↑↑
DHT (-log[M]) = 07	- 25,57 ↓	+ 139,08 ↑↑

## 4.2.2.2 Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie LNCaP



**Abbildung 15. Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie LNCaP.**

Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie LNCaP; **chFKS stimulierte Proben:** deutliche Fluoreszenzzunahmen; **FKS stimulierte Proben:** Fluoreszenzreduktion und damit eine geringere Expression von PAR2 bei steigender DHT-Konzentration.

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestripptem fetalem Kälberserum;

**FKS** = Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteron-Konzentration der stimulierten Proben;

**SM** = Supermix

**Marker** = 100 bp Marker

Die Expression von PAR2 verhielt sich in der epithelialen Zelllinie LNCaP ebenfalls androgenabhängig. Anders als in PC3-Zellen war die Expression in Bezug zu den gewählten Kulturmedien entgegengesetzt. Die Abbildung 15 zeigt, dass die Expression von PAR2 in chFKS-haltigem Kulturmedium im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe deutlich erhöht vorlag. Es lagen

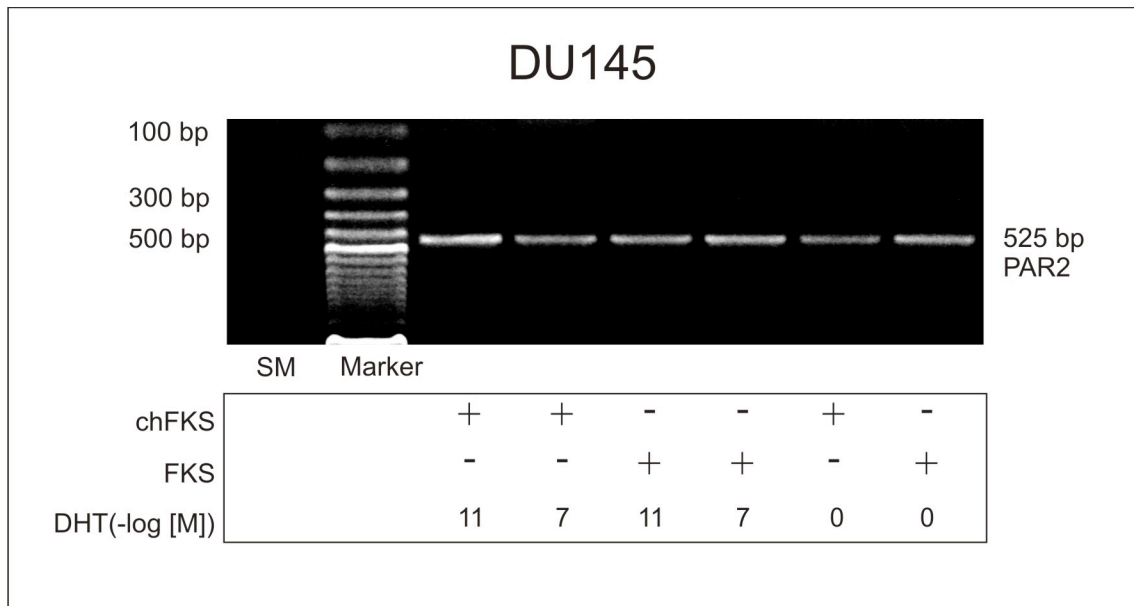
keine Unterschiede in der Expression der DHT-stimulierten Proben vor ( $10^{-11}\text{M} = +25,11\%$ ;  $10^{-7}\text{M} = +39,09\%$ ). Umgekehrt verhielten sich die DHT-stimulierten Proben in FKS-haltigem Kulturmedium. Hier konnte man beobachten, dass die Dichte der Probenbande abnahm und damit die Expression des Rezeptors bei steigender DHT-Konzentration sank ( $10^{-11}\text{M} = +24,88\%$ ;  $10^{-7}\text{M} = +7,91\%$ ).

**Tabelle 5. Prozentuale Expressionsänderungen von PAR2 in der Zelllinie LNCaP.**

Die Fluoreszenzunterschiede wurden mittels GelScan 3D gemessen und die optischen Dichten der fluoreszierenden Probenbanden mit der Kontrollprobe verglichen. Der Prozentsatz ergibt sich als relativer Fluoreszenzunterschied gegenüber der unstimulierten Kontrollprobe (Kontrolle = 100%).

Fluoreszenzunterschied in %	chFKS	FKS
DHT (-log[M]) = 11	+ 25,11 ↑	- 24,88 ↓
DHT (-log[M]) = 07	+ 39,08 ↑	- 7,91 ↓

## 4.2.2.3 Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie DU145



**Abbildung 16. Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie DU145.** Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie DU145; **chFKS stimulierte Proben:** zunächst deutliche Fluoreszenzzunahme, bei steigender DHT-Konzentration nahm die Dichte der Gelbanden und damit die Expression des PAR2 wieder ab; **FKS stimulierte Proben:** Expression von PAR2 verhielt sich genau entgegengesetzt.

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestripptem fetalem Kälberserum;

**FKS** = Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteron-Konzentration der stimulierten Proben;

**SM** = Supermix

**Marker** = 100 bp Marker

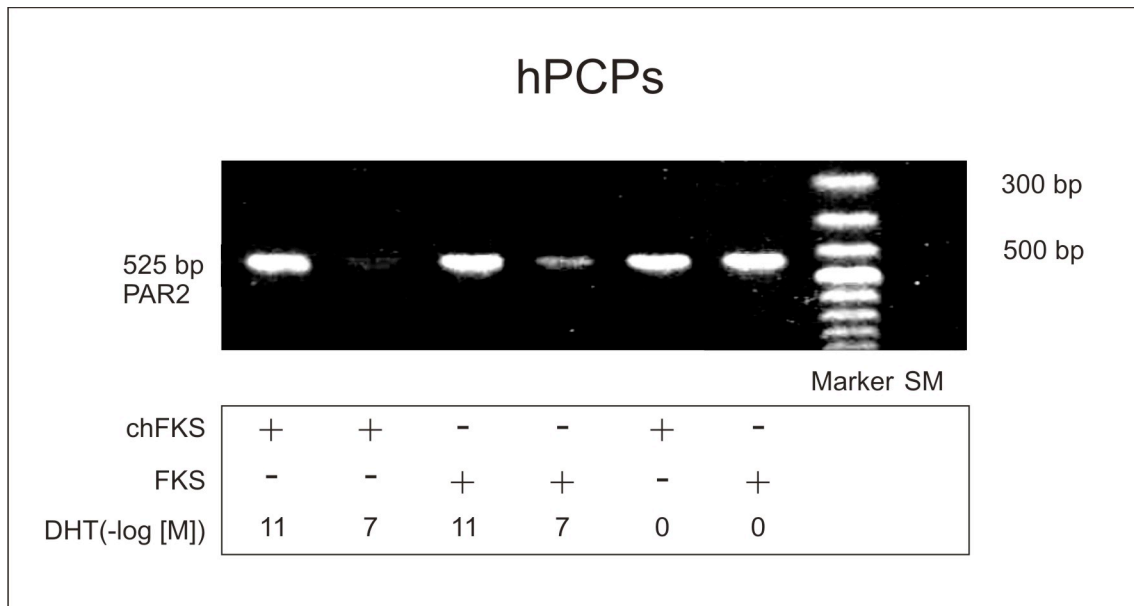
Die Expression von PAR2 verhielt sich in dem *in vitro* Modell der Zelllinie DU145 ebenfalls androgenabhängig. Zunächst erhöhte sich die gemessene Intensität der Probenbanden in chFKS-haltigem Kulturmedium um mehr als das Doppelte ( $10^{-11}\text{M}$  = +159,38 %). Bei zunehmender DHT-Konzentration fiel die Intensität in Richtung Referenzwert ab ( $10^{-7}\text{M}$  = +31,63 %). In FKS-haltigem

Kulturmedium verhielten sich die Proben in der Tendenz genau entgegengesetzt ( $10^{-11}\text{M} = -7,96\%$ ;  $10^{-7}\text{M} = +9,54\%$ ).

**Tabelle 6. Prozentuale Expressionsänderungen von PAR2 in der Zelllinie DU145.** Die Fluoreszenzunterschiede wurden mittels GelScan 3D gemessen und die optischen Dichten der fluoreszierenden Probenbanden mit der Kontrollprobe verglichen. Der Prozentsatz ergibt sich als relativer Fluoreszenzunterschied gegenüber der unstimulierten Kontrollprobe (Kontrolle = 100%).

Fluoreszenzunterschied in %	chFKS	FKS
DHT (-log[M]) = 11	+ 159,38 ↑	- 7,96 ↓
DHT (-log[M]) = 07	+ 31,63 ↑	+ 9,54 ↑

## 4.2.2.4 Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie hPCPs



**Abbildung 17. Semi-quantitative RT-PCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie hPCPs.**

Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie hPCPs; **chFKS stimulierte Proben und FKS stimulierte Proben:** Reduktion der gemessenen Intensität und damit geringere Expression von PAR2 bei steigender DHT-Konzentration.

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestrippte fetalem Kälberserum;

**FKS** = Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteron-Konzentration der stimulierten Proben;

**SM** = Supermix

**Marker** = 100 bp Marker

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden wie für die Zelllinien PC3, LNCaP und DU145. Hier zeigte sich sowohl in FKS-haltigem als auch in chFKS-haltigem Kulturmedium, dass die Expression von PAR2 bei steigender Konzentration von DHT ( $10^{-11}$ M;  $10^{-7}$ M) abnahm.

Anders als in den Karzinomzelllinien reduzierte sich die Expression von PAR2 in stromalen hPCPs-Zellen in beiden untersuchten Kulturmedien.

Die gemessene Intensität und damit die Expression von PAR2 in FKS-haltigem Kulturmedium nahm bei steigender DHT-Konzentration erkennbar ab ( $10^{-11}\text{M} = -1,53\%$ ;  $10^{-7}\text{M} = -75,13\%$ ). In chFKS-haltigem Medium war die reduzierte Expression noch deutlicher zu verzeichnen ( $10^{-11}\text{M} = +12,76\%$ ;  $10^{-7}\text{M} = -98,05\%$ ). Grund für dieses Expressionsverhalten kann der unterschiedliche Steroidgehalt der verwendeten Kulturmedien sein. Um ein durch das Kulturmedium verfälschtes Ergebnis zu verhindern, wurde für die Versuche der QPCR das Hauptaugenmerk auf stimulierte Proben in gestripptem Kulturmedium (chFKS) gerichtet. Unterschiedliche Expressionen von PAR2 sind dann eindeutig auf die variierenden DHT-Konzentrationen zurückzuführen.

**Tabelle 7. Prozentuale Expressionsänderungen von PAR2 in der Zelllinie hPCPs.**  
Die Fluoreszenzunterschiede wurden mittels GelScan 3D gemessen und die optischen Dichten der fluoreszierenden Probenbanden mit der Kontrollprobe verglichen. Der Prozentsatz ergibt sich als relativer Fluoreszenzunterschied gegenüber der unstimulierten Kontrollprobe (Kontrolle = 100%)

Fluoreszenzunterschied in %	chFKS	FKS
DHT (-log[M]) = 11	+ 12,76 ↑	- 1,53 ↓
DHT (-log[M]) = 07	- 98,05 ↓	- 75,13 ↓



### 4.3 Real Time-PCR (QPCR)

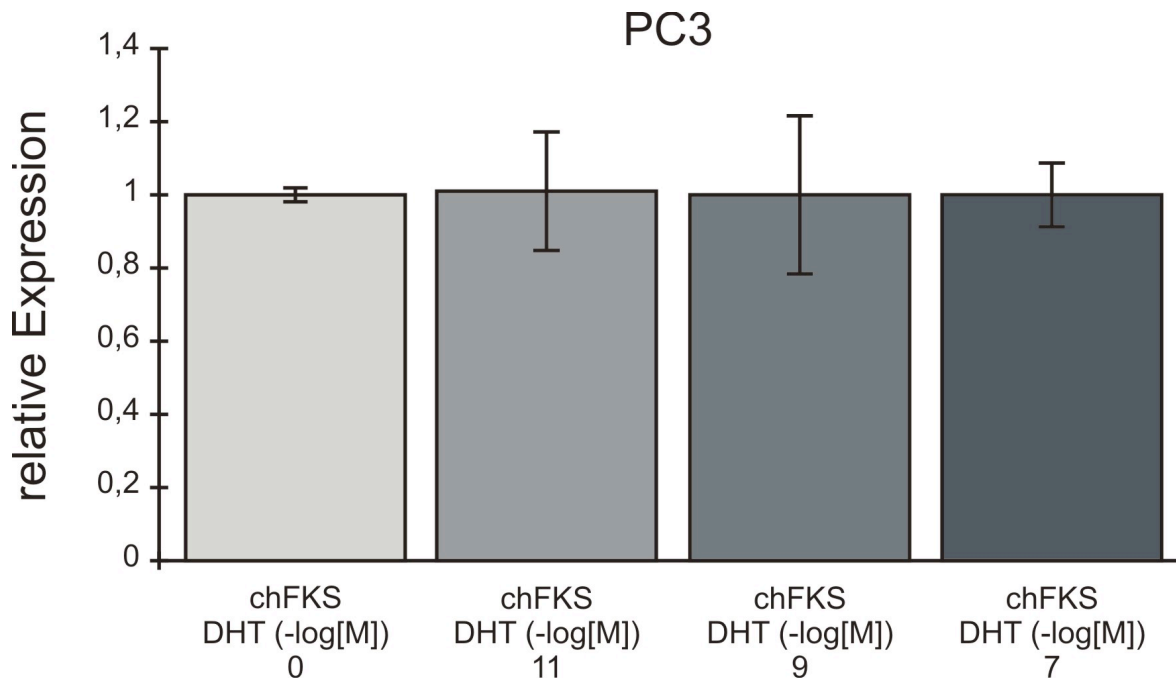
Die QPCR wurde unter ähnlichen Bedingungen wie die semi-quantitative RT-PCR durchgeführt. Um quantitative Ergebnisse für dieses *in vitro*-Versuchsmodell zu erhalten, wurden weitere Untersuchungen mit Zellproben vorgenommen, die ausschließlich in chFKS-haltigem Kulturmedium stimuliert wurden. Diese Versuchsanordnung kann den Fokus auf hormonfreie Anfangsbedingungen richten und Ergebnisse liefern, die eindeutig auf eine DHT-Stimulation zurückzuführen sind. Weiterhin wurden die Zellen mit einer weiteren DHT-Konzentration (DHT(-log[M]=9)) stimuliert, um eine genauere Beschreibung des Stimulationseffektes für die PAR2-Expression zu erreichen.

Mit Hilfe der QPCR lassen sich aufgrund der in Echtzeit gemessenen Fluoreszenzen der cDNA, quantitativ und qualitativ hochwertige Ergebnisse für eine androgenabhängige Expression von PAR2 in den zu untersuchenden Zelllinien bestimmen. Die dargestellten Ergebnisse zeigen keine absoluten Werte, sondern die relative Expression in Bezug zu dem unstimulierten Kontrollwert um einen besseren Überblick in der graphischen Darstellung zu erhalten.

Die Daten der QPCR wurden durch die Gerätesoftware des QPCR-Blocks Mx3000P der Firma Stratagen berechnet und dokumentiert. Für jede stimulierte Probe wurde ein Triplet pipettiert und mit den Mittelwerten der ermittelten  $C_t$ -Werte weitere Berechnungen durchgeführt. Dafür wurden diese Werte anschließend in das Computerprogramm Excel, Microsoft importiert und konnten dort, wie unter 3.2.7.1 beschrieben, ausgewertet und in Relation gesetzt werden.

### 4.3.1 QPCR mit PAR2-Primern

#### 4.3.1.1 Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie PC3



**Abbildung 18. QPCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie PC3.**

Relative Expression der stimulierten Proben in Bezug zu ihrem unstimulierten Kontrollwert. Die Expression von PAR2 zeigt bei zunehmender DHT-Konzentration keine signifikanten Unterschiede ( $n=6$  Präparationen); ( $p \geq 0,05$ ).

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestripptem fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteron-Konzentration der stimulierten Proben;

In Abbildungen 18 sind die zusammengefassten Ergebnisse von unterschiedlichen RNA-Präparationen der epithelialen Zelllinie PC3 ( $n=6$ ) dargestellt. Die Abbildung präsentiert die relative Expression der unterschiedlich stimulierten Proben zu ihrem unstimulierten Referenzwert. Dem Kontrollwert wurde aus Vergleichsgründen der Wert 1 zugeordnet. Die Berechnungen ergaben, dass keine Aussage über ein androgenabhängiges

Expressionsverhalten von PAR2 in der Zelllinie PC3 getroffen werden konnte. Die Unterschiede der stimulierten Proben gegenüber dem Referenzwert waren nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ), so dass die Expression von PAR2 in dieser Zelllinie nicht androgenabhängig war.

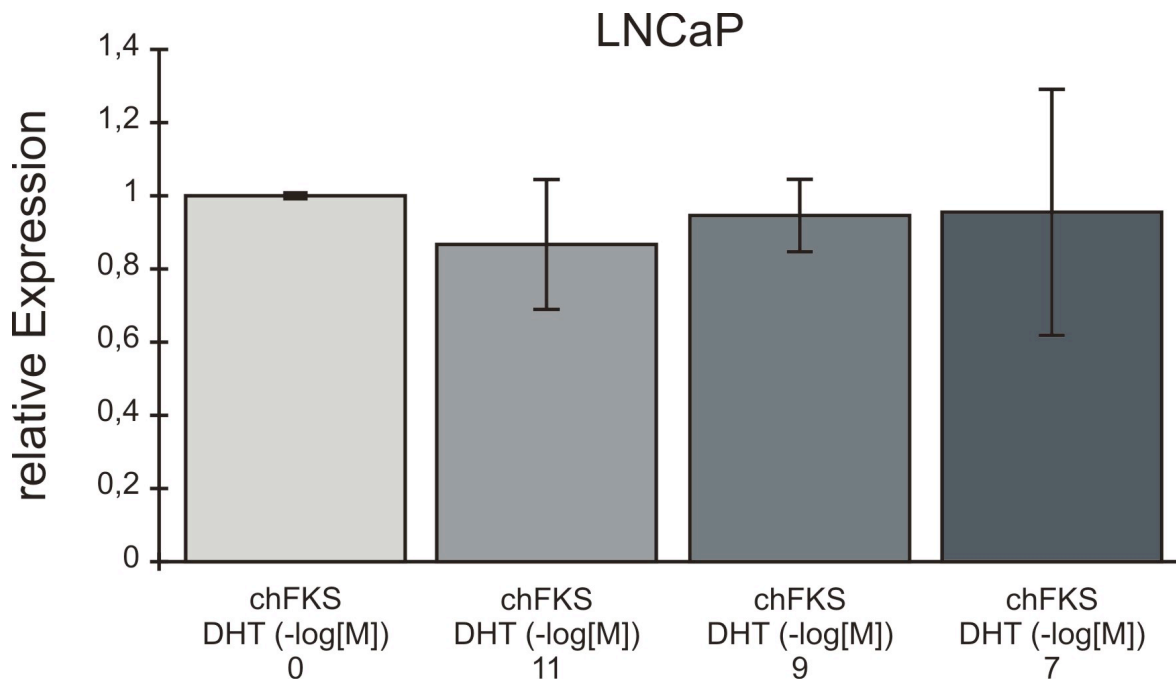
**Tabelle 8. Relative Expression von PAR2 in PC3-Zellen.**

Die Ergebnisse wurden relativ gegenüber dem unstimulierten Referenzwert ermittelt und sind nachfolgend mit ihren Standardfehlern (mean=  $\pm$  s.e.) aufgelistet (n=6). Es kann keine Aussage über eine androgenabhängige Expression von PAR2 in der epithelialen Zelllinie PC3 getroffen werden. Die Unterschiede stimulierter Proben und dem Referenzwert waren nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

DHT (-log[M])	11	9	7
rel. Expression	1,01 $\pm$ 0,16	1.07 $\pm$ 0,21	1,00 $\pm$ 0,08

Relation	Signifikanz
unstimuliert – DHT 11	p=0,845
unstimuliert – DHT 9	p=0,913
unstimuliert – DHT 7	p=0,706
DHT 11 – DHT 9	p=0,736
DHT 11 – DHT 7	p=0,978
DHT 9 – DHT 7	p=0,765

## 4.3.1.2 Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie LNCaP



**Abbildung 19. QPCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie LNCaP.**

Relative Expression der stimulierten Proben in Bezug zu ihrem unstimulierten Kontrollwert. Die Expression von PAR2 zeigt bei zunehmender DHT-Konzentration in gestripptem Medium keine signifikanten Unterschiede ( $n=6$  Präparationen); ( $p \geq 0,05$ ).

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestripptem fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteron-Konzentration der stimulierten Proben;

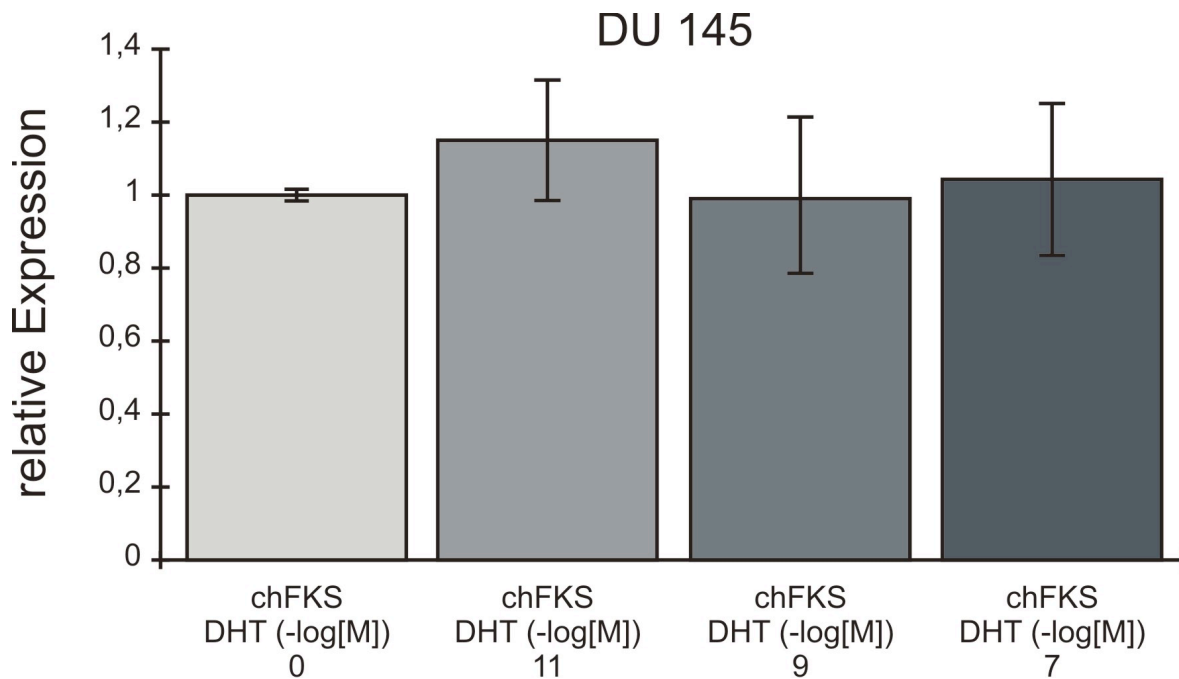
In der epithelialen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP ließ sich ebenfalls keine androgenabhängige Expression von PAR2 nachweisen. Eine steigende Expression bei zunehmender DHT-Konzentration ließ sich erahnen, jedoch lagen hier keine signifikanten Unterschiede vor ( $p \geq 0,05$ ); (Tab.9).

**Tabelle 9. Zusammenfassung der relativen Expression von PAR2 in LNCaP-Zellen.** Die Ergebnisse wurden relativ gegenüber dem unstimulierten Referenzwert ermittelt und sind nachfolgend mit ihren Standardfehlern (mean=  $\pm$  s.e.) aufgelistet (n=6). Es kann keine Aussage über eine androgenabhängige Expression von PAR2 in der epithelialen Zelllinie LNCaP getroffen werden. Die Unterschiede stimulierter Proben zum Referenzwert waren nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

DHT (-log[M])	11	9	7
rel. Expression	0,87 $\pm$ 0,18	0,94 $\pm$ 0,09	0,96 $\pm$ 0,33

Relation	Signifikanz
unstimuliert – DHT 11	p=0,447
unstimuliert – DHT 9	p=0,513
unstimuliert – DHT 7	p=0,866
DHT 11 – DHT 9	p=0,653
DHT 11 – DHT 7	p=0,681
DHT 9 – DHT 7	p=0,976

## 4.3.1.3 Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie DU145



**Abbildung 20. QPCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie DU145.**

Relative Expression der stimulierten Proben in Bezug zu ihrem unstimulierten Kontrollwert. Die Expression von PAR2 zeigt bei zunehmender DHT-Konzentration in gestripptem Medium keine signifikanten Unterschiede ( $n=6$  Präparationen); ( $p \geq 0,05$ ).

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestripptem fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteron-Konzentration der stimulierten Proben;

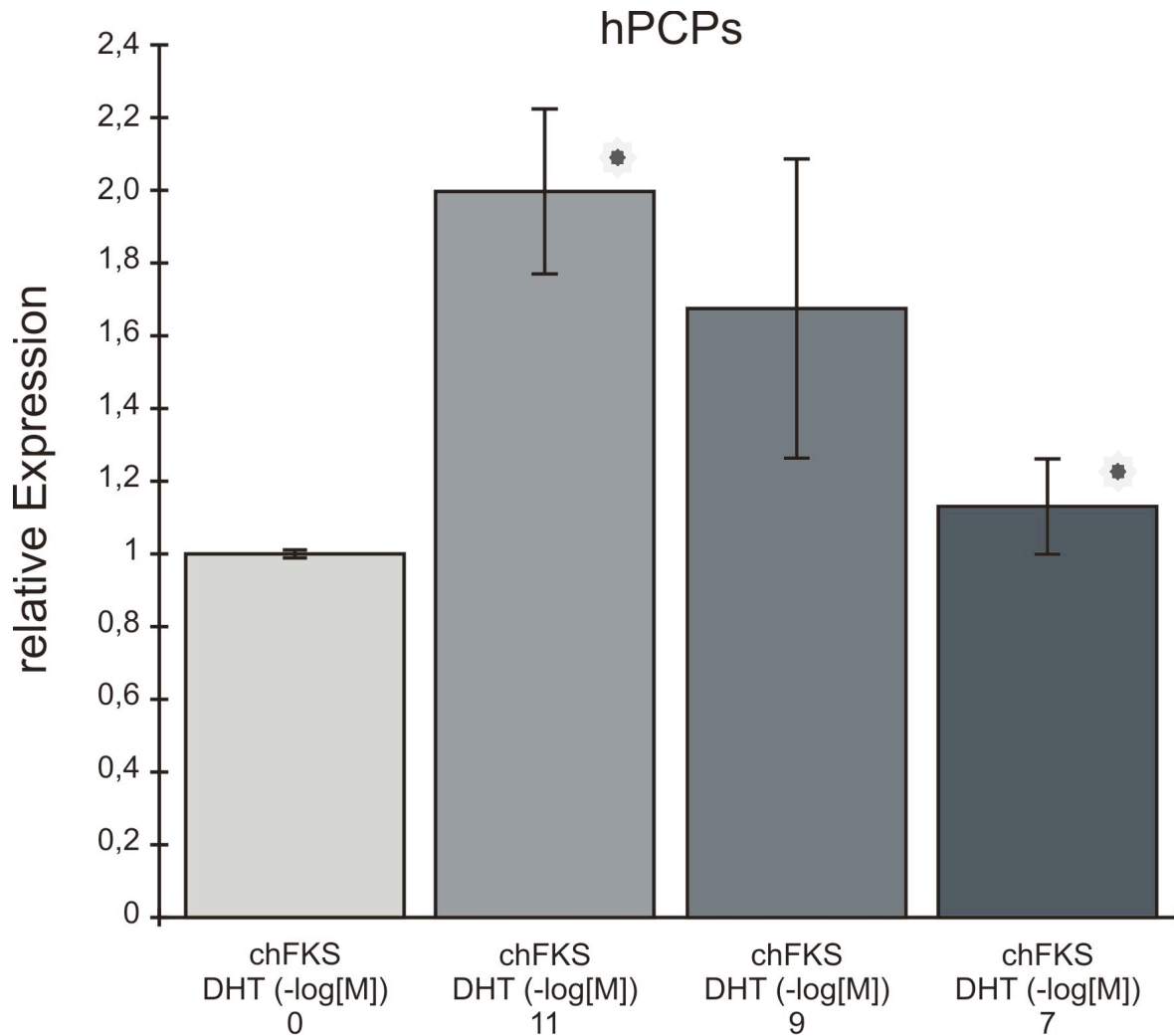
Ebenso wie die Zelllinien PC3 und LNCaP zeigte auch die epitheliale Prostatakarzinomzelllinie DU145 keine signifikanten Unterschiede in der Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 durch DHT-Stimulation ( $p \geq 0,05$ ); (Tab.10).

**Tabelle 10. Zusammenfassung der relativen Expression von PAR2 in DU145-Zellen.** Die Ergebnisse wurden relativ gegenüber dem unstimulierten Referenzwert ermittelt und nachfolgend mit ihren Standardfehlern (mean=  $\pm$  s.e.) aufgelistet (n=6). Es kann keine Aussage über eine androgenabhängige Expression von PAR2 in der epithelialen Zelllinie LNCaP getroffen werden. Die Unterschiede stimulierter Proben zum Referenzwert waren nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ).

DHT (-log[M])	11	9	7
rel. Expression	1,15 $\pm$ 0,17	0,99 $\pm$ 0,21	1,04 $\pm$ 0,21

Relation	Signifikanz
unstimuliert – DHT 11	p=0,598
unstimuliert – DHT 9	p=0,762
unstimuliert – DHT 7	p=0,961
DHT 11 – DHT 9	p=0,365
DHT 11 – DHT 7	p=0,680
DHT 9 – DHT 7	p=0,846

## 4.3.1.4 Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss in der Zelllinie hPCPs



**Abbildung 21. QPCR mit PAR2-Primern in der Zelllinie hPCPs.**

Relative Expression der stimulierten Proben in Bezug zu ihrem unstimulierten Kontrollwert. Die Expression von PAR2 zeigt unter DHT-Stimulation in gestripptem Medium signifikante Unterschiede gegenüber dem Referenzwert. Auch bei steigender Konzentration ist ein signifikanter Unterschied in der Expression des Rezeptors zu erkennen (n=4 Präparationen); ( \* =  $p \leq 0,05$ ).

**chFKS** = Kulturmedium mit 10 % Charcoal-gestripptem fetalem Kälberserum;

**DHT(-log [M])** = Dihydrotestosteron-Konzentration der stimulierten Proben;



---

Im Gegensatz zu den epithelialen Zelllinien fand in den stimulierten Proben der stromalen Zelllinie hPCPs eine Änderung der Expression von PAR2 unter DHT-Einfluss statt. Durch die Stimulation der Zellen mit DHT der Konzentration ( $-\log[M] = 11$ ) nahm die Expression des Rezeptors um fast die doppelte Menge zu (rel. Expression= 1,99;  $p= 0,023$ ). Durch weitere Stimulation mit höheren Konzentrationen von DHT ( $-\log[M]= 09$  und  $07$ ) nahm die Expression von PAR2 gegenüber dem vorherigen Wert (rel. Expression= 1,99) nahezu bis auf den Referenzwert ab (rel. Expression= 1,13;  $p= 0,047$ ).

Die Ergebnisse der QPCR korrelierten tendenziell mit den semi-quantitativen Ergebnissen zuvor, und zeigten eine Reduktion der PAR2-Expression durch Erhöhung der DHT-Konzentration. Die Ergebnisse beider PCR-Verfahren präsentierten deutlich die Tendenz einer androgenabhängigen PAR2-Expression in hPCPs-Zellen. Im Unterschied zu den epithelialen Zelllinien PC3, LNCaP und DU145 konnte quantitativ eine signifikante Verminderung der PAR2-Expression bei steigender DHT-Konzentration in der stromalen Zelllinie gezeigt werden ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 11. Zusammenfassung der relativen Expression von PAR2 in hPCPs-Zellen.** Die Ergebnisse wurden relativ gegenüber dem unstimulierten Referenzwert ermittelt und sind nachfolgend mit ihren Standardfehlern (mean=  $\pm$  s.e.) dargestellt (n=4). Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Expression von PAR2 gegenüber dem Referenzwert ( $p=0,023$ ) und den stimulierten Proben untereinander ( $p=0,047$ ) gezeigt werden. Eine Aussage über eine androgenabhängige Expression von PAR2 in der stromalen Zelllinie hPCPs kann somit getroffen werden ( $p\leq 0,05$ ).

DHT (-log[M])	11	9	7
rel. Expression	1,99 $\pm$ 0,22	1,67 $\pm$ 0,41	1,13 $\pm$ 0,13

Relation	Signifikanz
unstimuliert – DHT 11	$p=0,023^*$
unstimuliert – DHT 9	$p=0,206$
unstimuliert – DHT 7	$p=0,441$
DHT 11 – DHT 9	$p=0,564$
DHT 11 – DHT 7	$p=0,047^*$
DHT 9 – DHT 7	$p=0,151$

## 4.4 Fluoreszenzphotometrische Messungen mit Fura-2

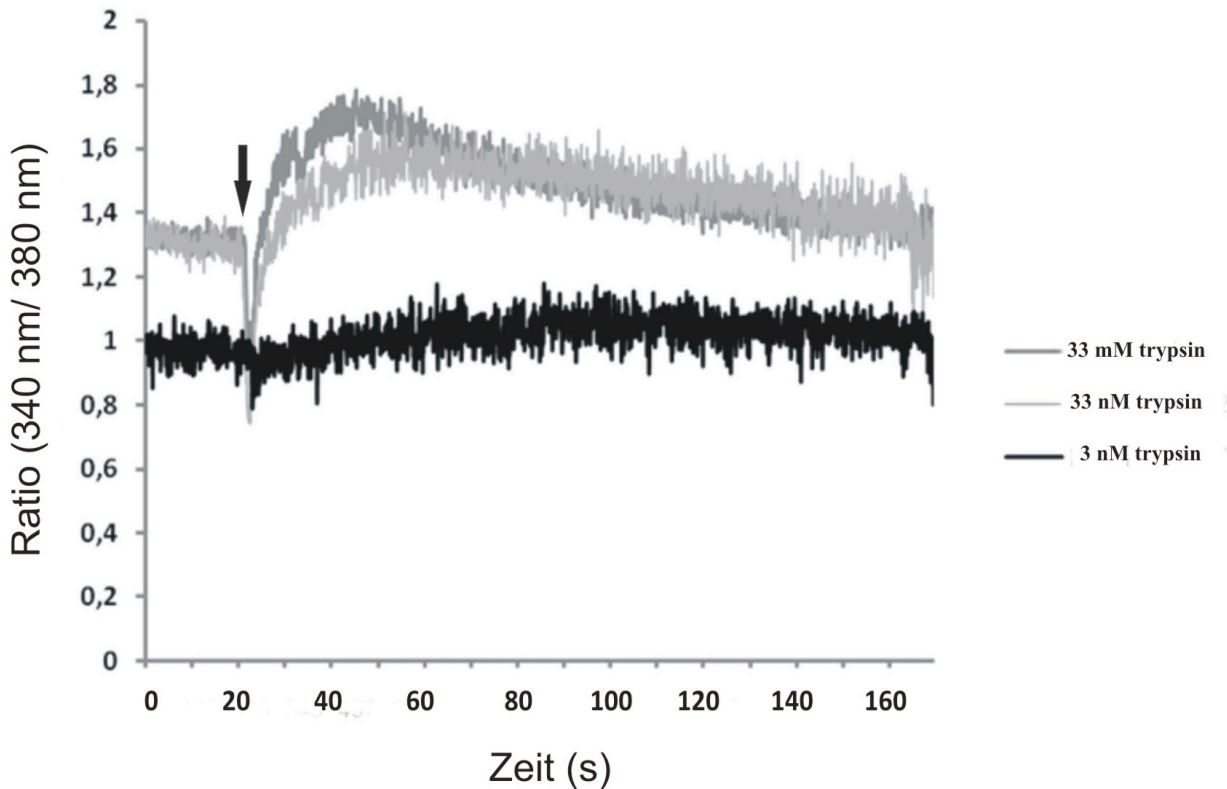
### 4.4.1 Küvettenmessungen mit dem physiologischen PAR2-Agonisten Trypsin

Zusammengefasst zeigen die bis hier dargestellten Ergebnisse, dass die Prostatakarzinomzelllinien PC3, LNCaP und DU145 und auch die stromale Zelllinie hPCPs einer benignen Prostatahyperplasie den Proteinase aktivierten Rezeptor-2 exprimieren. Die Expression von PAR2 in den epithelialen Zelllinien konnte bereits beschrieben werden (*Li and Sarkar 2002; Wilson et al. 2004*), allerdings ist die Anwesenheit von PAR2 in stromalen hPCPs-Zellen eine neue Feststellung.

Um die Aktivität des Rezeptors in den Zelllinien zu bestimmen, wurden Fluoreszenzphotometrische Küvettenmessungen mit Fura-2 durchgeführt. Die Aktivierung von PAR2 führt mit Hilfe des physiologischen Agonisten Trypsin zu einem  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Ein intrazellulärer Kalziumanstieg resultiert aus der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion, die durch PAR2 vermittelt wird. Die extrazelluläre Proteolyse des Rezeptors induziert intrazellulär durch G-Proteine vermittelt die Aktivität von Kinasen und Second messengern (PLC,  $IP_3$ , DAG,) die wiederum in der Lage sind Kalzium aus den zellulären Speichern zu mobilisieren. Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration lässt somit Rückschlüsse auf die Aktivität des Rezeptors schließen.

In diesem Versuch wurde die Aktivität von PAR2 auf den Zelllinien sowohl mit dem physiologischen Agonisten Trypsin, als auch mit dem synthetischen PAR2-Agonisten S9192 (NH-SLIGKV) in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Der spezifische Agonist S9192 bewirkt ausschließlich eine PAR2-Aktivierung und weist somit eine Aktivität des Rezeptors nach. Die graphische Darstellung der Küvettenmessungen zeigt in jeder Kurve jeweils die Summation von drei Stimulationen (n=3).

#### 4.4.1.1 $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort nach Trypsinstimulation von epithelialen Prostatakarzinomzellen PC3

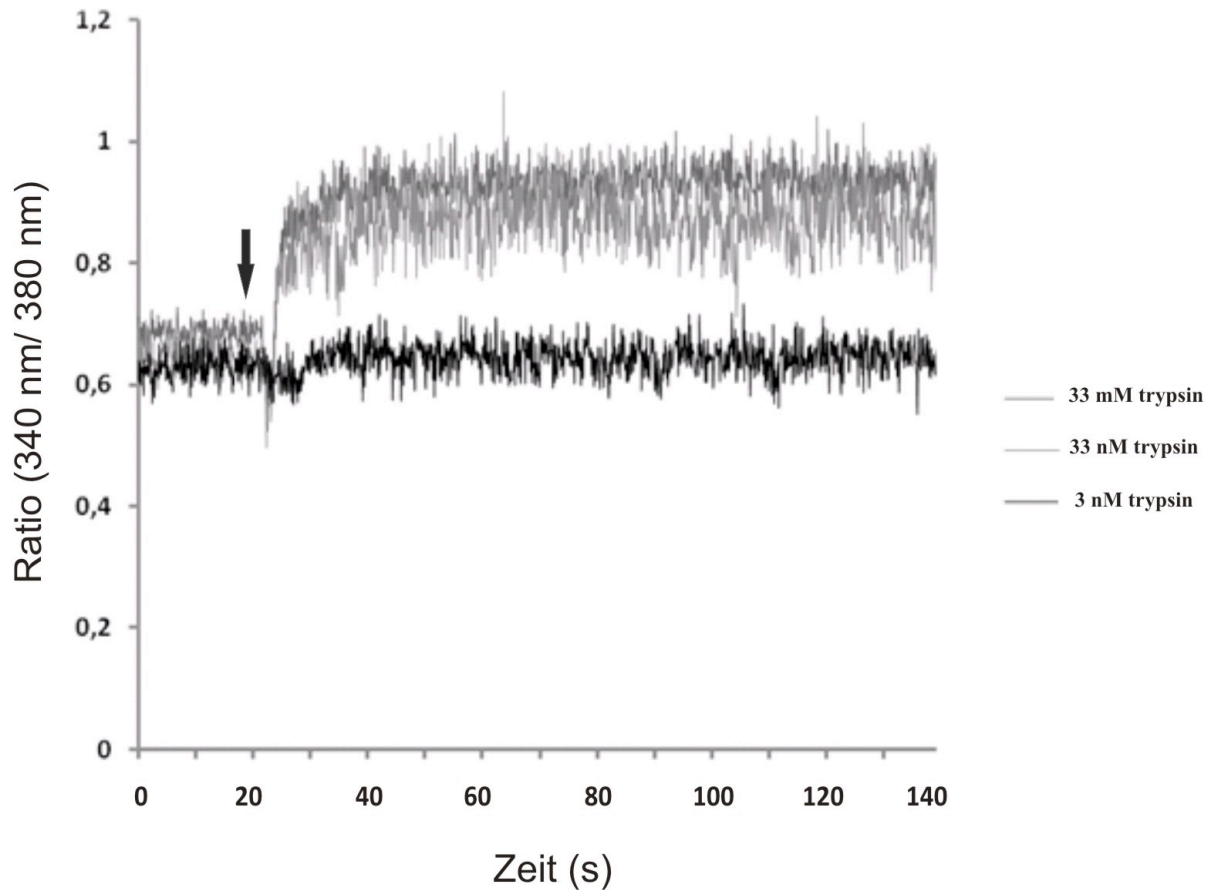


**Abbildung 22.  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin in PC3-Zellen.**

$[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in PC3-Zellen durch Zugabe von Trypsin (Pfeil) in unterschiedlichen Konzentrationen (3 nM; 33 nM; 33 mM). Je höher die Konzentration von Trypsin gewählt wird, desto stärker ist die  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort; (Summation von  $n=3$  Stimulationen).

Abbildung 22 stellt die Kalziummobilisation in PC3-Zellen nach Zugabe des physiologischen PAR2-Agonisten Trypsin in unterschiedlichen Konzentrationen dar. Die Zellen reagierten bei Trypsinkonzentrationen von 33 nM und 33 mM mit einem reversiblen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg. Die Ratio änderte sich bei Zugabe von 33 mM Trypsin von 1,35 auf 1,78. Eine Zugabe von 33 nM bewirkte einen Anstieg der Ratio auf 1,67. Die Maxima der Ratio wurden nach ca. 30 Sek. erreicht. Bei einer Konzentration von 3 nM Trypsin wurde kein  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg beobachtet.

#### 4.4.1.2 $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort nach Trypsinstimulation von epithelialen Prostatakarzinomzellen LNCaP



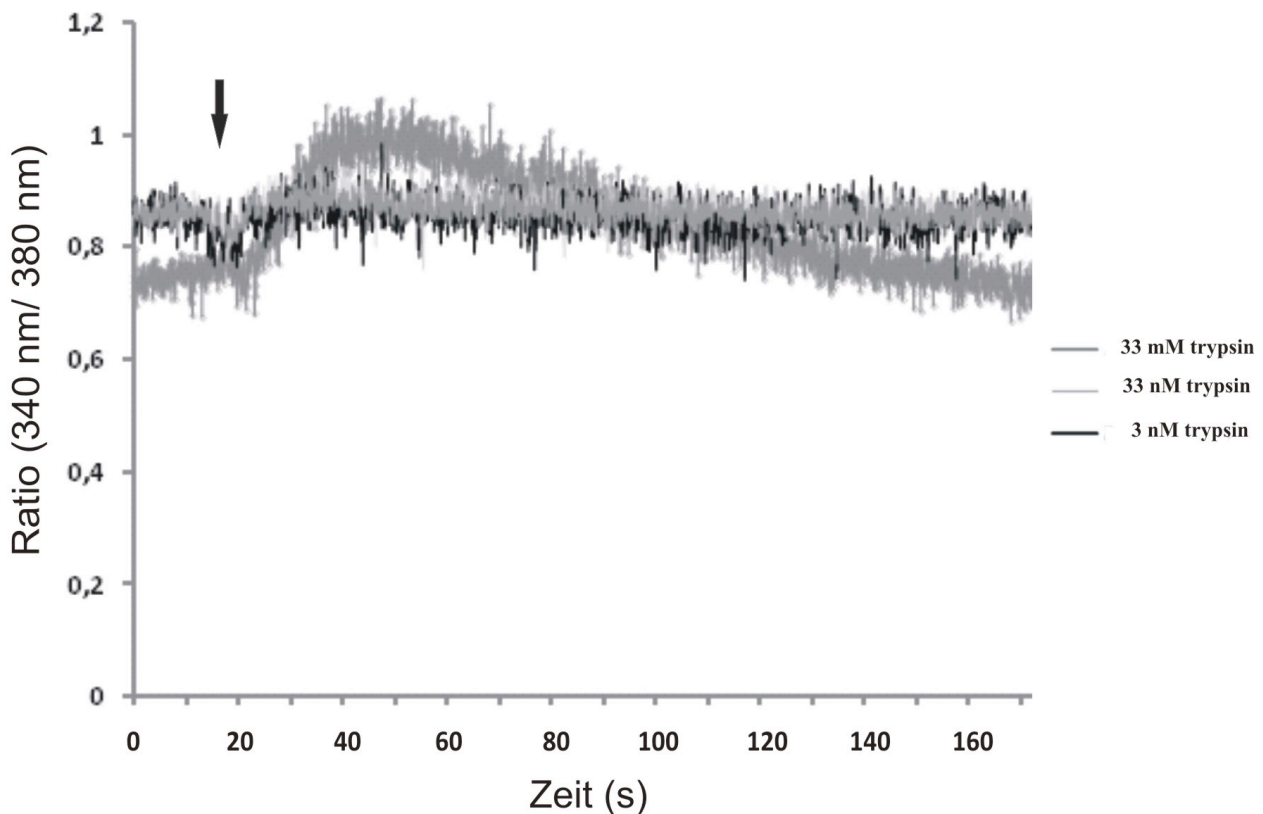
**Abbildung 23.  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin in LNCaP-Zellen.**

$[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in LNCaP-Zellen durch Zugabe von Trypsin (Pfeil) in unterschiedlichen Konzentrationen (3 nM; 33 nM; 33 mM). Je höher die Konzentration an Trypsin gewählt wird, desto stärker ist die  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort; (Summation von  $n=3$  Stimulationen).

Die Zellen der epithelialen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP reagierten wie die PC3-Zellen bei Konzentrationen von 33 nM und 33 mM mit einem intrazellulären Kalziumanstieg. Hier konnte man erkennen, dass die Änderung der Ratio nach Trypsinzugabe (Ratio: 0,70 - 0,94) deutlich niedriger war und somit auch die Kalziumantwort geringer ausfiel als in PC3-Zellen. Es fiel auf, dass LNCaP-Zellen im Vergleich zu PC3-Zellen deutlich mehr Zeit benötigten

um Kalzium in die zellulären Speicher zu retransportieren. Es schien als würde die Stimulation mit Trypsin einen nicht transienten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg von Kalzium bewirken.

#### 4.4.1.3 $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort nach Trypsinstimulation von epithelialen Prostatakarzinomzellen DU145



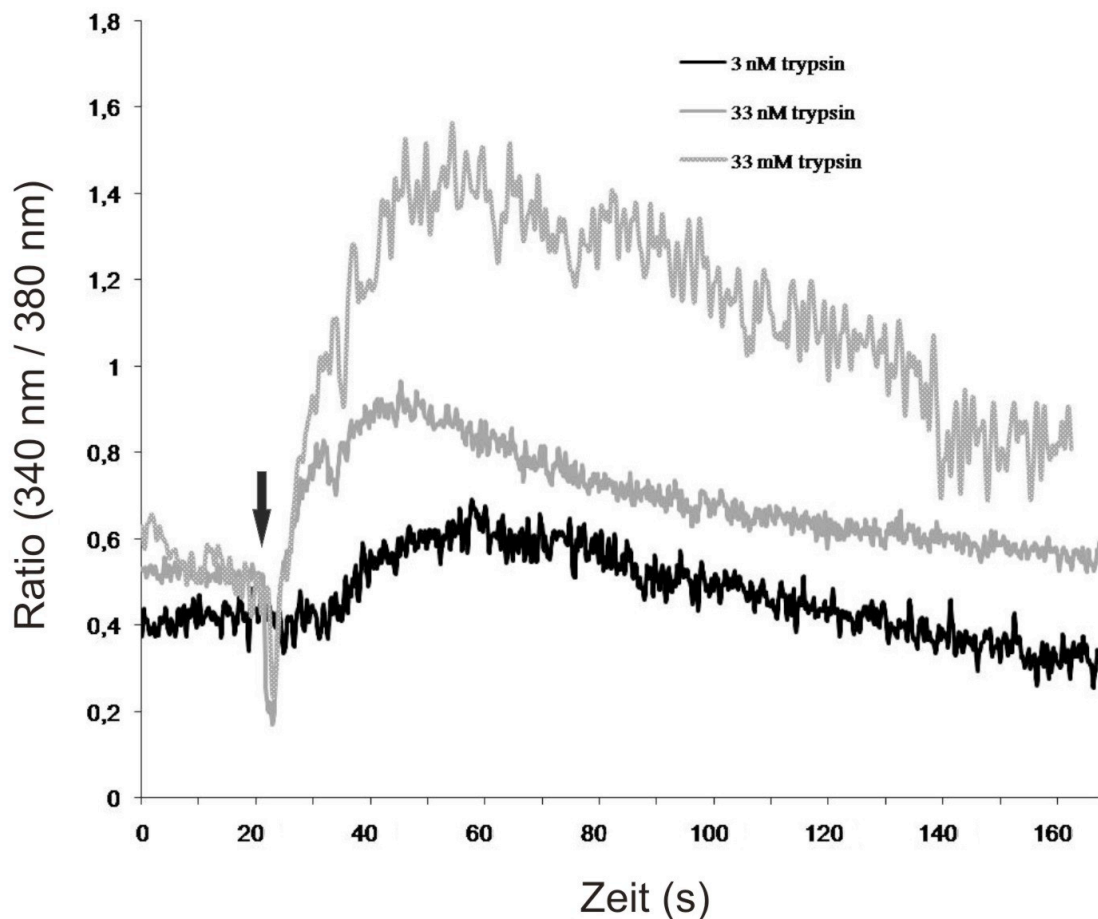
**Abbildung 24.  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin in DU145-Zellen.**

$[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in DU145-Zellen durch Zugabe von Trypsin (Pfeil) in unterschiedlichen Konzentrationen (3 nM; 33 nM; 33 mM). Hier reagieren die Zellen erst im mM-Bereich mit einer Trypsinantwort. Durch Trypsinkonzentrationen im nM-Bereich findet keine Kalziummobilisation statt; (Summation von  $n=3$  Stimulationen).

In DU145-Zellen ließen sich bei einer Trypsinkonzentration von 33 mM deutliche Änderungen der Ratio erreichen (Ratio +0,4). Anders als bei PC3- und LNCaP-Zellen erfolgte nur eine Kalziummobilisation bei einer Konzentration von

33 mM. DU145-Zellen waren erst im mM-Bereich sensibel für Trypsin. Dies deutete darauf hin, dass PAR2 auf PC3- und LNCaP-Zellen eine schwächere Antwort durch Trypsin liefern als auf DU145-Zellen. Ebenso könnte eine geringere Expression von PAR2 ein denkbarer Grund dafür sein, dass diese Zellen nur bei höheren Trypsinkonzentrationen mit der Mobilisation von Kalzium reagieren konnten.

#### 4.4.1.4 $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort nach Trypsinstimulation von stromalen BPH-Zellen (hPCPs)



**Abbildung 25.  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin in hPCPs-Zellen.**

$[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in hPCPs-Zellen durch Zugabe von Trypsin (Pfeil) in unterschiedlichen Konzentrationen (3 nM; 33 nM; 33 mM). Je höher die Konzentration an Trypsin gewählt wird, desto stärker war die  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort; (Summation von n=3 Stimulationen).

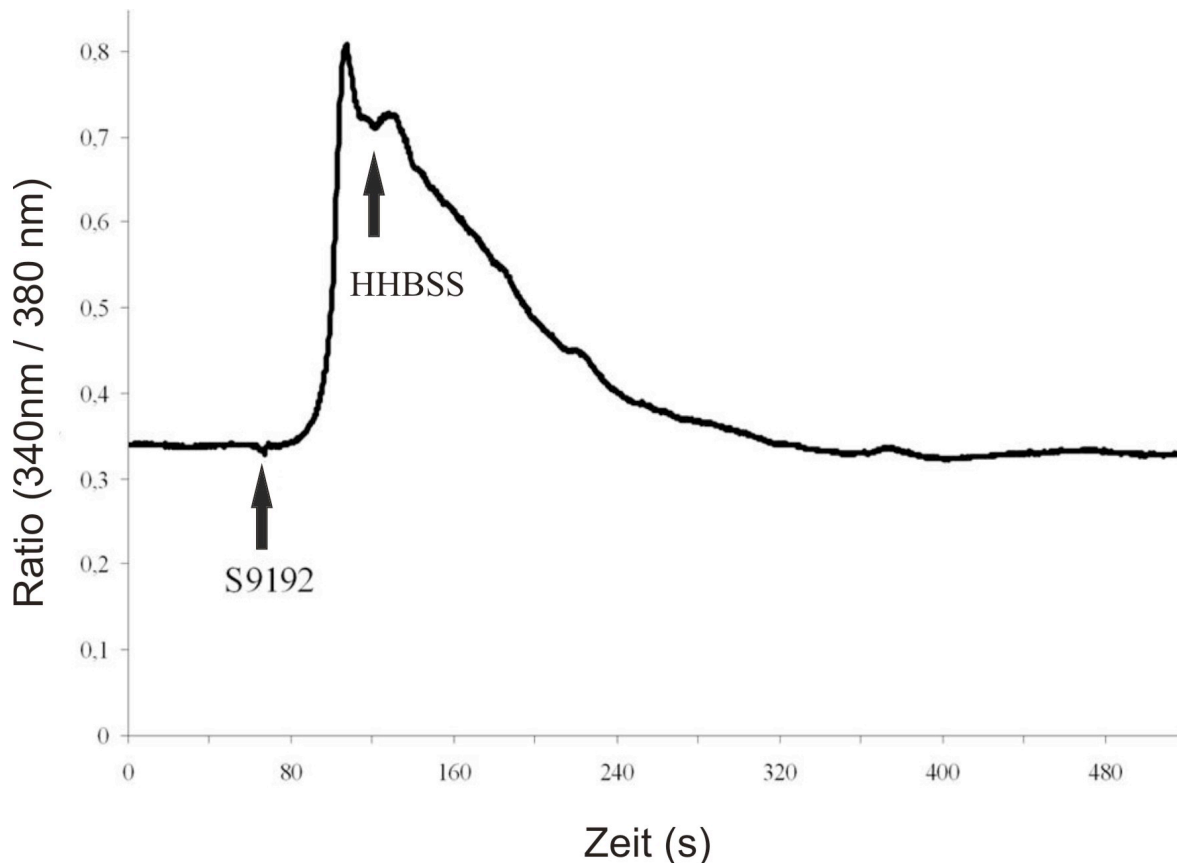
Durch Trypsinstimulation konnte die Kalziumkonzentration in epithelialen Prostatakarzinomzellen erhöht werden. Die  $[Ca^{2+}]$ -Antwort war in den meisten Fällen stärker, je höher die Konzentration an Trypsin gewählt wurde. Die Sensibilität für Trypsin unterschied sich allerdings in den zuvor untersuchten Zelllinien. Auch stromale Zellen der benignen Prostatahyperplasie (hPCPs) reagierten nach Trypsinstimulation mit einer Änderung der Ratio und damit mit einem intrazellulären Kalziumanstieg. Die hPCPs-Zellen lieferten eine noch stärkere  $[Ca^{2+}]$ -Antwort auf Trypsin, als es die Zellen der Prostatakarzinome taten. Schon bei einer Konzentration von 3 nM Trypsin erzeugten die Zellen einen intrazellulären Kalziumanstieg (Ratio +0,2). Sehr deutlich war eine Änderung der Ratio bei Zugabe von 33 nM (Ratio +0,42) und 33 mM (Ratio +1,05) Trypsin zu erkennen.



#### **4.4.2 Einzelzellmessung mit dem synthetischen PAR2-Agonisten S9192 (SLIGKV-NH<sub>2</sub>)**

Die Stimulationen von Zellen mit dem physiologischen PAR2-Agonisten Trypsin konnten zeigen, dass eine Aktivität von PAR2 zu vermuten war. Die Versuche zuvor konnten jedoch nicht nachweisen, dass der  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ausschließlich durch PAR2 bewirkt wurde. Um den Effekt des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs auf PAR2 einzugrenzen, wurden Einzelzellmessungen mit dem synthetischen PAR2-Agonisten S9192 (Sigma) durchgeführt. Die Messung der PAR2-Aktivität an einer Einzelzelle grenzt interzelluläre Einflüsse der Kalziummobilisation aus. Eine daraus resultierende Mobilisation von Kalzium kann auf den Rezeptor zurückgeführt werden. Sowohl die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten, als auch die Ergebnisse der semi-quantitativen und quantitativen PCR richteten den Fokus weiterer Untersuchungen auf Zellen der benignen Prostatahyperplasie (hPCPs), so dass weitere Kalziummessungen und Untersuchungen mit dem PAR2-Agonisten S9192 ausschließlich für diese Zelllinie vorgenommen wurden.

## 4.4.2.1 S9192-Antwort in hPCPs-Zellen

**Abbildung 26. Einzelmessung mit S9192 in hPCPs-Zellen.**

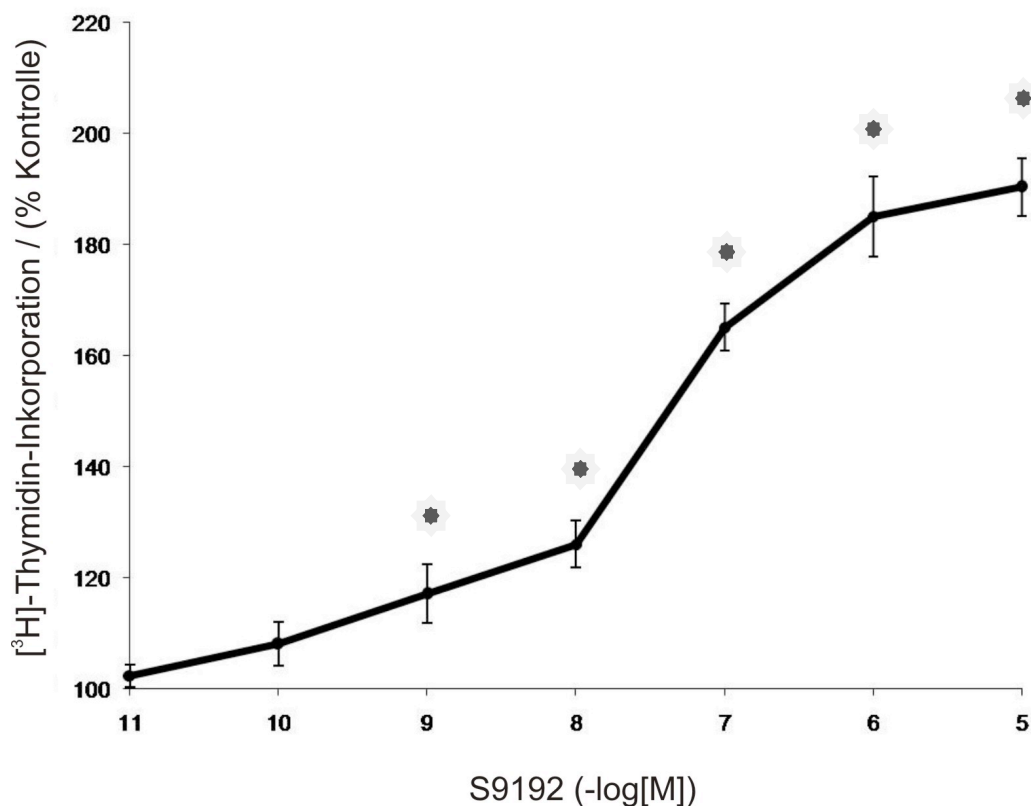
Beispiel des  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs durch Einzelzellstimulation mit S9192 (1.Pfeil). Nach Zugabe des PAR2-Agonisten S9192 kommt es zu einem transienten Kalziumanstieg in der hPCPs-Zelle. Der Kalziumeinstrom dauert hier ca. 20 Sekunden an bevor die Zellen dann innerhalb weniger Sekunden erneut ihren Ruhezustand erreicht. Die Wirkung des synthetischen Agonisten wurde nach Erreichen des Kalziummaximums durch Perifusion mit HHBSS beendet (2.Pfeil).

Die Abbildung zeigt ein typisches Beispiel des Verlaufs der durch Fura-2 gemessenen Fluoreszenz nach Zugabe des spezifischen PAR2-Agonisten (100 $\mu$ M S9192). Die Zugabe resultierte mit einer Verzögerung von ca. 10 Sekunden in einer Änderung der Ratio (Ratio +0,57) für ca. 40 Sekunden. Nach Erreichen der maximal gemessenen Ratio, wurde durch Perifusion reiner HHBSS-Lösung die Zelle langsam in ihren Ruhezustand zurückgeführt. Im

Vergleich zu einer Zellstimulation mit Trypsin erfolgte die Kalziummobilisation mit dem synthetischen PAR2-Agonisten wesentlich langsamer.

#### 4.5 Proliferationsassay durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation

Durch die Kalziummobilisation mit dem spezifischen PAR2-Agonisten S9192 konnte die Aktivität von PAR2 in hPCPs-Zellen nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines Proliferationsassays sollte gezeigt werden, ob die funktionelle Aktivität von PAR2 einen mitogenen Effekt auf die stromalen Zellen hat. Wie unter Punkt 3.2.10 beschrieben wurde dies mit Hilfe der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation untersucht.



**Abbildung 27. Proliferationsassay durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation in hPCPs-Zellen.** Prozentualer Anstieg der Zellproliferation durch Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des PAR2-Agonisten im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die Zellproliferation ändert sich bei steigender Konzentration signifikant (\* =  $p \leq 0,05$ ).

---

Die hPCPs-Zellen wurden für zwei Tage mit dem spezifischen PAR2-Agonisten (NH-SLIGKV) in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurde die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen mit Hilfe der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation in den einzelnen Proben von insgesamt drei unabhängigen Versuchen gemessen (n=3). Der prozentuale Anstieg wurde ermittelt, indem diese Proben mit unstimulierten Proben verglichen wurden. Weiterhin wurden die Standardfehler der einzelnen Proben errechnet (mean= ± s.e.). Bei sehr niedrigen Konzentrationen des Agonisten waren bereits Proliferationsanstiege in den hPCPs-Zellen zu beobachten (2,3% ± 2). Erst ab Konzentrationen von (S9192(-log[M]=9)) konnten signifikante Unterschiede im Vergleich zu unstimulierten Zellen nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Konzentration um eine Zehnerpotenz ließ zunächst einen linearen Anstieg vermuten (S9192(-log[M]=8)). Bei weiterer Konzentrationserhöhung des PAR2-Agonisten konnte gezeigt werden, dass die Zellen exponentiell proliferierten (S9192(-log[M]=8 bis 6)). Wenn die Konzentration des PAR2-Agonisten hoch gewählt wurde (S9192(-log[M]=5)), konnte bereits nach zwei Tagen Stimulation eine Proliferationssteigerung um 90,3 Prozent (p≤0,01) beobachtet werden. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Rezeptors eine Auswirkung auf die mitogene Aktivität von hPCPs-Zellen hat. Die Proliferationsrate der Zellen ist maßgeblich von der Konzentration des Rezeptoragonisten abhängig.

**Tabelle 12. Prozentualer Anstieg der Zellproliferation durch Stimulation mit dem PAR2- Agonisten S9192 in hPCPs-Zellen.**

Prozentualen Anstieg der Zellproliferation nach 2 Tagen Stimulation mit S9192 in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Prozentwerte werden als relative Proliferationsänderungen im Vergleich zu unstimulierten hPCPs-Zellen mit dem zugehörigen Standardfehler (mean=  $\pm$  s.e.) angegeben (n=3). Die Werte wurden durch [ $^3$ H]-Thymidin-Inkorporation mittels Flüssigszintillationszähler gemessen und anschließend ausgewertet; Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ).

<b>S9192 (-log[M])</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>09</b>	<b>08</b>	<b>07</b>	<b>06</b>	<b>05</b>
<b>Prozent ( % )</b>	<b>2.3</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>26</b>	<b>65</b>	<b>85</b>	<b>90.3</b>
<b>Standardfehler</b>	<b><math>\pm 2</math></b>	<b><math>\pm 4</math></b>	<b><math>\pm 5.3</math></b>	<b><math>\pm 4.3</math></b>	<b><math>\pm 4.2</math></b>	<b><math>\pm 7.2</math></b>	<b><math>\pm 5.2</math></b>
<b>Signifikanz (p-Wert)</b>	<b>0,303</b>	<b>0,118</b>	<b>0,033</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>

## 5 Diskussion

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen eine mögliche Korrelation zwischen Proteinase aktivierten Rezeptoren-2, Androgenen und prostaticen Veränderungen. Das Krankheitsbild der benignen Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms sind Erkrankungen, die auch in einem Zusammenhang mit Fehlregulationen des Steroidhaushalts auf verschiedenen Ebenen stehen.

Die Hypothese, dass eine Unterfamilie der Proteinase aktivierten Rezeptoren (PAR2) ein durch Androgene beeinflusstes Expressionsmuster aufweisen könnte, ist nach heutigem Wissensstand nicht unwahrscheinlich. Es ist bekannt, dass Steroide, und somit auch der Testosteronmetabolit DHT, intrazellulär an Androgenrezeptoren binden, und nach Translokation in den Zellkern diverse Gentranskriptionen induzieren können. Die intrazelluläre Aktivierung des Androgenrezeptors-Typ II führt unter anderem zur Expression von wachstumsinduzierenden Enzymen, wie beispielsweise MAP-Kinasen (*Mitogen activated Protein*) und ERK (*Extracellular signal regulated Kinase*) (Bosland 2000). Physiologische Mengen an DHT sind für das Wachstum und die Entwicklung der Prostata erforderlich. Prostatakarzinomzellen reagieren bei einer Änderung der DHT-Konzentration mit einem Rückgang der Proliferation. Sowohl Konzentrationen, die den physiologischen Wert übersteigen, als auch subphysiologische Konzentrationen wirken supressiv auf diese Zellen (Sonnenschein et al. 1989; Prehn 1999). Es konnte gezeigt werden, dass eine Änderungen der DHT-Konzentration zur Einleitung der Apoptose maligne entarteter Zellen in androgenabhängig wachsenden Prostatakarzinomen führen kann. Als Grund hierfür wird die Sensibilisierung der Zellen für die TGF- $\beta$  induzierte Einleitung der Apoptose angesehen (Bruckheimer and Kyprianou 2001). TGF- $\beta$  ist einer von wenigen Schlüsselfaktoren für die Einleitung des programmierten Zelltodes und wird wie viele Wachstumsfaktoren unter dem Einfluss von Androgenen exprimiert (Thompson et al. 1992). Allerdings widersprechen diese Erkenntnisse zuvor erforschten Theorien der Apoptoseeinleitung in Prostatazellen. Denn nur mittels Hormonablationstherapien soll die Einleitung der Apoptose im sekretorischen

---

Prostataepithel erreicht werden können (*Kyprianou and Isaacs 1989*). Dass auch der Proteinase aktivierte Rezeptor-2 (PAR2) in verschiedenen *in vitro*-Modellen prostaticher Erkrankungen einer androgenabhängigen Expression unterliegt, war Teil der Untersuchungen dieser Arbeit. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse konnte für die stromale Prostatazelllinie hPCPs, jedoch nicht für die epithelialen Prostatakarzinomzelllinien (PC3, DU145 und LNCaP) eine durch DHT beeinflusste Expression gezeigt werden. Neben dem Versuch eine steroidhormonabhängige Expression von PAR2 zu beschreiben, wurde auch ein Fokus auf die Lokalisation des Rezeptors in verschiedenen pathologisch veränderten Prostatageweben gelegt. Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Gewebe und die fluoreszenztechnischen Untersuchungen mit dem PAR2-Sekundärantikörper (K61) beschreiben die Lokalisation von PAR2 in normalen, benignen und malignen Geweben der Prostata. Die Ergebnisse zeigten eindeutige topografische Unterschiede des Rezeptors in den untersuchten Geweben. Der PAR2-Antikörper reagierte sowohl im Epithel, als auch im Stroma der Prostata. Je nach Pathologie der Prostata schien sich die Lokalisation des Rezeptors zu ändern. Den Ergebnissen zu Folge, kam eine Immunreaktion des PAR2-Antikörpers gehäuft in dem Kompartiment des Organs vor, wo der Ursprung des pathologischen Prozesses zu vermuten ist. Die Untersuchungen der akuten adenomatösen Hyperplasie (AAH) und auch des Prostatakarzinoms (PCa) zeigten Immunreaktionen des PAR2-Antikörpers hauptsächlich im Epithel (Abb.10 und 11). Diese Beobachtungen könnten sich dadurch erklären lassen, dass bei beiden Erkrankungen die Entartung genau dieses epithelialen Kompartiments im Vordergrund steht. Es ist aber auch zu berücksichtigen, dass nicht nur die Entdifferenzierung des Epithels, sondern auch die des Stromas bei diesen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt (*Tenniswood 1986*). Eine interzelluläre Kommunikation des Epithels und des Stromas würde die nicht immer strikte Anordnung von PAR2 im apikalen Bereich des Epithels, wie es im gesunden Prostatagewebe beobachtet werden konnte, erklären (Abb.9). Eine basale Lokalisation und im Epithel diffus vorkommender PAR2 könnte vermuten lassen, dass der Rezeptor als Kommunikationselement zwischen Epithel und Stroma fungiert. Vermutlich

---

initiiieren die Transduktionswege des Rezeptors Kinaseaktivitäten, die nicht nur zu einer Entartung des Epithels sondern auch des darunter befindlichen Muskel- und Stromagewebes führen können (*Wilson and Singh 2008*). Vielmehr erschien die Anwesenheit von PAR2 in den Epithelzellen nach intrazellulär verlagert zu sein. Die Darstellung von PAR2 in den untersuchten Präparaten ließ vermuten, dass ein pathologischer Prozess eine Umverteilung des Rezeptors nach basolateral bewirkt oder dass der Rezeptor durch Endozytose vermehrt lysosomal abgebaut wird und deswegen vermehrt im Zytoplasma der Epithelzellen erscheint. Weiterhin könnte die Lokalisation dafür sprechen, dass in erkranktem Gewebe PAR2 für pathologische Prozesse, wie Entzündung und Karzinogenese, bevorzugt in Richtung Stroma exprimiert wird, um als epithelial-stromales Kommunikationselement fungieren zu können.

Die Untersuchungen über die Lokalisation von PAR2 in den pathologisch veränderten Geweben der Prostata können für die Entstehung von malignen und benignen Erkrankungen der Prostata von großer Bedeutung sein. PAR2 scheint Auskünfte darüber liefern zu können in welchem Gewebekompartiment, ob epithelial oder stromal, eine pathologische Veränderung stattfindet. Die Erkenntnisse, dass PAR2 in Prozessen der Tumorgenese und Metastasierung, aber auch als Initiator entzündlicher Prozesse eine Schlüsselfunktion spielt, könnten die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Untersuchung in Prostataerkrankungen verschiedener Ätiologie unterstützen.

Nicht nur die Entdifferenzierung von Zellen, sondern auch die Aktivierung von Schlüsselaktivatoren für entzündliche Prozesse sind für PAR2 in der Vergangenheit beschrieben worden (*Coelho et al. 2003*). Der Rezeptor vermittelt wichtige zelluläre Antworten über die Aktivierung verschiedener Kinasen, wie beispielsweise der *mitogen-activated protein kinase*-Familie (MAPK), ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK) und I kappa B kinase (IKK) (*Kanke et al. 2001; Kanke et al. 2005*). Diese Feststellungen scheinen ein Ansatz dafür zu sein, warum gerade in dem Gewebe der benignen Prostatahyperplasie die Immunreaktion des PAR2-Antikörpers ausschließlich im Stroma des Organs beobachtet werden konnte. Eine benigne Hyperplasie, die auf der Entstehung eines entzündlichen Prozesses beruht, könnte die Lokalisation des Rezeptors



erklären.

Da alle untersuchten Erkrankungen auf multifaktoriellen Pathogenesen beruhen, müssen weitere Faktoren, wie Hormone, Enzyme, Proteinasen und deren Rezeptoren, berücksichtigt werden. Dennoch lassen die Beobachtungen über die Lokalisation von PAR2 in der Prostata auf eine Beteiligung des Rezeptors in der Pathologie des Organs schließen. Inwiefern der Rezeptor beteiligt ist, konnte bereits für diverse Zelllinien der Prostata gezeigt werden. Black und Mitarbeiter wiesen eine erhöhte Expression von PAR1, PAR2, und PAR4 in resezierten Geweben des Prostatakarzinoms gegenüber gesunden Prostatae nach und vermuteten eine wichtige Rolle dieser Rezeptoren bei der Entstehung von Prostatakarzinomen durch autokrine und parakrine Mechanismen (*Black et al. 2007*). Auch Wilson und Mitarbeiter zeigten mittels RT-PCR, dass sowohl PAR1 und PAR2 von Prostatakarzinomzelllinien überexprimiert werden. Es wurden dahingehend sowohl die androgenabhängig wachsenden Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und DU145 und die androgenunabhängig wachsende Prostatakarzinomzelllinie PC3 untersucht (*Wilson et al. 2004*). Auch PAR3 und PAR4 konnten in *in vitro*-Modellen der Prostata nachgewiesen werden, allerdings bisher nur in der Zelllinie LNCaP (*Greenberg et al. 2003*). Untersuchungen des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 in isolierten humanen stromalen Prostatazellen benigner Prostatahyperplasien (HPSCs) wiesen ebenfalls erhöhte Expressionen auf (*Myatt and Hill 2005*). In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen Proteinasen (PAR2-Agonist) und der PAR2-induzierten Proliferation von Prostatazellen (hPCPs) gezeigt werden (s.u.). Damit liegt die Beteiligung des Rezeptors an der Entstehung prostatistischer Veränderungen sehr nahe.

Es ist bekannt, dass eine große Anzahl von Serin-Proteinasen, die von epithelialen und stromalen Prostatazellen und auch von maligne entarteten Zellen sezerniert werden, als potentielle PAR-Aktivatoren angesehen werden. Möglicherweise sind sie der Grund für die Proliferation dieser Zellen. Neben Trypsin wurden das prostataspezifische Antigen PSA (hK3) und auch humanes glandulären Kallikrein (hK2) als potentielle Aktivatoren beschrieben (*Takayama et al. 2001*). All diese Proteinasen werden unter der Kontrolle von Androgenen in

---

die Seminalflüssigkeit sezerniert und spielen eine Rolle bei der Verflüssigung des Ejakulats (*Malm et al. 2000; Yousef and Diamandis 2001*). Wilson und Mitarbeiter konnten 2005 die Aktivierung von PAR2 durch eine membranständige Serin-Proteinase, TMPRSS2 (*Transmembrane protease, serin 2*), entdecken (*Wilson et al. 2005*). TMPRSS2 ist eine Typ II transmembranständige Serinproteinase, die ihre Aufmerksamkeit durch eine hohe Expression in der Prostata und erhöhte Expression in neoplastischen Prostataepithel auf sich lenkte (*Vaarala et al. 2001*). Durch ihre Aktivierung wird die Proteinase in die extrazelluläre Matrix abgegeben und kann unter anderem PAR2 aktivieren. Auch dieser Proteinase wurden androgenabhängige Expressionsmuster zugeschrieben (*Mostaghel et al. 2007*).

Neben der Aktivierung von PAR, werden Proteinase allein auch parakrine und autokrine Eigenschaften zugesprochen, die ein entzündliches oder malignes Geschehen forcieren können. Proteinase werden aufgrund ihrer funktionellen Spannbreite heute nicht mehr nur als Enzyme, sondern als „*hormone-like messengers*“ bezeichnet (*Ramachandran and Hollenberg 2008*). Es wird vermutet, dass die PAR-Familie neben direkten Mechanismen auch indirekt an der Kanzerogenese und der Entdifferenzierung von Zellen beteiligt ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Metallomatrixproteinen (MMPs) in Prostatazellen durch die Aktivierung von Proteinase aktivierten Rezeptoren erhöht ist. Ein Beispiel ist das proteolytische Enzym MMP-2, welches mit der malignen Progression von Prostatakarzinomen und deren Metastasierung zu den Lymphknoten in Verbindung gebracht werden konnte (*Stearns and Stearns 1996a; Stearns and Stearns 1996b*). In tierexperimentiellen Untersuchungen wurden erhöhte MMP-2 und MMP-9 Spiegel in Prostatakarzinomen entdeckt, die die Fähigkeit besitzen, Metastasenbildung zu begünstigen (*Lokeshwar 1999*).

Prostatakarzinomzellen beispielsweise exprimieren vermehrt PAR1 gegenüber normalem Prostatagewebe (*Cooper et al. 2003*). Die Proteinase MMP-1 wiederum ist in der Lage die Signaltransduktion dieses Rezeptors zu aktivieren. Die Aktivierung führt zu einer Förderung der Mitogenese. Neben der Aktivierung von PAR1 wird dieser Proteinase aber auch die Beteiligung am Abbau der

---

extrazellulären Matrix zugeschrieben (*Boire et al. 2005*). Damit ist sie in der Lage Teilung, Motilität und Invasion von Zellen zu verstärken. Zusätzlich ist der physiologische Agonist Thrombin in der Lage PAR1 zu aktivieren. Vor allem Tumorzellen exprimieren vermehrt MMPs und bedingen dadurch eine steigende Motilität der betroffenen Zellen. Auf diese Weise wird die Proliferation von Zellen verstärkt. Dieses Beispiel zeigt, dass verschiedene Proteinase in der Lage sind mittels Proteinase aktivierter Rezeptoren die Interaktion zwischen Tumor und normalem Gewebe zu modifizieren und somit Tumorwachstum mit späterer Invasion zu fördern (*Wilson and Singh 2008*). Weiterhin zeigt es Möglichkeiten auf, die eine benigne und maligne Proliferation des Prostatagewebes durch Proteinase aktivierte Rezeptoren verursachen kann und gibt einen Einblick in das multifaktorielle Geschehen der in dieser Arbeit untersuchten Erkrankungen. Ähnliche Prozesse und Interaktionen sind für den Proteinase aktivierten Rezeptor-2 vorstellbar.

Da die meisten benignen und malignen Veränderungen der Prostata mit Störungen des Androgenhaushalts in Verbindung gebracht werden, wurde in dieser Arbeit eine durch DHT beeinflusste Expression von PAR2 in *in vitro*-Modellen prostatistischer Erkrankungen untersucht. Die Ergebnisse der RT-PCR und QPCR zeigen, dass eine androgenabhängige Expression des Rezeptors in der stromalen Zelllinie hPCPs vorlag (Abb.17 und 21). Die semi-quantitativen Untersuchungen der *in vitro*-Modelle des Prostatakarzinoms ließen zunächst auch ein androgenabhängiges Expressionsmuster des Zielrezeptors vermuten. Die quantitativen Ergebnisse mittels QPCR hingegen lieferten keine signifikanten Unterschiede bezüglich einer durch DHT beeinflussten Expression von PAR2 in den stimulierten Proben der Prostatakarzinomzelllinien ( $p \geq 0,05$ ). Die semi-quantitativen RT-PCR wurden mit Zellen durchgeführt, die sowohl in gestrippten (FKS) als auch ungestrippten (chFKS) Kulturmedien stimuliert wurden. In chFKS-haltigen Kulturmedium stimulierte Zellen können eine sichere Aussage über eine androgenabhängige Expression von PAR2 liefern, denn bereits vorhandene Steroidhormone in FKS-haltigen Kulturmedium könnten ein Ergebnis verfälschen. Zusätzlich können Pipettierfehler und die Art der Quantifizierung ein falsches Resultat verstärken. Der Vorteil der QPCR liegt auf

---

der Hand, wenn man bedenkt, dass eine Auswertung über Agarosegele wegfällt, die Daten für die Auswertung sofort verfügbar sind und das Kontaminationsrisiko der Proben durch weniger Pipettierschritte verringert wird. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die amplifizierte DNA während der exponentiellen Phase zu quantifizieren. Gerade in dieser Art der Quantifizierung liegt die Schwierigkeit der semi-quantitativen PCR, denn zu hoch gewählte Zyklenzahlen würden gegebenenfalls übersättigte Ergebnisse liefern. In diesem Fall würden Amplifikate der Plateauphase quantifiziert, die dann einer falschen Interpretation unterliegen. Da weiterhin für die QPCR ausschließlich cDNA von Zellen verwendet wurden, die in chFKS-haltigem Kulturmedium stimuliert wurden, wurde in dieser Arbeit der Fokus auf die quantitativen QPCR-Ergebnisse gerichtet.

In der Literatur wurde den Zelllinien PC3 und DU145 androgenunabhängige Wachstumsverhalten und der Zelllinie LNCaP androgenabhängiges Wachstumsverhalten zugeschrieben (*Kaighn et al. 1978; Stone et al. 1978; Horoszewicz et al. 1980*). Die *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die Expression des Proteinase aktivierten Rezeptors-2 nicht abhängig vom Androgen DHT war. Dennoch ist es möglich, dass PAR2 unabhängig von der Expressionsmenge seine Funktion in den untersuchten Zelllinien indirekt durch Androgene beeinflussen kann. Die Anwesenheit des Rezeptors konnte in dieser Arbeit deutlich gezeigt werden. Wie bereits erwähnt, werden eine Vielzahl von Proteinasen androgenabhängig sezerniert. Bei einer Änderung der Androgenkonzentration stünden so mehr oder weniger potentielle Aktivatoren dieser Rezeptoren zur Verfügung, die eine Funktion beeinflussen könnten. Es steht also die Vermutung nahe, dass die Funktion des Rezeptors hier nicht direkt, jedoch indirekt vom Serumandrogenspiegel abhängig ist.

Im Gegensatz zu den epithelialen Prostatakarzinomzelllinien konnte eine durch DHT beeinflusste Expression von PAR2 für die stromale Zelllinie hPCPs präsentiert werden. Sowohl die semi-quantitativen Ergebnisse der RT-PCR, als auch die Ergebnisse der QPCR wiesen darauf hin, dass unter DHT-Einfluss eine Änderung der PAR2-Expression erreicht werden konnte. Subphysiologische Konzentrationen von DHT ( $-\log[M]=11$ ) induzierten eine

---

erhöhte Expression von PAR2 in den stromalen Zellen. Eine Erhöhung der DHT-Konzentration resultierte in einer Abnahme der PAR2-Expression. Diese androgenabhängige Expression könnte als ein Faktor angesehen werden, der für die Entstehung dieser Prostataerkrankung relevant erscheint. Die altersbedingte Umstellung des Hormonhaushaltes eines Mannes wird als gut untersuchte Hypothese für die Entstehung der benignen Prostatahyperplasie angesehen (*Krieg et al. 1993*). Eine Übertragung dieses *in vitro*-Modells in ein *in vivo*-Modell würde theoretisch folgendes bedeuten:

Eine altersbedingte Reduktion des Serumspiegels an Testosteron könnte eine reduzierte intrazelluläre DHT-Konzentration hervorrufen. Dies wiederum resultiert in einer erhöhten Expression von PAR2 in den stromalen Prostatazellen. Damit würden Bedingungen vorherrschen, die für die Entartung und Proliferation von Zellen verantwortlich gemacht werden könnten.

Eine erhöhte Expression des Rezeptors führt jedoch nicht ausschließlich dazu den Zellstoffwechsel der Zielzellen beeinflussen zu können. Es müssen ebenso genügend Aktivatoren des Rezeptors vorliegen oder vom umliegenden Gewebe sezerniert werden, um die Funktionen des Rezeptors aufrecht zu erhalten. Umgekehrt führt nicht allein die Anwesenheit von potentiellen PAR2-Aktivatoren dazu, dass beispielsweise eine Proliferation von stromalen oder epithelialen Zellen stattfindet, wenn nicht genügend Rezeptoren verfügbar sind (*Barry et al. 2006*). Die gewünschten Effekte für die Zielzelle würden ebenfalls ausbleiben. Die fluoreszenzphotometrischen Kalziummessungen mit Fura-2 zeigten, dass durch Trypsinstimulation in den untersuchten Zelllinien Kalzium mobilisiert wurde. Es wurden Unterschiede im  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg durch Trypsin festgestellt. Ob wirklich die Sensibilität für Trypsin oder die Menge von PAR2 in den Zellen verantwortlich für die unterschiedliche  $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort war, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Eine Aktivierung weiterer PAR ist ebenso denkbar. Denn auch PAR1 und PAR4 können durch Trypsin aktiviert werden (Tab.1). Diese Vermutungen würden sich, wie zuvor erwähnt, in der Funktionalität des Rezeptors widerspiegeln. Auf der einen Seite wurde in dieser Arbeit eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration schon mit nM-Trypsinmengen erreicht (hPCPs, PC3), auf der anderen Seite reagierten die

---

Zellen erst bei mM-Trypsinkonzentrationen mit einer Änderung der Kalziumkonzentration (LNCaP, DU145). Im Fall der epithelialen Prostatazellen LNCaP schien es als würde die Stimulation mit Trypsin zu einem nicht transienten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg in den Zellen führen (Abb.23). Diese Ergebnisse könnten Rückschlüsse auf die Aktivität von PAR2 in den Prostatazellen liefern. Allerdings muß die Anwendung von Fura-2 AM in dieser Methode auch kritisch betrachtet werden. Der Farbstoff gelangt bei der Beladung der Zellen durch Diffusion ins Zytosol und wird dort durch zelleigene Esterasen abgebaut. Eine unvollständige Hydrolyse des Fura-2 AM führt dann für die Messungen zur Unterschätzung der eigentlichen Kalziumkonzentration. Um genau diesen Fehler gering zu halten, wurden die Zellen nach der Beladung und nach Auswaschen der Farbstofflösung für 30-45 Min. in HHBSS-Puffer inkubiert, um eine vollständige Spaltung des Farbstoffs zu gewährleisten. Zügiges und vor allem sauberes Arbeiten in abgedunkelter Umgebung war Voraussetzung für die Anwendung des sauerstoff- und lichtempfindlichen Farbstoffs, um genaue Meßwerte zu erhalten. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Reaktionsprodukte der Hydrolyse zytotoxische Eigenschaften besitzen können (Gollnik 1992). Da auch der Zelltod mit einer Erhöhung der Kalziumkonzentration einhergehen kann, würde dies eine falsche Interpretation der Ergebnisse bewirken. Es ist dann meist ein nicht transienter Kalziumeinstrom zu beobachten (Meldolesi and Pozzan 1987; Berridge 1993). Dies weist darauf hin, dass auch die Resultate für LNCaP-Zellen mit dem Zelltod in Verbindung gebracht werden könnten (Abb.23). Um weitere Fehlerindikatoren bei der Beladung der Zellen mit Fura-2 AM und damit der emittierten Fluoreszenzintensität zu vermeiden, wurden alle Zellen unter den gleichen Bedingungen vorbereitet und beladen. Zusätzlich wurde mit Hilfe von Eichpräparaten eine Kalibrierung der Messeinrichtung unter Versuchsbedingungen durchgeführt, so dass auch Kalziummessungen an Einzelzellen zu relativ genauen Ergebnissen führten (Gryniewicz et al. 1985). Da die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Methoden den Fokus auf die Zelllinie hPCPs richteten, wurden Einzelzellmessungen mit dem synthetischen PAR2-Agonisten ausschließlich mit diesen Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse

---

zeigten eine deutliche Aktivität von PAR2 in diesen Zellen. Mit dem PAR2-Agonisten ließ sich wesentlich langsamer Kalzium in den Stromalen Zellen mobilisieren als mit Trypsin. Dies zeigt, dass Trypsin nicht ausschließlich durch PAR2 eine Kalziummobilisation in den Zellen hervorrief, sondern dass weitere Faktoren die Mobilisation beeinflussten. Es ist zu berücksichtigen, dass aufgrund bekannter Koaktivierungen der Proteinase aktivierten Rezeptoren auch jeder andere Untertyp dieser Rezeptorfamilie für eine spezifische Funktion von PAR2 verantwortlich gemacht werden kann (*Kawabata et al. 1999*). Diese Koaktivierungen setzen nicht immer eine Steigerung der Aktivität des koaktivierten Rezeptors voraus, sondern können ebenso in einer Inhibition der Funktion resultieren (*Oikonomopoulou et al. 2006*). Wollte man weiterführende Kalziummessungen in der Prostata intensiver untersuchen, so müssten neben der Untersuchung des Zielrezeptors auch das Verhalten der anderen Mitglieder dieser Rezeptorfamilie mit Hilfe von PAR-Inhibitoren berücksichtigt werden. Denn so multifaktoriell die Ätiologie von Prostataerkrankungen ist, so ist auch die Funktion der Proteinase aktivierten Rezeptoren in dem Organ zu betrachten und zu beurteilen.

Diese Arbeit lieferte im *in vitro*-Modell der benignen Prostatahyperplasie Ergebnisse zum weiteren Verständnis ihrer Pathogenese. Die immunhistologischen Untersuchungen an unterschiedlichen Prostatageweben legten nahe, dass eine Umverteilung von PAR2 vom Epithel in das Stromagewebe im Laufe der Entdifferenzierung stattfindet. Zusätzlich wurde in hPCPs-Zellen eine negative Korrelation zwischen DHT-Konzentration und relativer Expression des Rezeptors nachgewiesen. Die photometrischen Untersuchungen wiesen auf einen funktionell aktiven PAR2 in den untersuchten Stromalen Zellen hin. Die funktionelle Aktivität von PAR2 war maßgeblich an der Proliferation dieser Zellen beteiligt, was mit Hilfe eines Proliferationsassays nachgewiesen werden konnte. Dieser Proliferationseffekt und der Einfluss von DHT auf die Expression von PAR2 sind zusammengenommen ein wichtiger Hinweis auf die Regulation PAR2-vermittelter mitogener Prozesse im Verlauf pathologischer Veränderungen der Prostata.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1.) Al-Ani B, Saifeddine M, Kawabata A, Hollenberg MD (1999) Proteinase activated receptor 2: Role of extracellular loop 2 for ligand-mediated activation. *Br J Pharmacol* 128: 1105-1113
  
- 2.) Altwein J, Ekman P, Barry M, Biermann C, Carlsson P, Fossa S, Kiebert G, Kuchler T, McLeod D, Porter A, Steineck G (1997) How is quality of life in prostate cancer patients influenced by modern treatment? The Wallenberg Symposium. *Urology* 49: 66-76
  
- 3.) Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5: 209-219
  
- 4.) Aumüller G (1989) Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat Embryol (Berl)* 179: 519-531
  
- 5.) Aumüller G, Riva A (1992) Morphology and functions of the human seminal vesicle. *Andrologia* 24: 183-196
  
- 6.) Barry GD, Le GT, Fairlie DP (2006) Agonists and antagonists of protease activated receptors (PARs). *Curr Med Chem* 13: 243-265
  
- 7.) Bartsch G, Muller HR, Oberholzer M, Rohr HP (1979) Light microscopic stereological analysis of the normal human prostate and of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 122: 487-491
  
- 8.) Bartsch G, Rittmaster RS, Klocker H (2000) Dihydrotestosterone and the concept of 5 $\alpha$ -reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 37: 367-380



- 9.) Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325
- 10.) Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL (1984) The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol* 132: 474-479
- 11.) Black PC, Mize GJ, Karlin P, Greenberg DL, Hawley SJ, True LD, Vessella RL, Takayama TK (2007) Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate* 67: 743-756
- 12.) Bohm SK, Kong W, Bromme D, Smeekens SP, Anderson DC, Connolly A, Kahn M, Nelken NA, Coughlin SR, Payan DG, Bunnett NW (1996) Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* 314 ( Pt 3): 1009-1016
- 13.) Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A (2005) PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120: 303-313
- 14.) Bono F, Lamarche I, Herbert JM (1997) Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the proteinase activated receptor-2 (PAR-2). *Biochem Biophys Res Commun* 241: 762-764
- 15.) Bosland MC (2000) The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 39-66
- 16.) Bostwick DG, Amin MB, Dundore P, Marsh W, Schultz DS (1993a) Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol* 24: 298-310

17.) Bostwick DG, Brawer MK (1987) Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 59: 788-794

18.) Bostwick DG, Srigley J, Grignon D, Maksem J, Humphrey P, van der Kwast TH, Bose D, Harrison J, Young RH (1993b) Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: morphologic criteria for its distinction from well-differentiated carcinoma. *Hum Pathol* 24: 819-832

19.) Bratt O, Kristoffersson U, Olsson H, Lundgren R (1998) Clinical course of early onset prostate cancer with special reference to family history as a prognostic factor. *Eur Urol* 34: 19-24

20.) Breul J, Paul R (1998) [Anti-androgen withdrawal syndrome]. *Urologe A* 37: 156-158

21.) Bruckheimer EM, Kyprianou N (2001) Dihydrotestosterone enhances transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hormone-sensitive prostate cancer cells. *Endocrinology* 142: 2419-2426

22.) Cabrespine A, Guy L, Chollet P, Debiton E, Bay JO (2004) [Molecular mechanisms involved in hormone resistance of prostate cancer]. *Bull Cancer* 91: 747-757

23.) Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

24.) Coelho AM, Ossovskaya V, Bunnett NW (2003) Proteinase-activated receptor-2: physiological and pathophysiological roles. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 1: 61-72

- 25.) Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV, Jr., Coughlin SR (1996) Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature* 381: 516-519
- 26.) Cooper CR, Chay CH, Gendernalik JD, Lee HL, Bhatia J, Taichman RS, McCauley LK, Keller ET, Pienta KJ (2003) Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer* 97: 739-747
- 27.) Cottrell GS, Amadesi S, Grady EF, Bunnett NW (2004) Trypsin IV, a novel agonist of protease-activated receptors 2 and 4. *J Biol Chem* 279: 13532-13539
- 28.) Cottrell GS, Coelho AM, Bunnett NW (2002) Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling. *Essays Biochem* 38: 169-183
- 29.) Coughlin SR, Camerer E (2003) PARticipation in inflammation. *J Clin Invest* 111: 25-27
- 30.) De Campo BA, Henry PJ (2006) Protease-activated receptors (PARs) are partly pro-inflammatory and partly anti-inflammatory: will PAR agonists or antagonists participate in future drug therapies? *Curr Drug Targets* 7: 629-637
- 31.) De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG (1999) Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 155: 1985-1992
- 32.) Dhom G (1992) [Pathology of benign and malignant prostatic tumors]. *Urologe A* 31: W47-55
- 33.) Drago JR MF, Lee F (1987) Introductory remarks and workshop summary. *Urology* 34: 2-3

- 34.) Drenckhahn D ZW (1994) Benninghoff, Anatomie. München
- 35.) Ekman P (1989) BPH epidemiology and risk factors.  
Prostate Suppl 2: 23-31
- 36.) Ekman P (2000) The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. Prostate Suppl 10: 14-18
- 37.) Epstein JI, Grignon DJ, Humphrey PA, McNeal JE, Sesterhenn IA, Troncoso P, Wheeler TM (1995) Interobserver reproducibility in the diagnosis of prostatic intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol 19: 873-886
- 38.) Gilligan T, Kantoff PW (2002) Chemotherapy for prostate cancer. Urology 60: 94-100; discussion 100
- 39.) Gollnik F (1992) Aufbau eines Meßplatzes und fluorometrische Untersuchungen mit Fura-2 zur Verteilung und regulatorischen Funktion von Kalzium-Ionen in lebenden Amöben. Dissertation der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität zu Bonn
- 40.) Greenberg DL, Mize GJ, Takayama TK (2003) Protease-activated receptor mediated RhoA signaling and cytoskeletal reorganization in LNCaP cells. Biochemistry 42: 702-709
- 41.) Greene DR, Fitzpatrick JM, Scardino PT (1995) Anatomy of the prostate and distribution of early prostate cancer. Semin Surg Oncol 11: 9-22
- 42.) Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ (2001) Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. J Natl Cancer Inst 93: 1687-1697

- 43.) Gryniewicz G, Poenie M, T sien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450
- 44.) Helpap B, Riede C (1995) Nucleolar and AgNOR-analysis of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract* 191: 381-390
- 45.) Hermann M, Berger P (1999) Aging of the male endocrine system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139: 89-122
- 46.) Hermann M, Untergasser G, Rumpold H, Berger P (2000) Aging of the male reproductive system. *Exp Gerontol* 35: 1267-1279
- 47.) Hollenberg MD (2005) Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): proteinases as hormone-like signal messengers: PARs and more. *J Pharmacol Sci* 97: 8-13
- 48.) Hollenberg MD, Compton SJ (2002) International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 54: 203-217
- 49.) Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA (1980) The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37: 115-132
- 50.) Huggins C (1967) Endocrine-induced regression of cancers. *Cancer Res* 27: 1925-1930

- 51.) Huggins C, Hodges CV (2002) Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* 167: 948-951; discussion 952
- 52.) Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502-506
- 53.) Janssen M, Albrecht M, Moschler O, Renneberg H, Fritz B, Aumuller G, Konrad L (2000) Cell lineage characteristics of human prostatic stromal cells cultured in vitro. *Prostate* 43: 20-30
- 54.) Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C, Coughlin SR (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394: 690-694
- 55.) Kaighn ME, Lechner JF, Narayan KS, Jones LW (1978) Prostate carcinoma: tissue culture cell lines. *Natl Cancer Inst Monogr*: 17-21
- 56.) Kanke T, Macfarlane SR, Seatter MJ, Davenport E, Paul A, McKenzie RC, Plevin R (2001) Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem* 276: 31657-31666
- 57.) Kanke T, Takizawa T, Kabeya M, Kawabata A (2005) Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2 as a potential therapeutic target. *J Pharmacol Sci* 97: 38-42

- 58.) Kawabata A, Saifeddine M, Al-Ani B, Leblond L, Hollenberg MD (1999) Evaluation of proteinase-activated receptor-1 (PAR1) agonists and antagonists using a cultured cell receptor desensitization assay: activation of PAR2 by PAR1-targeted ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 358-370
- 59.) Key T (1995) Risk factors for prostate cancer. *Cancer Surv* 23: 63-77
- 60.) Krieg M, Nass R, Tunn S (1993) Effect of aging on endogenous level of 5 alpha-dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 375-381
- 61.) Kyprianou N, Isaacs JT (1989) Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Mol Endocrinol* 3: 1515-1522
- 62.) Li Y, Sarkar FH (2002) Down-regulation of invasion and angiogenesis-related genes identified by cDNA microarray analysis of PC3 prostate cancer cells treated with genistein. *Cancer Lett* 186: 157-164
- 63.) Liu J, Bastian M, Kohlschein P, Schuff-Werner P, Steiner M (2003) Expression of functional protease-activated receptor 1 in human prostate cancer cell lines. *Urol Res* 31: 163-168
- 64.) Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408
- 65.) Lokeshwar BL (1999) MMP inhibition in prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 878: 271-289

- 66.) Loubakos A, Yuan YP, Jenkins AL, Travis J, Andrade-Gordon P, Santulli R, Potempa J, Pike RN (2001) Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood* 97: 3790-3797
- 67.) Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001) Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53: 245-282
- 68.) Madersbacher S, Haidinger G, Temml C, Schmidbauer CP (1998) Prevalence of lower urinary tract symptoms in Austria as assessed by an open survey of 2,096 men. *Eur Urol* 34: 136-141
- 69.) Malm J, Hellman J, Hogg P, Lilja H (2000) Enzymatic action of prostate-specific antigen (PSA or hK3): substrate specificity and regulation by Zn(2+), a tight-binding inhibitor. *Prostate* 45: 132-139
- 70.) Mangan JA, Butcher, P.D. (1993) "Running AMOC with Superscript™ II Reverse Transcriptase." In: *Focus*, vol 15, pp 67-69
- 71.) Marcelli M, Cunningham GR (1999) Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3463-3468
- 72.) McNeal JE (1965) Morphogenesis of prostatic carcinoma. *Cancer* 18: 1659-1666
- 73.) McNeal JE (1969) Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer* 23: 24-34
- 74.) McNeal JE (1978) Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 15: 340-345



75.) Meldolesi J, Pozzan T (1987) Pathways of Ca<sup>2+</sup> influx at the plasma membrane: voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels. *Exp Cell Res* 171: 271-283

76.) Mirza H, Yatsula V, Bahou WF (1996) The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 97: 1705-1714

77.) Molino M, Woolkalis MJ, Reavey-Cantwell J, Pratico D, Andrade-Gordon P, Barnathan ES, Brass LF (1997) Endothelial cell thrombin receptors and PAR-2. Two protease-activated receptors located in a single cellular environment. *J Biol Chem* 272: 11133-11141

78.) Mostaghel EA, Page ST, Lin DW, Fazli L, Coleman IM, True LD, Knudsen B, Hess DL, Nelson CC, Matsumoto AM, Bremner WJ, Gleave ME, Nelson PS (2007) Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 67: 5033-5041

79.) Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350

80.) Myatt A, Hill SJ (2005) Trypsin stimulates the phosphorylation of p42,44 mitogen-activated protein kinases via the proteinase-activated receptor-2 and protein kinase C epsilon in human cultured prostate stromal cells. *Prostate* 64: 175-185

81.) Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404: 609-613

- 82.) Nystedt S, Emilsson K, Larsson AK, Strombeck B, Sundelin J (1995a) Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem* 232: 84-89
- 83.) Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J (1994) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9208-9212
- 84.) Nystedt S, Larsson AK, Aberg H, Sundelin J (1995b) The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem* 270: 5950-5955
- 85.) Oelke MH, K; Jonas, U; Laval, K; Tunn, U (2007) Benign Prostatic Hyperplasia: Terminology and Assessment. *Dtsch Arztebl* 104: A-2261
- 86.) Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Tea I, Blaber M, Blaber SI, Scarisbrick I, Andrade-Gordon P, Cottrell GS, Bunnett NW, Diamandis EP, Hollenberg MD (2006) Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling. *J Biol Chem* 281: 32095-32112
- 87.) Ossovskaya VS, Bunnett NW (2004) Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84: 579-621
- 88.) Paul R DP, Breul J (2001) PIN: Intraepitheliale Neoplasie der Prostata, eine obligate Präkanzerose des Prostatakarzinoms mit therapeutischer Konsequenz? *Aktuelle Onkologie* 113: 125–133
- 89.) Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45

90.) Pfaffl MW, and Hageleit, M., (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1: 92-95

91.) Prehn RT (1999) On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer Res* 59: 4161-4164

92.) Ramachandran R, Hollenberg MD (2008) Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S263-282

93.) Rasmussen UB, Vouret-Craviari V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E (1991) cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca<sup>2+</sup> mobilization. *FEBS Lett* 288: 123-128

94.) Rattenholl A, Seeliger S, Buddenkotte J, Schon M, Schon MP, Stander S, Vergnolle N, Steinhoff M (2007) Proteinase-activated receptor-2 (PAR2): a tumor suppressor in skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 127: 2245-2252

95.) RKI GdeKiDeVud (2006) Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Auflage, Saarbrücken

96.) Ross RK, Paganini-Hill A, Henderson BE (1983) The etiology of prostate cancer: what does the epidemiology suggest? *Prostate* 4: 333-344

97.) Rumpold H BP, Madersbacher S (2002) Endokrinologie der Benigen Prostatahyperplasie. *Journal für Urologie und Urogynäkologie* 9: 16-24

98.) Shapiro E, Hartanto V, Perlman EJ, Tang R, Wang B, Lepor H (1997) Morphometric analysis of pediatric and nonhyperplastic prostate glands: evidence that BPH is not a unique stromal process. *Prostate* 33: 177-182

99.) Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM (2004) Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res* 2: 395-402

100.) Sonnenschein C, Olea N, Pasanen ME, Soto AM (1989) Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens. *Cancer Res* 49: 3474-3481

101.) Stearns M, Stearns ME (1996a) Evidence for increased activated metalloproteinase 2 (MMP-2a) expression associated with human prostate cancer progression. *Oncol Res* 8: 69-75

102.) Stearns ME, Stearns M (1996b) Immunohistochemical studies of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2a) expression in human prostate cancer. *Oncol Res* 8: 63-67

103.) Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD (2005) Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 26: 1-43

104.) Steinhoff M, Corvera CU, Thoma MS, Kong W, McAlpine BE, Caughey GH, Ansel JC, Bunnett NW (1999) Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Exp Dermatol* 8: 282-294

105.) Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21: 274-281

106.) Takayama TK, McMullen BA, Nelson PS, Matsumura M, Fujikawa K (2001) Characterization of hK4 (protease), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry* 40: 15341-15348

107.) Taplin ME, Balk SP (2004) Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem* 91: 483-490

108.) Tenniswood M (1986) Role of epithelial-stromal interactions in the control of gene expression in the prostate: an hypothesis. *Prostate* 9: 375-385

109.) Thompson TC, Truong LD, Timme TL, Kadmon D, McCune BK, Flanders KC, Scardino PT, Park SH (1992) Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem Suppl* 16H: 54-61

110.) Vaarala MH, Porvari K, Kyllonen A, Lukkarinen O, Vihko P (2001) The TMPRSS2 gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cancer patients: detection of mutated TMPRSS2 form in a case of aggressive disease. *Int J Cancer* 94: 705-710

111.) Vermeulen A (1991) Clinical review 24: Androgens in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 221-224

112.) Villers A, Grosclaude P, Haillet O, Abbou CC, Richard F, Boccon-Gibod L (1997) [Diagnosis of cancer of the prostate (I): Advancements in knowledge and practice since the consensus conference of 1989. The "Cancer of the Prostate" subcommittee of the Committee of Oncology of the French Association of Urology]. *Prog Urol* 7: 508-515

113.) Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-1068

114.) Waterbor JW, Bueschen AJ (1995) Prostate cancer screening (United States). *Cancer Causes Control* 6: 267-274

115.) Wilson S, Greer B, Hooper J, Zijlstra A, Walker B, Quigley J, Hawthorne S (2005) The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells. *Biochem J* 388: 967-972

116.) Wilson SR, Gallagher S, Warpeha K, Hawthorne SJ (2004) Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors. *Prostate* 60: 168-174

117.) Wilson TJ, Singh RK (2008) Proteases as modulators of tumor-stromal interaction: primary tumors to bone metastases. *Biochim Biophys Acta* 1785: 85-95

118.) Wingo PA, Tong T, Bolden S (1995) Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 45: 8-30

119.)Wu AH, Whittemore AS, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, West DW, Hankin J, Teh CZ, Dreon DM, Paffenbarger RS, Jr. (1995) Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 735-741

120.)Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6642-6646

121.)Yates SL, Fluhler EN, Lippiello PM (1992) Advances in the use of the fluorescent probe fura-2 for the estimation of intrasynaptosomal calcium. *J Neurosci Res* 32: 255-260

122.)Yousef GM, Diamandis EP (2001) The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 22: 184-204

123.)Zhao GQ, Holterhus PM, Dammshäuser I, Hoffbauer G, Aumüller G (1992) Estrogen-induced morphological and immunohistochemical changes in stroma and epithelium of rat ventral prostate. *Prostate* 21: 183-199

---

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Robert Würdinger  
Geburtsdatum: 16.11.1979  
Geburtsort: Bad Laer  
Konfession: röm. kath.  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1986- 1990 Grundschole Dissen a. T. W.  
1990- 1992 Orientierungsstufe Dissen a. T. W.  
1992- 1999 Gymnasium Bad Iburg

### Schulabschluss:

Juni 1999 Abitur

### Zivildienst:

08/1999- 08/2000 Zivildienstleistender beim DRK  
Landkreis Osnabrück e. V.  
Ausbildung zum Rettungssanitäter

### Berufsausbildung:

10/2000- 03/2001 Fort- und Weiterbildung zum Rettungs-  
assistenten am Fachschulzentrum für  
Rettungsassistenten am Mathias-Spital  
in Rheine  
seit Juli 2001 Anerkennung der Berufsbezeichnung  
„Rettungsassistent“



**Studium:**

Beginn SS 2002

Studium der Zahnmedizin an der Philipps-Universität Marburg

**Abschluss des Studiums:**

Juni 2007

Approbation als Zahnarzt

**Zahnärztliche Tätigkeit:**

10/2007 - 08/2008

Beschäftigung als Vorbereitungsassistent in der „Zahnarztpraxis im Biegen“ bei ZA Daniel Milani in Marburg

seit August 2008

Fachzahnarztausbildung für Oralchirurgie am Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Bonn. Abteilung für zahnärztliche Chirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. G. Wahl

**Promotion:**

seit 2006

Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität des Saarlandes Homburg / Saar unter der Leitung von Prof. Dr. G. Wennemuth

## 8 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die mir den Abschluss dieser Dissertation ermöglichten.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Freund Gunther Wennemuth für die Themen- und Aufgabenstellung bedanken. Seine Geduld und freundschaftliche Unterstützung haben sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Danke für all die wertvollen Ratschläge, die mich stets neu inspirieren und motivieren konnten.

Ebenso möchte ich Elke einen großen Dank für die Einarbeitung in die Materialien und Methoden und für die langjährige Unterstützung aussprechen. Außerdem gilt den Mitarbeitern der Abteilung für Anatomie und Zellbiologie der Universitäten Marburg und Homburg ein großer Dank für die herzliche Unterstützung.

Danke an all die Jungs, die mit mir ihre Dissertation in Marburg begonnen haben. Besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle Philip aussprechen. Wir konnten uns gegenseitig austauschen und voneinander lernen und hatten eine sehr schöne Zeit in „unserer“ Universitätsstadt.

Zu guter letzt gilt ein sehr großer Dank meiner lieben Freundin. Ohne sie hätte ich sicherlich die letzten Jahre nicht so intensiv an der Fertigstellung gearbeitet. Ihr ständiger Antrieb und ihre andauernde Motivation gaben mir Kraft in schweren Zeiten und halfen mir mich immer wieder aufs Neue zu motivieren und diese Dissertation zum Abschluss zu bringen.

Ich möchte diese Arbeit meiner verstorbenen Mutter widmen. Sie und mein Vater haben immer an mich geglaubt, und ich möchte Beide mit dieser Arbeit wieder etwas stolzer machen.

Vielen Dank Euch allen.