

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom- Epidemiologie, Klinik und Therapie

1.1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist der häufigste bösartige urogenitale Tumor des Mannes und liegt mit einem Anteil von 22,3% an erster Stelle aller Krebsneuerkrankungen bei Männern. Laut Daten des Robert-Koch-Instituts betrug im Jahre 2002 die Inzidenz in Deutschland 48.650 Fälle pro Jahr [1]. Es ist derzeit die dritthäufigste, durch Krebs verursachte Todesursache (10,4%) hinter dem Bronchialkarzinom (26,3%) und dem Kolonkarzinom (12,8%). In der Rangfolge sämtlicher Todesursachen bei Männern lag das Prostatakarzinom laut Angaben des statistischen Bundesamtes im Jahre 2005 mit 2,6% (10.276 Todesfälle) an siebter Stelle aller Todesursachen [2].

In den USA wird die Inzidenz für das Jahr 2006 auf 218.890 Neuerkrankungen und die Mortalität auf 27.050 Todesfälle geschätzt. Damit steht auch dort das Prostatakarzinom mit 29% an erster Stelle aller malignen Neuerkrankungen und nach dem Bronchial- (31%) mit 9% an zweiter Stelle aller krebsbedingten Todesfälle bei Männern. Jeder sechste Mann erkrankt in den USA im Laufe seines Lebens an einem Prostatakarzinom [3].

In Deutschland lässt sich seit Ende der achtziger Jahre eine steigende Inzidenz beobachten. Dies kann größtenteils auf den wachsenden Einsatz neuer Screeningmethoden wie der Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) zurückgeführt werden. Im Unterschied zu den Inzidenzraten zeigt sich nach einem geringfügigen Anstieg bis in die Mitte der neunziger Jahre wieder ein Rückgang der Mortalitätsraten auf das Niveau der siebziger Jahre. Der altersabhängige Anstieg der Inzidenzrate lässt erkennen, dass das Prostatakarzinom vorwiegend eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist. Der Häufigkeitsgipfel liegt in der 7.-8. Lebensdekade, das mittlere Erkrankungsalter beträgt etwa 70 Jahre. Vor dem 50. Lebensjahr wird der Tumor praktisch nie beobachtet [1].

Eine Besonderheit stellt das latente Prostatakarzinom dar. Es handelt sich dabei um im Rahmen von Autopsien zufällig diagnostizierte, klinisch asymptomatische Tumoren.

Autopsiestudien zeigen eine altersabhängige ansteigende Prävalenz, die bei 60- bis 70-Jährigen bis zu 64% beträgt [4].

Bezüglich der Inzidenz zeigen sich weltweit Unterschiede in der Verteilung: Während Skandinavien, Australien, Nord- und Westeuropa und vor allem die farbige Bevölkerung der USA eine hohe Inzidenzrate aufweisen, gehört das Prostatakarzinom in den asiatischen Ländern zu den eher selteneren Tumoren [5]. Im EU-Vergleich liegt Deutschland im oberen Drittel hinter Finnland, Schweden, Belgien und Österreich. Die niedrigsten Erkrankungsraten finden sich dagegen in Italien, Spanien und Griechenland. Auch dies muss sicherlich vor dem Hintergrund eines international unterschiedlich verbreiteten Einsatzes des Screenings gesehen werden.

1.1.2 Risikofaktoren

Nach heutiger Sicht werden folgende Faktoren, die die Entstehung eines Prostatakarzinoms begünstigen könnten, diskutiert:

Zum einen findet sich eine familiäre Häufung, die auf eine genetische Disposition hinweist. Brüder von Erkrankten haben ein bis zu vierfach erhöhtes Risiko verglichen mit altersgleichen Männern. Bei zwei oder mehr betroffenen Verwandten ersten Grades erhöht sich das Erkrankungsrisiko um das Fünf- bis Elffache. Mehrere chromosomale sowie genetische Veränderungen konnten bisher identifiziert werden, darunter Polymorphismen in Genen, die u.a. Androgen-Rezeptoren, Vitamin-D-Rezeptoren oder PSA kodieren. Solche Genpolymorphismen könnten auch interethnische Inzidenzunterschiede erklären [5,6].

Androgene sind bekannte Wachstumsstimulatoren von normalen Prostataepithelzellen wie auch von Tumorzellen. Dies wird therapeutisch bei der Gabe von Antiandrogenen genutzt. Darüber hinaus zeigen Studien, dass Testosteron in Prostatakarzinomzellen zur Produktion von Sauerstoffradikalen führt, ein Mechanismus, der die Tumorentwicklung begünstigen soll [7].

Zahlreiche epidemiologische und migratorische Studien legen einen Zusammenhang zwischen faserarmer, fett- und fleischreicher Ernährung und der Inzidenz von Prostatakarzinomen nahe [8]. Der Einfluss von Nahrungsfetten wurde in mehreren Zellkultur- und Tierexperimenten bestätigt. So zeigte sich, dass die Behandlung von Prostatakarzinom-PC-3-Zellen mit essentiellen Fettsäuren wie Arachidonsäure, ihrem

Vorläufer Linolsäure sowie dem Arachidonsäure-Metaboliten Prostaglandin E2 (PGE2) zu einem verstärkten Tumorwachstum führte. Interessanterweise kam es nach der Gabe von Arachidonsäure zu einer erhöhten Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), nicht aber der konstitutiv exprimierten Cyclooxygenase-1 (COX-1) [9]. In einer In-vivo-Studie mit Mäusen, denen humane Prostatakarzinom-DU 145-Zellen transplantiert wurden, zeigte sich bei fettreicher Ernährung ein signifikant erhöhtes Tumorwachstum verglichen mit der Kontrollgruppe [10]. Als mögliche Mechanismen werden u.a. die verstärkte Bildung von Prostaglandinen, eine Veränderung der Zusammensetzung von Membranphospholipiden, die Bildung freier Radikale und eine Erhöhung des Androgenspiegels diskutiert. Rauchen gilt mittlerweile ebenfalls als möglicher Risikofaktor.

1.1.3 Klinik, Diagnose und Therapie

Die meisten Prostatakarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung asymptomatisch. Symptome wie Schmerzen im Beckenknochenbereich, Miktionsbeschwerden, eine Obstruktion der oberen Harnwege, eine spinale Kompressionssymptomatik, Aszites, Pleuraergüsse und Lymphödeme der unteren Extremitäten durch pelvinen Lymphknotenbefall sind Zeichen eines organüberschreitenden und metastasierten Tumorwachstums [11].

Zu den wichtigsten diagnostischen Maßnahmen zählen die digitale rektale Palpation, die Bestimmung des Serum-PSA-Werts und bildgebende Verfahren wie der transrektale Ultraschall. In Deutschland wird aktuell eine jährliche Frühuntersuchung ab dem 50. Lebensjahr empfohlen, ein systematisches populationsbasiertes PSA-Screening existiert aufgrund der kontroversen Datenlage nicht. Zwar stieg die Zahl der entdeckten Tumoren im organbegrenzten Stadium mit kurativer Therapieoption, andererseits befürchten Kritiker, dass mit dem Einsatz der PSA-Bestimmung zunehmend klinisch insignifikante Karzinome diagnostiziert werden und somit die Zahl unnötiger Biopsien und Behandlungen steigt [12]. Auch ist der PSA-Wert organ- und nicht tumorspezifisch und kann durch eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. Entzündungen, medikamentöse Behandlung oder iatrogene Manipulation beeinflusst werden.

Nach dem derzeitigen interdisziplinären Konsens sollte bei einem PSA-Wert über 4 ng/ml bzw. einem suspekten Tastbefund zur weiteren Abklärung eine Stanzbiopsie der Prostata, meist in Form einer transrektalen, ultraschallgesteuerten Feinnadelbiopsie

entnommen werden [13]. Im Rahmen der Verlaufskontrolle nach radikaler Prostatektomie gilt ein Anstieg des PSA-Wertes als Hinweis auf ein Tumorrezidiv bzw. eine Metastasierung. Dies wird biochemisches Rezidiv oder PSA-Rezidiv genannt, wobei die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit und die PSA-Verdoppelungszeit gut mit der Aggressivität des Tumors korrelieren und in mehreren Studien prognostische Relevanz für das Überleben bewiesen haben [14].

Die Therapie besteht je nach Stadium in einer radikalen Prostatektomie und Vesikulektomie mit pelviner Lymphadenektomie und einer alternativen oder adjuvanten Strahlentherapie. Liegen bereits Fernmetastasen vor, erfolgt eine antihormonelle Therapie. Prinzip ist hierbei die Wachstumshemmung des Tumors durch Androgen-deprivation in Form einer Orchiektomie oder Gabe von LHRH-Analoga, Antiandrogenen oder Östrogenderivaten. Die Behandlung von Patienten mit primär oder sekundär hormonrefraktären Tumoren erfolgt unter rein palliativen Gesichtspunkten z.B. in Form einer Chemo-, Hormon- oder Schmerztherapie [15,16].

1.1.4 Pathologie des Prostatakarzinoms- Tumortypen, Grading und Staging

Bei den Prostatakarzinomen handelt sich in 97% der Fälle um Adenokarzinome. Neben dem häufigsten azinären Adenokarzinom können u.a. auch duktale oder muzinöse Varianten vorkommen. Zu den selteneren Tumoren gehören Plattenepithel-, Transitionalzell-, Basalzellkarzinome, kleinzellige Karzinome, neuroendokrine Tumoren und mesenchymale Tumoren wie Rhabdo- oder Leiomyosarkome [17,18]. Das Prostatakarzinom ist zu 70% in der peripheren Zone, zu 25% in der Transitionalzone und zu 5% zentral lokalisiert. In mehr als 85% der Fälle entsteht der Tumor multizentrisch [6].

Die Prostatistische Intraepitheliale Neoplasie (PIN) gilt als Präkanzerose, d.h. als Vorstufe des Prostatakarzinoms, und wird je nach Ausmaß der Dysplasie in zwei Grade eingeteilt, der Low-grade-PIN und der High-grade-PIN [6]. Diese Läsion ist ebenfalls bevorzugt in der peripheren Zone lokalisiert und zeichnet sich histologisch durch Epithelotypen sowie büschelförmiges, mikropapilläres oder kribriiformes Wachstum bei noch erhaltener Basalzellschicht aus. Von der diffusen Atrophie der Prostata im Sinne einer senilen Organinvolution ist die fokale Drüsenatrophie abzugrenzen, zu der u.a. die Proliferative Inflammatorische Atrophie (PIA) gezählt wird. Sie ist ebenfalls peripher

lokalisiert und beschreibt Areale mit atrophischen Prostatadrüsen mit proliferierendem Drüsenepithel und einer akuten oder chronischen entzündlichen Begleitreaktion.

Bei der Feststellung des histologischen Malignitäts-Gradings bei Prostatakarzinomen kommen zwei unterschiedliche Systeme zur Anwendung: Das international verbreitete Grading nach Gleason bestimmt Grad und Art der drüsigen Differenzierung anhand eines standardisierten Schemas. Dabei werden die beiden häufigsten Wachstumsmuster auf einer Skala von 1 bis 5 bewertet und anschließend addiert, so daß Graduierungstufen von 2 (=1+1) bis 10 (=5+5) entstehen. So wird die häufige intratumorale Heterogenität berücksichtigt [19]. Das Grading-System des Pathologisch-Urologischen Arbeitskreises "Prostatakarzinom" nach Helpap, Böcking, Dhom und Kastendiek berücksichtigt neben histologischen auch zytologische Malignitätskriterien [20,21]. Das TNM-System fasst die Gleason-Grade 2-4 zum G1- die Gleason-Grade 5-6 zum G2- und die Gleason-Grade 7-10 zum G3-Stadium zusammen. Im Rahmen des klinisch-pathologischen Stagings werden gemäß der TNM-Klassifikation Tumorgröße (T), nodulärer Befall (N) und eine vorliegende Metastasierung (M) bestimmt [22].

1.1.5 Etablierte und neuere Prognosefaktoren

Zu den wichtigsten Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms gehören nach einer Einteilung des College of American Pathologists (CAP) das klinisch-pathologische Tumorstadium (Staging), der histologische Malignitätsgrad (Grading), der Tumorbefall der Absetzungsränder (Marginstatus) und der präoperative PSA-Wert [23].

Entsprechend der erwähnten Einteilung gehören zu den Faktoren, deren prognostische Bedeutung bekannt, jedoch statistisch noch nicht hinreichend belegt ist, die DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Ploidie, der histologische Typ und das Tumolvolumen in der Stanzbiopsie bzw. dem Prostatektomiepräparat. Faktoren, deren prognostische Wertigkeit noch nicht hinreichend gesichert ist, sind Nervenscheideninvasionen, Blut- und Lymphgefäßeinbrüche und die Mikrogefäßdichte.

Problematisch ist allerdings, dass ein Großteil der an einem Prostatakarzinom erkrankten Patienten sehr ähnliche klinisch-pathologische Parameter aufweisen. In den meisten Fällen bleibt der Tumor auf die Prostata beschränkt und befindet sich somit im Stadium pT2. Im vorliegendem Patientenkollektiv waren dies 59,6%. Darüber hinaus weisen die meisten Tumoren eine mäßige bis geringe Differenzierung auf. So entfielen in dieser Studie allein 34,6% der Tumoren auf einen Gleason-Grad 7 (3+4 bzw. 4+3)

und 25% der Tumoren auf einen Gleason-Grad 6 (3+3). Nichtsdestotrotz zeigen diese Patienten unterschiedlich lange Zeiten bis zum Auftreten eines PSA-Rezidivs. Klassische Prognosefaktoren wie die Tumorgröße oder -differenzierung haben in diesen Fällen nur eingeschränkt Aussagekraft.

In diesem Zusammenhang gewinnen zunehmend immunhistochemische Marker an Bedeutung, wie z.B. der Proliferationsmarker Mib-1, die Onkogene bcl-2, p53, HER-2/neu, der Zellzyklusinhibitor p27 sowie ALCAM und CD 24 [24,25]. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass ein erhöhter Mib-1-Index bzw. eine erhöhte Expression der Onkogene bcl-2 oder p53 unabhängige prognostische Marker für ein PSA-Rezidiv, das Auftreten von Metastasen und das tumorspezifische Überleben darstellen [26,27]. Chromogranin A als Zeichen einer neuroendokrinen Differenzierung sowie die mittels DNA-Zytometrie bestimmte Aneuploidierate werden als Marker für die Androgenresistenz des Tumors diskutiert [28].

Neben den genannten etablierten Prognosefaktoren könnte der Nachweis molekularer Parameter eine genauere Abschätzung der individuellen Rezidiv-Wahrscheinlichkeit und damit eine jeweils patientenorientierte Therapieplanung mit besseren Resultaten ermöglichen. Ineffektive, nebenwirkungsreiche Therapien könnten dem Patienten erspart bleiben, wenn das Expressionsprofil des Tumors auf eine vermindertes Ansprechen der Therapie hinweist. Darüber hinaus würden sich im Falle einer Überexpression eines offenbar tumorfördernden Proteins neue Therapiemöglichkeiten ergeben, beispielsweise durch den Einsatz monoklonaler Antikörper. Dies geschieht bereits in der Therapie des Mammakarzinoms. Hier werden die Tumoren routinemäßig immunhistochemisch auf eine Expression des Proteins cErbB2 (HER2/neu) untersucht. Im Falle einer Überexpression erhält die Patientin den HER2/neu-Antikörper Herceptin. Aufgrund der hohen Kosten einer solchen Art von Tumortherapie wäre die immunhistochemische Bestimmung molekularer Marker auch unter gesundheitsökonomischen Gesichtspunkten sinnvoll.

Ziel dieser Studie ist es, zwei potentielle molekulare Prognoseparameter im Prostatakarzinom zu untersuchen: Das entzündungsassoziierte Protein Cyclooxygenase-2 (COX-2) und das ELAV-ähnliche Protein HuR.

1.2 Parallelen zwischen Entzündungsreaktionen und Tumorgewebe

Die Reaktion des Körpers auf einen malignen Tumor weist viele Parallelen zu entzündlichen Prozessen sowie zur Wundheilung auf. So veranlasste bereits im Jahre 1863 die Beobachtung leukozytärer Infiltrate in neoplastischem Gewebe Rudolf Virchow zu der Annahme, die Ursache der Tumorentstehung läge in einer chronischen Entzündung. In der Tat gilt in einigen Tumorarten die persistente, lokale Entzündung als karzinogener Stimulus. Beispiele sind eine erhöhte Inzidenz von Magenkarzinomen bei Patienten mit chronischer *Helicobacter-pylori*-induzierter Gastritis oder von Leberzellkarzinomen bei chronischer Hepatitis B und C.

Die Rolle einer chronischen Entzündung der Prostata in der Entwicklung eines Prostatakarzinoms wird ebenfalls diskutiert. Eine Metaanalyse von 11 Fall-Kontrollstudien zeigte ein erhöhtes relatives Risiko für ein Prostatakarzinom bei Patienten mit einer symptomatischen Prostatitis in ihrer Vorgeschichte (RR=1,6, 95% CI: 1,0-2,4, p=0,005) [29]. Ein erhöhtes relatives Risiko ergab sich auch für Patienten mit sexuell übertragbaren Infektionen wie z.B. einer vorangegangenen Syphilis (RR=2,3, 95% CI: 1,3-3,9, p=0,47) oder einer Gonorrhoe (RR=1,3, 95% CI: 1,0-1,6, p=0,24) [30]. Darüber hinaus haben genetische Studien gezeigt, dass Keimbahnmutationen in bestimmten, für die Immunabwehr essentiellen Genen mit einem erhöhten Prostatakarzinom-Risiko assoziiert sind [31].

Die Rolle der Proliferativen Inflammatorischen Atrophie (PIA) in der Entstehung des Prostatakarzinoms wird kontrovers diskutiert. Grund dafür ist u.a. ihre häufige Lokalisation in Nachbarschaft einer PIN oder eines Prostatakarzinoms und die hohe proliferative Aktivität der Drüsenzellen. Einige Autoren vertreten die Hypothese, die PIA entwickle sich als Antwort auf eine lokale Ischämie oder Infektion, gefolgt von einer Epithelregeneration und Entzündungsreaktion, in deren Verlauf es zu einer oxidativen DNA-Schädigung und schließlich zu der Entwicklung einer PIN bzw. eines Prostatakarzinoms kommt [31,32]. Auf genetischer Ebene scheinen PIA-Läsionen und PIN- bzw. Prostatakarzinomzellen zumindest einige Gemeinsamkeiten zu haben. Eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 konnte von Tsujimoto et al. sowohl in 5,3% der PIA-Zellen als auch in 4,2% der High-grade-PIN-Läsionen nachgewiesen werden [33]. Ebenso zeigte sich sowohl in PIA-, PIN- und Prostatakarzinomzellen ein Zuwachs an DNA-Sequenzen im Zentromer des Chromosoms 8 [34].

Zu den im Tumorgewebe befindlichen Entzündungszellen zählen u.a. Tumor-assoziierte Makrophagen, die einerseits in der Lage sind, Tumorzellen zu eliminieren, jedoch andererseits Wachstums- und Angiogenese-Faktoren sowie Proteasen produzieren, die die Tumorzellproliferation, -invasion und -metastasierung begünstigen. Angelockt werden die Leukozyten durch chemoattraktive Zytokine, sogenannte Chemokine, die von den Tumorzellen produziert werden. Darüber hinaus sezernieren die Tumorzellen proinflammatorische Zytokine wie den vaskulo-endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und den Tumornekrosefaktor (TNF) und stimulieren die Bildung von Interleukin (IL)-1 und -6 in Stromazellen [35].

Die genannten Zytokine begünstigen die Tumorgenese durch vielfältige Mechanismen: So kann beispielsweise TNF durch Induktion der NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase zu einer Schädigung der DNA oder von DNA-Reparaturproteinen führen. Interleukine sind zudem potente Wachstumsfaktoren und stimulieren Tumorzellwachstum und -proliferation. Daneben induzieren Zytokine die Produktion proangiogenetischer Faktoren wie VEGF und fördern somit die Tumurvaskularisierung. Zusätzlich erleichtern sie die Tumorzellinvasion und Metastasierung durch Induktion von Proteasen und Adhäsionsmolekülen. Eine effektive Immunreaktion des Körpers gegen den Tumor wird durch Modulation der Immunantwort verhindert. Auf diese Weise unterhalten die Tumorzellen eine Entzündungsreaktion, die unter normalen Bedingungen selbstlimitierend wäre. Dieser Umstand führte Dvorak 1986 zu der prägnanten Formulierung: "Tumours: wounds that do not heal" [36].

1.3 Die Cyclooxygenasen und ihre physiologische Rolle im Arachidonsäurestoffwechsel

1.3.1 Entdeckung der Cyclooxygenasen

Die Cyclooxygenase (COX) ist das Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels. Es existieren zwei Isoenzyme, die COX-1 und COX-2: Synonyme für die COX sind Prostaglandin-Endoperoxidase-Synthase und Prostaglandin H-Synthase. Die COX-1 wurde 1976 von Miyamoto et al. in Rinder-Samenblasen isoliert und 1988 von DeWitt et al., Merlie et al. und Yokoyama et al. aus Schafszellen und 1989 von Yokoyama et al. aus humanen Zellen kloniert [37-41]. Die Isolierung und Sequenzierung der COX-2 gelang erstmals 1991 aus Hühnerembryofibroblasten durch Xie et al. und zeitgleich aus Swiss-mouse-3T3-Zellen durch Kujubu et al. [42,43]. Es folgten die Klonierung aus C127- Mausfibroblasten durch O'Banion et al. 1992 sowie der erste humane Klon 1992 durch Hla et al. [44,45]. Arbeiten einiger Gruppen deuten auf die Existenz eines dritten Isoenzyms hin. Das Vorhandensein dieser sogenannten Cyclooxygenase-3 (COX-3), die eine Variante der COX-1 darstellt, wurde 2000 von Whilloughby et al. postuliert und 2002 von Chandrasekharan et al. erstmals aus Zellen des zerebralen Kortex des Hundes isoliert und sequenziert [46,47].

1.3.2 Die Cyclooxygenase als Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels

Prostaglandine (PG), Thromboxane und Leukotriene werden auch Eikosanoide genannt und sind allesamt Arachidonsäuremetabolite. Manche Autoren bevorzugen den Begriff Prostanoide und subsummieren darunter alle aktiven Metabolite des Prostaglandin H₂: Prostaglandine A₂, D₂, E₂, F₂, I₂, J₂ und Thromboxan A₂ [48]. Arachidonsäure ist eine ungesättigte Fettsäure, die sich, verestert mit Phospholipiden, in der Zellmembran befindet. Sie wird entweder durch die Nahrung zugeführt oder aus der essentiellen Fettsäure Linolsäure synthetisiert. Nach Abspaltung von den Membranphospholipiden durch die Phospholipase A₂ kann sie auf drei Wegen verstoffwechselt werden. Dazu gehören die Umwandlung zu Prostaglandinen durch die COX, zu Leukotrienen durch die Lipoxygenase und zu Epoxy- und Omegaderivaten durch das Cytochrom P450-System. Bei der Cyclooxygenase handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym mit einer Cyclooxygenase-Aktivität, die zunächst zur Bildung des instabilen Prostaglandin G₂ (PGG₂) führt und einer Endoperoxidase (POX)-Aktivität, die letztere

zum stabilen Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert. PGH₂ wird durch gewebespezifische Isomerasen in andere stabilere Prostaglandine wie z.B. PGE₂, PGF₂α und Thromboxan A₂ umgewandelt (Abbildung 1).

Nach erfolgter Synthese werden die Prostaglandine durch spezifische Transporter in den extrazellulären Raum sezerniert, wo sie als autokrine und parakrine Mediatoren ihre Wirkung in ihrer unmittelbaren Umgebung entfalten. Welche Prostaglandine eine Zelle produziert, hängt von der enzymatischen Ausstattung des jeweiligen Zelltyps ab. So wird in Endothelzellen vornehmlich PGI₂ produziert, während in Thrombozyten die Synthese von Thromboxan A₂ dominiert. Manche der Isomerasen wie z.B. die Prostaglandin D-Synthase werden auch sezerniert und befinden sich extrazellulär in der Gefäßwand [49]. Interessanterweise verwenden die COX-1 und die COX-2 unterschiedliche Substratquellen. Während die COX-2 endogene Arachidonsäure verstoffwechseln kann, ist die COX-1 auf deren exogene Zufuhr angewiesen [48].

Einige Prostaglandine wie z.B. PGE₂ binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, und bewirken dadurch viele physiologische Prozesse wie die Thrombozytenaggregation, die Kontraktion oder Relaxation der glatten Muskulatur, Änderungen der Gefäßpermeabilität, aber auch die Angiogenese im Rahmen von entzündlichen Prozessen. Andere Prostaglandine aktivieren sogenannte intrazellulär lokalisierte PPAR (Peroxisomal Proliferator Activated Receptor)-Rezeptoren, die im Zellkern als Transkriptionsfaktoren fungieren. Über diesen Signalweg können Prostanoiden wie PGE₂ oder PGI₂ beispielsweise die virale Replikation verhindern, Apoptose induzieren oder die Zelldifferenzierung beeinflussen.

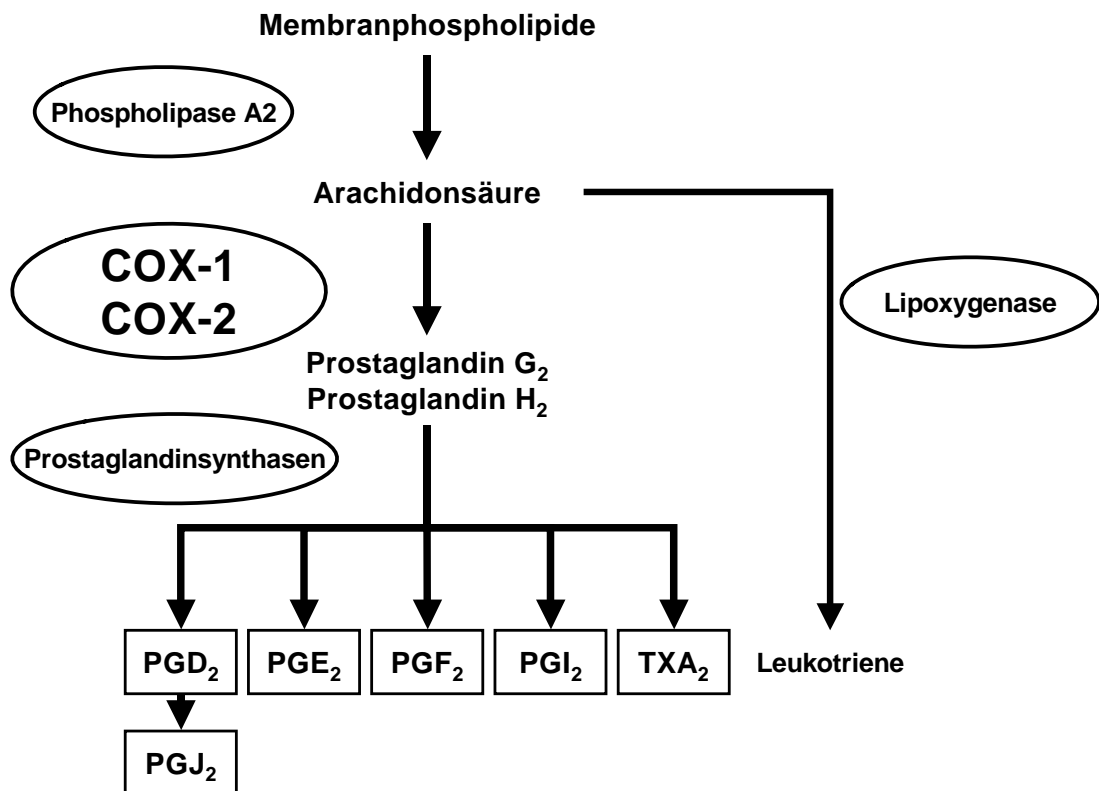


Abbildung 1: Die COX-2 als Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels (modifiziert nach Thun et al. [50]) (PG=Prostaglandine)

1.3.3 Unterschiede zwischen der COX-1 und COX-2

Das 22 kb große Gen der COX-1 befindet sich auf dem humanen Chromosom 9q32-q33.3, beinhaltet 11 Exons und produziert eine 2,8 kb lange messenger-Ribonukleinsäure (mRNA), die zu einem Protein mit einem Molekulargewicht von 85 kDa translatiert wird. Demgegenüber misst das Gen der COX-2 nur 8 kb und ist auf Chromosom 1q25,2-q25,3 lokalisiert; 10 Exons werden in eine 4,0 kb lange mRNA transkribiert, die ihrerseits ein 68 kDa schweres Protein kodiert [51]. Das von einigen Autoren als COX-3 bezeichnete Enzym entsteht durch Transkription des COX-1-Gens, wobei es im Gegensatz zu der COX-1 das Intron 1 beibehält, und ist damit eine Splicevariante der COX-1. Die entsprechende mRNA ist ca. 5,2 kb lang und wird in ein Protein mit einem Molekulargewicht von 65 kDa translatiert [47]. Die COX-3 wird in menschlichem Gewebe vor allem im zerebralen Kortex und im Herzen exprimiert.

Trotz ihrer sich sowohl in Lokalisation als auch Länge unterscheidenden Gene, besteht auf DNA-, RNA- und Proteinbasis eine weitgehende Ähnlichkeit der beiden Cyclooxygenasen-1 und -2. So stimmen sie zu 60% in ihrer Primärsequenz und zu 98% in ihrer Aminosäuresequenz überein [52]. Die mit 4 kb weitaus längere mRNA der COX-2 verfügt über eine vergleichsweise große 3'-untranslatierte Region von mehr als 2000 Nukleotiden, darunter 12-18 AUUUA-Sequenzen, die einen schnellen und selektiven mRNA-Abbau vermitteln. Die Enzyme bestehen aus drei unabhängigen faltbaren Einheiten, einer Epidermalen-Wachstumsfaktor (EGF)-Domäne, einem Membran-bindenden Abschnitt, und einer enzymatischen Domäne, die den Angriffspunkt für die Nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) darstellt: Man unterscheidet zwei benachbarte, aber räumlich getrennte aktive Zentren, die für die COX- und POX-Aktivität stehen. Verglichen mit der COX-1 verfügt die COX-2 über ein ca. 25% größeres aktives Zentrum. Dieser Unterschied könnte die Substrat-Vielfalt dieses Isoenzym und die geringere relative Affinität von nicht-selektiven NSAID für die COX-2 erklären. In vitro zeigte sich nämlich, dass die COX-2 eine größere Vielfalt von Fettsäuren oxygenieren kann. Darüberhinaus verfügt die COX-2 nach Acetylierung durch Aspirin noch über eine Rest-COX-Aktivität, die zur Bildung eines neuen Produktes, 15*R*-HETE, führt, während eine Acetylierung von COX-1 eine sterische Blockade bewirkt und somit eine Substrat-Bindung vollständig verhindert [51]. Die COX-Isoenzyme sind auf der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums und der nukleären Membran lokalisiert [53]. Sie befinden sich nur in einer Schicht der Lipiddoppelmembran und sind somit monotrope Membranproteine.

Unterschiede zwischen den COX-Isoenzymen bestehen nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in ihrer Expression und der Funktion der durch sie produzierten Prostaglandine. Die COX-1 wird konstitutiv und ubiquitär, d.h. in allen humanen Gewebearten exprimiert und ist an der Regulation zahlreicher physiologischer Abläufe beteiligt, weshalb sie auch als "house keeping"-Enzym bezeichnet wird. Die durch sie produzierten Prostaglandine sind für die Thromboxan-Synthese in Thrombozyten verantwortlich. In der Niere vermitteln sie bei aktiviertem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eine Vasodilatation der renalen Gefäße und sichern so die Nierendurchblutung und die Aufrechterhaltung der Glomerulären Filtrationsrate bei systemischer Vasokonstriktion. Ebenso regulieren sie im Magen die Mikrozirkulation in der Schleimhaut. Im Gegensatz zur COX-1 wird die COX-2 in normalem Gewebe nicht exprimiert, sondern nur unter bestimmten Bedingungen induziert. Dies geschieht vor

allem im Rahmen von Entzündungsreaktionen, in denen die COX-2 zur Bildung von Prostaglandinen führt, die als Regulatoren der akuten und chronischen Immunantwort, Schmerzvermittlung und Wundheilung dienen. Daneben ist die COX-2 auch an anderen Prozessen beteiligt, z.B. an der Regulation zentralnervöser Funktionen wie Fieber, Schmerzrezeption und lokalen inflammatorischen Reaktionen. Ergebnisse aus Tierexperimenten und Expressionsstudien in Rattennieren legen zudem einen Einfluss der COX-2 auf den Elektrolyt- und Wasser-Haushalt nahe. Im Magen zeigte sich in Epithelzellen nach bakterieller Infektion und Entzündung eine erhöhte COX-2-Expression und Prostaglandin-Synthese, die zur vermehrten Schleimbildung und Angiogenese im Sinne einer Wundheilung führte. Physiologische Prozesse, in denen die COX-2 eine Rolle spielt, sind die Weheninduktion, Ovulation und Embryoimplantation, im Knochen eine Aktivierung oder Inhibierung der Kollagensynthese, die Stimulation der Differenzierung von Osteoblasten und -klasten sowie die Sensitivierung der peripheren Schmerzrezeption und Erleichterung der Schmerztransmission im Rückenmark [50].

1.3.4 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID)- Unterschiede zwischen nicht-selektiven und COX-2-selektiven Inhibitoren

Acetylsalicylsäure wurde 1893 erstmals von der Firma Bayer unter dem Namen Aspirin produziert [50]. Anfang des darauffolgenden Jahrhunderts folgte die Entwicklung einer Medikamentenklasse, die in Abgrenzung zu den ebenfalls antientzündlich wirksamen Glukokortikoiden Nichtsteroidale Antiphlogistika bzw. Antirheumatika oder im internationalen Sprachgebrauch "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs" (NSAID) genannt werden. Trotz ihres weitverbreiteten Einsatzes wurde der Wirkungsmechanismus erst 1971 von Vane et al. beschrieben [54]. Demnach beruht die antiinflammatorische Wirkung der NSAID auf der Inhibition der COX, die zu einer verminderten Produktion der proinflammatorischen Prostaglandine führt. Inhibiert wird nur die COX-Aktivität, nicht jedoch die POX-Aktivität. Deren Prostaglandin-Syntheseweg wurde einige Jahre zuvor von Samuelsson und Bergstrom veröffentlicht, die zusammen mit Vane im Jahr 1982 für ihre bahnbrechende Forschung über Prostaglandine mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet wurden.

Aufgrund ihrer antiinflammatorischen, antipyretischen und analgetischen Eigenschaften werden die NSAID bei Schmerzen, Fieber und akuten und chronischen Entzündungen

wie z.B. bei rheumatischen Erkrankungen eingesetzt. Die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung der Acetylsalicylsäure wird bei deren Einsatz im Rahmen der Thrombembolie-Prophylaxe und der Prävention zerebraler Durchblutungsstörung sowie in der Prävention und Therapie des akuten Koronarsyndroms genutzt. Zu den häufigsten unerwünschten Effekten gehören gastrointestinale Nebenwirkungen wie Magenerosionen, -ulzera und -blutungen. Weitere Nebenwirkungen sind Nierenfunktionsstörungen bis hin zum akuten Nierenversagen, eine verlängerte Blutungszeit durch Thrombozytenaggregationshemmung, Unverträglichkeitsreaktionen (Hautreaktion, "Aspirin-Asthma") sowie unspezifische zentralnervöse Beschwerden wie Kopfschmerzen und Schwindel [55]. Die NSAID unterscheiden sich bezüglich ihrer Bindungs- und Inhibitionskinetik und können zu einer reversiblen oder -wie im Falle des Aspirins -zu einer irreversiblen Hemmung der COX-Aktivität führen. Weiterhin unterscheidet man nach der relativen Inhibition der Isoenzyme COX-1-präferente Inhibitoren, equipotente Inhibitoren der COX-1 und COX-2 und COX-2-präferente Inhibitoren [51].

Zu den COX-2-selektiven Inhibitoren gehören Celecoxib, Rofecoxib, Etoricoxib und Parecoxib. Therapeutisch eingesetzt werden sie bei Arthrose und rheumatoider Arthritis. Bei gleicher Effektivität führen sie im Vergleich mit nicht-selektiven NSAID zu geringeren gastrointestinalen Nebenwirkungen [56,57]. Rofecoxib und Valdecoxib wurden im Jahr 2005 vom Markt genommen, da es in der Langzeittherapie zum vermehrten Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wie Myokardinfarkt, Apoplex oder Lungenembolie gekommen war [57,58]. Eine alleinige COX-2-Inhibition könnte zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des thrombozytenaggregationsfördernden Thromboxans führen, dessen Synthese durch COX-1 vermittelt wird, während es gleichzeitig zu einer verminderten Produktion des thrombozytenaggregationshemmenden und vasodilatationsfördernden Prostaglandin I₂ kommt. Kardiovaskuläre Vorerkrankungen gelten deshalb als Kontraindikation für eine Therapie mit COX-2-Inhibitoren.

In der von Caldwell et al. veröffentlichten Metaanalyse von sechs randomisierten Studien, in denen eine mindestens sechs Monate dauernde Gabe von Celecoxib im Vergleich zu einem Placebo oder anderen nicht-selektiven NSAID verglichen wurde, zeigte sich ein signifikant erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt (RR=1,88, 95% CI: 1,15-3,08), jedoch nicht für andere kardiovaskuläre oder zerebrovaskuläre

Ereignisse [59]. Die Metaanalyse von Kearney et al. bestätigte ebenfalls eine signifikante Zunahme von Myokardinfarkten bei Gabe von selektiven COX-2-Inhibitoren versus Placebo (RR=1,86, 95% CI: 1,33-2,59, p=0,0003), wobei es keine signifikante Heterogenität unter den einzelnen Substanzen gab (p=0,9) [60]. Es wird deshalb vermutet, dass es sich hier um einen klassenspezifischen Effekt handelt [59,60].

1.4 Tumorbiologische Bedeutung der COX-2

1.4.1 Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der COX-2 und der Entstehung von Tumoren

Schon Anfang der siebziger Jahre fand man eine erhöhte Konzentration von Prostaglandinen in humanem und tierischem Tumorgewebe im Vergleich zum umgebenden Normalgewebe [48,51]. In den darauffolgenden Jahren haben verschiedene Expressionsstudien ein vermehrtes Auftreten der COX-2 in mehreren humanen malignen Tumoren gezeigt. Eberhart et al. fanden 1994 erstmals eine erhöhte COX-2-Expression in Kolonkarzinomen. Dabei zeigte sich eine schwache, sowohl in Normal- als auch Tumorgewebe nachweisbare COX-1-Expression, während die COX-2 fast ausschließlich im Tumorgewebe exprimiert war. Auch in anderen Tumoren des Gastrointestinaltrakts wie Ösophagus-, Magen- und Pankreaskarzinomen, sowie in Malignomen des gynäkologischen und urogenitalen Systems wie beispielsweise im Harnblasen-, Mamma- und Ovarialkarzinom konnte sukzessive eine vermehrte COX-2-Expression nachgewiesen werden [61-66]. Interessanterweise fand sich dabei auch eine erhöhte COX-2-Expression in prämaligen Vorläuferläsionen oder prädisponierenden, chronisch-entzündlichen Erkrankungen [67-69].

Vor allem genetische Studien legten einen kausalen Zusammenhang der COX-2 mit der Entstehung von Tumoren nahe. So führte in transgenen Mäusen eine COX-2-Überexpression in den Brustdrüsen zu einer fokalen Hyperplasie, Dysplasie und schließlich zur Entwicklung von metastasierenden Tumoren [70]. Ähnlich kam es im Mausmodell zur epidermalen Dysplasie, wenn basale Keratinozyten COX-2 überexprimierten [71]. Umgekehrt zeigte sich in COX-2-defizienten Knockout-Mäusen eine reduzierte intestinale Tumorgenese, eine verminderte Tumorbildung der Haut und ein insgesamt verlangsamtes Tumorwachstum [72-74]. In einem Mausmodell für

humane Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP), einer erblichen obligaten Präkanzerose, die durch das Auftreten multipler kolorektaler Adenome mit einem hohen Entartungsrisiko gekennzeichnet ist, waren Zahl und Größe der Adenome in COX-2-defizienten Mäusen geringer verglichen mit Wildtyp-Mäusen [75].

1.4.2 Mechanismen der COX-2 in der Tumorentstehung

Die genauen Mechanismen des Einflusses der COX-2 auf die Tumorgenese sind nach wie vor Gegenstand der Forschung. Zahlreiche Studien haben bisher gezeigt, dass eine COX-2-Überexpression in Tumoren mit gesteigerter Angiogenese, Zellwachstum und -proliferation, einer verminderten Apoptoserate und einer erhöhten Tumordinvasivität korreliert [53].

Die Bildung neuer Gefäße spielt nicht nur bei der Wundheilung, sondern auch bei Tumorwachstum und -metastasierung eine bedeutende Rolle. Der Effekt von COX-2 auf die Bildung neuer Gefäße wird auf eine Induktion proangiogenetischer Mediatoren wie VEGF und bFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) zurückgeführt. Eine starke Korrelation der erhöhten COX-2-Expression mit der VEGF-Expression und Mikrogefäßdichte konnte in verschiedenen Tumoren wie Bronchial-, Mamma- und Kolonkarzinomen, aber auch in nicht-malignem Gewebe wie der Kornea nachgewiesen werden [76,77]. Hinzu kommt der direkte proangiogenetische Effekt einiger Prostaglandine wie PGI₂, PGE₂ oder Thromboxan A₂ [78-80]. Daneben sollen Prostaglandine die Neovaskularisation durch Induktion von Wachstumsfaktoren wie EGF sowie durch Inhibition des Zelltods von Gefäßendothelzellen fördern [53]. Erhöht anfallende COX-2-Produkte wie Thromboxan A₂, PGE₂ und PGI₂ können darüber hinaus die DNA-Synthese und damit die Zellproliferation stimulieren [81].

Auch die Inhibition des programmierten Zelltods, der Apoptose, durch COX-2 ist ein wichtiger Schritt in der Tumorentstehung. Anlass zu dieser Vermutung gab die Beobachtung, dass sowohl nicht-spezifische als auch COX-2-spezifische Inhibitoren in der Lage sind, in zahlreichen Zellarten Apoptose zu induzieren. Lu et al. konnten 1995 erstmals beobachten, dass NSAID in Hühnerembryo-Fibroblasten zum Zelltod führten [82]. Weitere Studien u.a. mit Kolon-, Magen-, Ösophagus-, Pankreas- und Bronchialkarzinom-Zelllinien ergaben ähnliche Ergebnisse [83-86]. In intestinalen Epithelzellen von Ratten führte eine COX-2-Überexpression zu einer signifikant verminderten Antwort auf verschiedene apoptotische Stimuli sowie zu einer erhöhten

Expression des antiapoptotischen Faktors bcl-2 und einer verminderten Expression von TGF- β . Durch den COX-2-Inhibitor Sulindacsulfid kam es zu einer Umkehr dieses Effekts [87].

Daneben scheint auch das Substrat der COX eine Rolle zu spielen: So hatte in Kolonkarzinomzellen ein Anstieg der intrazellulären freien Arachidonsäure-Konzentration nach Gabe von NSAID eine erhöhte Apoptoserate zu Folge. Dabei wird zum einen eine Aktivierung des für die Apoptose essentiellen Enzyms Caspase-3 diskutiert, zum anderen wird vermutet, dass ein erhöhter Arachidonsäure-Spiegel die Konversion von Sphingomyelin zu dem proapoptotischen Produkt Ceramid stimuliert [88,89]. Unabhängig von den bereits genannten Wegen könnte auch die Stimulierung von Proliferations-Signalwegen zu einer Apoptose-Hemmung führen, so z.B. über Aktivierung des NF κ B-Signalwegs oder Blockierung der Akt-Kinase-Aktivierung.

Darüber hinaus zeigte sich in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Studien, dass eine erhöhte COX-2-Expression mit einer gesteigerten Zellmotilität, Zelladhäsivität und Tumorinvasivität einhergeht. COX-2-überexprimierende intestinale Rattenepithelzellen wiesen eine stark verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls E-cadherin und eine verstärkte Adhäsion an extrazelluläre Matrix-Proteine auf [87]. Studien mit humanen Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzelllinien zeigten außerdem eine erhöhte Produktion der für die Tumorzellinvasion wichtigen Matrixmetalloproteinasen, die durch Zugabe von Ibuprofen oder dem COX-2-selektiven Inhibitor NS 398 signifikant reduziert wurde [90,91].

Ebenfalls von Bedeutung ist die COX-2-vermittelte Immunsuppression und die damit verbundene Hemmung der antitumoralen Immunreaktion des Körpers. Im Mausmodell zeigte sich unter Gabe von COX-2-spezifischen Inhibitoren eine Zunahme der lymphozytären Infiltration und ein vermindertes Wachstum des Tumorgewebes. Dies wird auf die COX-2-vermittelte Abnahme von Zytokinen und anderen für die Antitumor-Reaktion wichtigen Immunmodulatoren wie z.B. IL-12 sowie die Zunahme des immunsuppressiv wirkenden IL-10 zurückgeführt [92].

1.4.3 Tumorprotektive Wirkung von NSAID

Zusätzlich zu den genannten genetischen Experimenten haben epidemiologische Daten, Tierexperimente und klinische Studien gezeigt, dass NSAID bzw. selektive COX-2-

Inhibitoren antitumorale Eigenschaften besitzen. Besonders ausführlich wurde in dieser Hinsicht das Kolonkarzinom untersucht.

In Nagetierversuchen mit chemisch induzierten intestinalen Tumoren zeigte die Gabe von konventionellen NSAID einen Rückgang von Tumoranzahl und -größe um 40-60%. Selektive COX-2-Inhibitoren wie Celecoxib senkten die Tumorzinzidenz dabei um bis zu 90% und wurden weitaus besser toleriert als vergleichbare Dosen nicht-selektiver NSAID. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass nicht-selektive NSAID am effektivsten wirkten, wenn sie kurz vor oder gleichzeitig mit dem Karzinogen verabreicht wurden, während selektive COX-2-Inhibitoren auch noch bei verzögerter Gabe zu einem Rückgang des Tumorwachstums führten [48]. Ergebnisse anderer Tiermodelle mit induzierten oder transplantierten Tumoren sprechen für eine gleichartige Wirkung von NSAID in Tumoren anderer Organe. In dem bereits erwähnten FAP-Mausmodell mit APC Δ 716-Mäusen führte die Gabe von nicht-selektiven und selektiven NSAID zu einer verminderten Entwicklung von Adenomen [75]. Randomisierte klinische Studien mit FAP-Patienten, die mit Sulindac oder Celecoxib behandelt wurden, konnten dies bestätigen und zeigten zusätzlich eine Regression existierender Adenome. So konnte nach einer 6-monatigen Behandlung mit Celecoxib eine signifikante Reduktion der Adenome um 32% erreicht werden [93].

Zahlreiche epidemiologische Studien haben berichtet, dass die regelmäßige Einnahme von Aspirin und anderen NSAID mit einer geringeren Inzidenz intestinaler Adenome und kolorektaler Karzinome verknüpft sei [48]. Dies gilt auch für zahlreiche andere Tumoren z.B. des oberen Gastrointestinaltrakts, der Mamma, der Lungen und des Urogenitaltrakts, die Ergebnisse sind jedoch weniger konsistent [50]. Eine mögliche Chemoprävention kolorektaler Karzinome durch NSAID wird aufgrund der kardiovaskulären Nebenwirkungen zunehmend als schwierig angesehen. Dagegen wird der therapeutische Einsatz von NSAID in der Behandlung präkanzeröser Läsionen wie der ösophagealen Barrett-Dysplasie oder aktinischen Keratose oder im Rahmen der adjuvanten Therapie solider COX-2-exprimierender Tumoren erforscht [50].

1.4.4 Regulation der COX-Expression

Man unterscheidet generell die transkriptionale, posttranskriptionale und translationale Regulation. Auf Ebene der Genexpression wird die COX-1 analog zu ihrer "housekeeping"-Funktion in Zellruhe und während der Zelldifferenzierung induziert.

Im Gegensatz dazu besitzt das COX-2-Gen eine TATA-Box, eine AT-reiche Region, deren Bindung durch Transkriptionsfaktoren zur Transkription des nachgeschalteten Gens führt. Zu diesen gehören zahlreiche Wachstumsfaktoren wie der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) oder der Transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β), Zytokine wie IL-1 α , IL-6 und TNF- α und andere proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie NF κ B. Weitere Faktoren, die durch Bindung an die Promotorregion die Transkription hochregulieren, sind Androgene, die induzierbare NO-Synthase und eine Reihe von Onkogenen wie Her2/neu, Wnt, ras und src. Auf der anderen Seite kann die Transkription durch das Tumorsuppressorgen p53 oder negatives Feedback durch Prostaglandine supprimiert werden [94].

Aufgrund der neuesten Erkenntnisse über die erhöhte Expression von COX-2 in Tumoren sind auch die Mechanismen, die ihre Expression regulieren, ins Interesse der Forschung gerückt. Bisher vorliegende Studien über die Regulation auf transkriptionaler Ebene konnten jedoch nicht die anhaltend erhöhten COX-2-Proteinspiegel erklären, die für das Tumorwachstum verantwortlich gemacht werden. Zwar wurde in Kolonkarzinomzelllinien eine konstitutive Aktivierung der COX-2-Promoter-Region beobachtet [95]. Neben eindeutig erhöhten COX-2-mRNA-Werten in kolorektalen Adenomen und Adenokarzinomen konnte jedoch eine Zunahme der COX-2-Proteine und Prostaglandine nicht in allen Tumoren und Zelllinien nachgewiesen werden [96-98]. Diese Diskrepanz zwischen erhöhten COX-2-mRNA-Werten und unveränderten COX-2-Protein-Spiegeln wurde vor allem bei kleinen Polypengrößen beobachtet und schien auf die frühen Stadien der Tumorentwicklung beschränkt zu sein [96]. Dixon et al. postulierten deshalb, dass ein weiterer wichtiger Schritt in der Tumorentwicklung auf posttranskriptionaler Ebene zu suchen sei [99].

Die COX-2-mRNA besitzt eine große 3'-untranslatierte Region (3'-UTR), die multiple Kopien von Adenylat- und Uridylat-reichen Sequenzen enthält [100]. Durch Bindung an diese Regionen kann entweder eine mRNA-Stabilisierung oder eine -Destabilisierung erreicht werden. Zu diesen RNA-bindenden Proteinen gehört unter anderem das humane ELAV-ähnliche Protein HuR.

1.5 Das humane ELAV-ähnliche Protein HuR

1.5.1 Hu-Proteine- Entdeckung, Expression und intrazelluläre Lokalisation

HuR wurde erstmals 1996 von Ma et al. kloniert [101]. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 32 kDa und gehört zu der Familie der sogenannten Embryonic-lethal abnormal vision (ELAV)-ähnlichen Proteine, die noch drei weitere Proteine, HuB, HuC und HuD, umfasst und eine große Homologie zu dem nukleären ELAV-Protein der *Drosophila melanogaster* aufweist. Der Name beruht auf der Beobachtung, dass eine Deletion aufgrund einer abnormalen Entwicklung von Neuronen schon im Embryonalstadium letal verläuft, während Mutationen eine neuronale Differenzierungsstörung zur Folge haben, die sich vor allem in einer Malformation der Augen manifestiert [102].

Während HuB, HuC und HuD in differenzierten Neuronen exprimiert werden, findet sich HuR ubiquitär in verschiedenen Zelltypen [103,104]. Eine ektope Expression dieser Proteine ist u.a. im kleinzelligen Bronchialkarzinom beschrieben [104]. Im Rahmen der Tumorerkrankung kann es zur Bildung von Anti-Hu-Autoantikörpern kommen, die nach Passage der Blut-Hirn-Schranke zu paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen wie einer Enzephalomyelitis oder einer sensiblen Neuronopathie führen, dem sogenannten Anti-Hu-Syndrom [105]. Interessanterweise scheint sich die Immunantwort auch gegen Tumorzellen zu richten, da Tumoren bei diesen Patienten klein bleiben und die Mortalität eher auf die neuronale Degeneration als auf die Tumorerkrankung zurückzuführen ist [102]. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, Hu-Proteine könnten möglicherweise wichtige Funktionen in Tumorzellen ausüben.

Hu-Proteine sind sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert, wobei die Verteilung je nach Zellart variiert. Das Protein HuR ist vornehmlich nukleär lokalisiert, kann aber nach Aktivierung in das Zytoplasma translozieren [106]. Untersuchungen zur genauen intrazellulären Lokalisation der Hu-Proteine in Nervenzellen und Tumorzellen neuronalen Ursprungs haben ergeben, dass HuR im Zytoplasma in Form von messenger-Ribonukleoprotein (mRNP)-Komplexen an Polysome oder Zytoskelettanteile gebunden vorkommt [107].

1.5.2 Die mRNA-stabilisierende Funktion von Hu-Proteinen

Hu-Proteine binden spezifisch an mRNA, die über Adenylat- und Uridylat-reiche Elemente (ARE) an ihrer 3'-untranslatierten Region verfügt. Dazu zählen mRNAs von Protoonkogenen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie z.B. GM-CSF, IL-2, c-myc, c-fos, VEGF und GLUT1 [108-110]. Im allgemeinen implizieren AU-reiche Sequenzen einen schnellen Abbau der mRNA, ein Mechanismus, der eine rasche Anpassung an veränderte zelluläre Umweltbedingungen ermöglicht. Durch die Bindung von HuR wird jedoch eine Stabilisierung bewirkt, die zu einer verlängerten Halbwertszeit der mRNA führt und eine häufigere Translation der mRNA und damit eine erhöhte Produktion des kodierten Proteins zur Folge hat. Diese posttranskriptionale Regulation der Genexpression durch Veränderung der RNA-Stabilität wird als wichtiger Mechanismus bei Zellwachstum und -differenzierung gesehen [112].

Alle vier Hu-Proteine verfügen über drei RNA-Erkennungsmotive, RRM (RNA recognition motifs), die essentiell für die RNA-Bindung und -Stabilisierung sind. Die beiden ersten RRM binden die ARE, das dritte RRM das Poly(A)-Ende der mRNA, einen für die mRNA-Stabilität ebenfalls wichtigen Abschnitt [113]. Die Eigenschaft eines Shuttle-Proteins hat zu der Hypothese geführt, dass die Bindung von HuR an mRNAs im Nukleus stattfindet und der Komplex anschließend ins Zytoplasma transloziert wird. Diese Annahme wird u.a. durch Experimente gestützt, die die Fähigkeit von HuR nachwiesen, das Poly(A)-Ende einer mRNA sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma zu binden [114]. Eine wesentliche Bedeutung für den Shuttle-Mechanismus hat dabei eine 33 Aminosäuren lange Sequenz, HNS (HuR nucleocytoplasmatic shuttling), die zwischen dem zweiten und dritten RRM lokalisiert ist [115]. Sie beinhaltet sowohl nukleäre Import- als auch Export-Elemente. Der korrespondierende Rezeptor ist allerdings noch nicht bekannt.

Bislang wurden zwei Rezeptoren identifiziert, die bei dem nukleozytoplasmatischen Transport von mRNAs eine Rolle spielen: Der derzeit am besten charakterisierte Export-Rezeptor ist CRM 1 (chromosome maintenance region 1), der Proteine an Leucin-reichen nukleären Export-Signalen (NES) erkennt [116]. Des Weiteren konnte die Interaktion der HNS-Domäne von HuR mit dem Export-Rezeptor Transportin 2 (Trn 2) nachgewiesen werden [117].

1.6 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung molekularer Prognosemarker im Prostatakarzinom, um eine bessere Abschätzung der individuellen Wahrscheinlichkeit für ein PSA-Rezidiv sowie eine patientenorientierte Therapieplanung zu ermöglichen.

Epidemiologische Studien und zellbiologische Daten deuten auf eine Beteiligung entzündungsassoziierter Proteine wie der Cyclooxygenase-2 an der Entstehung und Progression von Tumoren hin.

Davon ausgehend ist der Kern dieser Arbeit die Untersuchung der Expression und prognostischen Relevanz der COX-2 und des COX-2-regulierenden Proteins HuR im Prostatakarzinom mittels Immunhistochemie. Zu diesem Zweck wurde ein Patientenkollektiv von insgesamt 104 Patienten mit Prostatakarzinomen zusammengestellt. Folgende Fragen sollten in der vorliegenden Studie beantwortet werden:

1. Wie wird die COX-2 in nicht-malignem Prostatagewebe und im Prostatakarzinom exprimiert? Wie verhält sich die COX-2-Expression in atrophischem Prostatagewebe und in der Prostatichen Intraepithelialen Neoplasie (PIN)? Zeigen sich dabei signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gewebetypen?
2. Wie ist die nukleäre und zytoplasmatische Expression des Proteins HuR im Normalgewebe und im Prostatakarzinom? Ist bei dem Vergleich der Gewebetypen eine signifikante Zu- oder Abnahme der HuR-Expression zu beobachten?
3. Besteht eine signifikante Korrelation zwischen der COX-2- oder der HuR-Expression mit ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern? Korrelieren die COX-2- und die nukleäre bzw. zytoplasmatische HuR-Expression miteinander?
4. Zeigt sich in der univariaten Überlebensanalyse eine signifikante prognostische Relevanz ausgewählter klinisch-pathologischer Parameter? Ergibt sich eine signifikante prognostische Relevanz der COX-2- oder der zytoplasmatischen bzw. nukleären HuR-Expression? Erweisen sich prognostisch relevante Parameter in der multivariaten Überlebensanalyse als unabhängige Prognosefaktoren?
5. Wie wird die COX-2 in ausgewählten Prostatakarzinom-Zelllinien exprimiert und lässt sich eine Expression durch Gabe von IL-1 β und TPA induzieren?