

Aus dem Institut für Pathologie

der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression der Cyclooxygenase-2 und  
des ELAV-ähnlichen Proteins HuR im  
Prostatakarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der

Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Thoma aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. C. Denkert

2. Prof. Dr. K. Jung

3. Priv.-Doz. Dr. C. Pilarsky

Datum der Promotion: 12.11.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Prostatakarzinom- Epidemiologie, Klinik und Therapie</b>	<b>8</b>
1.1.1	Epidemiologie	8
1.1.2	Risikofaktoren	9
1.1.3	Klinik, Diagnose und Therapie	10
1.1.4	Pathologie des Prostatakarzinoms- Tumortypen, Grading und Staging	11
1.1.5	Etablierte und neuere Prognosefaktoren	12
<b>1.2</b>	<b>Parallelen zwischen Entzündungsreaktionen und Tumorgewebe</b>	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>Die Cyclooxygenasen und ihre physiologische Rolle im Arachidonsäurestoffwechsel</b>	<b>16</b>
1.3.1	Entdeckung der Cyclooxygenasen	16
1.3.2	Die Cyclooxygenase als Schlüsselenzym des Arachidonsäurestoffwechsels	16
1.3.3	Unterschiede zwischen der COX-1 und COX-2	18
1.3.4	Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID)- Unterschiede zwischen nicht-selektiven und COX-2-selektiven Inhibitoren	20
<b>1.4</b>	<b>Tumorbiologische Bedeutung der COX-2</b>	<b>22</b>
1.4.1	Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der COX-2 und der Entstehung von Tumoren	22
1.4.2	Mechanismen der COX-2 in der Tumorentstehung	23
1.4.3	Tumorprotektive Wirkung von NSAID	24
1.4.4	Regulation der COX-Expression	25
<b>1.5</b>	<b>Das humane ELAV-ähnliche Protein HuR</b>	<b>27</b>
1.5.1	Hu-Proteine- Entdeckung, Expression und intrazelluläre Lokalisation	27
1.5.2	Die mRNA-stabilisierende Funktion von Hu-Proteinen	28
<b>1.6</b>	<b>Zielstellung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
<b>2.1</b>	<b>Patientenkollektiv</b>	<b>30</b>

<b>2.2</b>	<b>Material</b>	<b>32</b>
2.2.1	Zelllinien	32
2.2.2	Substanzen	32
2.2.3	Lösungen	34
2.2.4	Kulturmedien	38
2.2.5	Geräte	38
2.2.6	Verbrauchsmaterial	39
<b>2.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>40</b>
2.3.1	Immunhistochemie	40
2.3.2	Histopathologische Begutachtung	40
2.3.2.1.	<i>Immunhistochemische Färbung</i>	40
2.3.2.2.	<i>Quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbung</i>	41
2.3.2.3.	<i>Statistische Auswertung</i>	42
2.3.3	Western Blot	43
2.3.3.1.	<i>Zellkultur</i>	43
2.3.3.2.	<i>Stimulation</i>	43
2.3.3.3.	<i>Proteinisolierung und -konzentrationsbestimmung</i>	43
2.3.3.4.	<i>Elektrophorese und Western Blot</i>	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>COX-2-Expression in Normalgewebe, atrophischen Drüsen, PIN und Prostatakarzinom</b>	<b>45</b>
3.1.1	Vorwiegend negative Expression der COX-2 in Normalgewebe und atrophischen Prostatadrüsen	45
3.1.2	Erhöhte Expression der COX-2 in Tumorgewebe und Prostatistischer Intraepithelialer Neoplasie	45
<b>3.2</b>	<b>Zytoplasmatische und nukleäre HuR-Expression in Normalgewebe und Prostatakarzinom</b>	<b>50</b>
3.2.1	Prädominant nukleäre HuR-Expression im Normalgewebe	50
3.2.2	Signifikante Zunahme der zytoplasmatischen HuR-Expression im Tumorgewebe	50
<b>3.3</b>	<b>Korrelation der immunhistologischen Marker untereinander bzw. mit klinisch-pathologischen Parametern</b>	<b>53</b>

3.3.1	Keine Korrelation zwischen der COX-2- bzw. HuR-Expression und ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern	53
3.3.2	Signifikante Korrelation zwischen COX-2- und zytoplasmatischer HuR-Expression	57
<b>3.4</b>	<b>Überlebensanalysen</b>	<b>58</b>
3.4.1	Univariate Überlebensanalyse (Kaplan-Meier)	58
3.4.1.1.	<i>Tumorgröße ist ein signifikanter prognostischer Parameter</i>	58
3.4.1.2.	<i>Keine prognostische Relevanz der COX-2-Expression</i>	60
3.4.1.3.	<i>Abnahme der nukleären HuR-Expression als Indikator für ein früheres PSA-Rezidiv</i>	60
3.4.1.4.	<i>Nukleäre HuR-Expression und Tumorgröße sind unabhängige prognostische Parameter im untersuchten Studienkollektiv</i>	63
<b>3.5</b>	<b>Untersuchung der COX-2 im Zellkulturmodell</b>	<b>64</b>
3.5.1	Expression der COX-2 in Prostatakarzinom-Zelllinien	64
3.5.2	Induktion der COX-2-Expression durch IL-1 $\beta$ und TPA	64
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression der COX-2 im Prostatakarzinom</b>	<b>66</b>
4.1.1	Expression und Prognoserelevanz der COX-2- Vergleich mit anderen immunhistochemischen Studien	67
4.1.2	Antitumorale Effekte von NSAID auf das Prostatakarzinom im Zellkultur- und Tiermodell	72
<b>4.2</b>	<b>Expression von HuR in malignen Tumoren</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>COX-2-Regulation durch HuR</b>	<b>76</b>
4.3.1	Wegweisende Ergebnisse aus Zellkultur- und Tiermodellen	76
4.3.2	HuR-regulierende Mechanismen	76
<b>4.4</b>	<b>NSAID in der Prävention und Therapie des Prostatakarzinoms-therapeutischer Ausblick</b>	<b>78</b>
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>

## **Widmung**

Gewidmet meinen Eltern.

## Abkürzungsverzeichnis

AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Kinase
APRIL	Acidic protein rich in leucin
ARE	Adenylat- und Uridylat-reiche Elemente (AU-rich elements)
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Ca	Karzinom
CI	Konfidenzintervall
COX	Cyclooxygenase
CRM	Chromosome maintenance region
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor)
ELAV	Embryonic-lethal abnormal vision
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis coli
HNS	HuR nucleocytoplasmatic shuttling
IL	Interleukin
IRS	Immunreaktiver Score
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Normales Prostatagewebe
NSAID	Nicht-steroidale Antirheumatika (Non-steroidal anti-inflammatory drugs)
OR	Odds Ratio
PC	Prostatakarzinom
PG	Prostaglandin
PIA	Proliferative Inflammatorische Atrophie
PIN	Prostatische Intraepitheliale Neoplasie
POX	Peroxidase
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RR	Relatives Risiko
RRM	RNA-Erkennungsmotiv (RNA recognition motif)
SE	Standardabweichung
TNF	Tumornekrosefaktor
TU	Tumor
VEGF	Vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor)

## **Zusammenfassung**

Das Prostatakarzinom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen des Mannes. Zusätzlich zu den konventionellen Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms könnte die Bestimmung molekularer Marker im Tumorgewebe eine bessere Abschätzung der Prognose und eine individuellere Therapieplanung ermöglichen. Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) spielt neben ihrer physiologischen Funktion im Arachidonsäurestoffwechsel eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von malignen Tumoren. Passend dazu haben COX-Inhibitoren (NSAID) in mehreren Studien tumorprotektive Effekte gezeigt. Das humane ELAV-ähnliche Protein HuR transloziert gebundene mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma und ist so an der Stabilisierung verschiedener Wachstums-, Angiogenese- und Entzündungs-regulierender Faktoren beteiligt. Funktionale Experimente im Zellkulturmodell zeigen, dass die COX-2-mRNA ebenfalls von HuR stabilisiert wird.

Ziel dieser Studie ist es, die Expression der COX-2 sowie die intrazelluläre Verteilung von HuR im Prostatakarzinom mittels Immunhistochemie zu bestimmen und ihren prognostischen Einfluss auf das PSA-rezidivfreie Überleben zu untersuchen.

An einem Kollektiv von 104 Patienten mit Prostatakarzinomen zeigte sich eine Zunahme der COX-2-Expression im Tumorgewebe und in der Prostatistischen Intraepithelialen Neoplasie (PIN) verglichen mit normalem und atrophischem Prostatagewebe. Außerdem konnte eine Verschiebung von einer prädominant nukleären HuR-Expression im Normalgewebe zu einer vermehrten zytoplasmatischen HuR-Expression im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die COX-2-Expression korrelierte signifikant mit der zytoplasmatischen HuR-Expression. In der univariaten Überlebensanalyse stellten sich die Abnahme der nukleären HuR-Expression sowie die Tumorgroße als Prädiktoren für ein früheres PSA-Rezidiv heraus. Beide Parameter erreichten in einer explorativen multivariaten Analyse signifikante unabhängige prognostische Relevanz.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Deregulation der intrazellulären HuR-Verteilung im Prostatakarzinom sowohl mit einer veränderten Expression der COX-2 als auch mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Die vorliegende Arbeit bietet damit eine Grundlage für weitere Studien bezüglich einer zusätzlichen Bestimmung der COX-2- und HuR-Expression als Teil der Prostatakarzinom-Diagnostik. Die Resultate deuten

zudem auf eine mögliche Rolle der beiden Proteine als interessante Zielstrukturen einer zukünftigen molekularen Therapie des Prostatakarzinoms hin.

Schlagwörter: COX-2, HuR, Prostatakarzinom, Prognose

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Carsten Denkert danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine Bereitschaft, mir bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung der Arbeit jederzeit -auch über Landesgrenzen hinweg -hilfreich zur Seite zu stehen.

Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Glen Kristiansen für die Bereitstellung des Patientenkollektivs sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Mein Dank gilt außerdem den Mitgliedern der Arbeitsgruppe: Silvia Niesporek und Aurelia Noske für die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit und ihre vielen hilfreichen Anmerkungen, Wilko Weichert, der mir in meiner anderthalbjährigen Zeit als Hiwi ein perfekter Arbeitgeber war, und Berit Müller für ihre zahlreichen praktischen Tips und Hinweise.

Bei Ines Koch und Lisa Glanz möchte ich mich für die nette Atmosphäre im Labor und ihre geduldige Hilfe bei allen technischen Fragen bedanken.

Der Berliner Krebsgesellschaft e.V. sei gedankt für die großzügige Unterstützung des Projekts.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung während des Studiums danken.

Ganz besonders danke ich Sebastian, der auch in schwierigen Zeiten immer für mich da war.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Eidstattliche Erklärung**

Ich, Andrea Thoma, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema "Expression der Cyclooxygenase-2 und des humanen ELAV-ähnlichen Proteins HuR im Prostatakarzinom" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 05.04.07

Andrea Thoma