

analog zum %fPSA zwischen den Tumorstadien pT2 und pT3 [124]. Obwohl in einer aktuellen Untersuchung das hK2 sogar als Indikator eines biochemischen PSA-Rezidivs empfohlen wurde [131], sehe ich keinen Anlass, hK2 zur Differenzierung der Tumorstadien bzw. der histologischen Differenzierungsgrade einzusetzen.

Frühere Untersuchungen zur Expression des KLK2-Gens postulierten eine Überexprimierung im PCa und auch in Metastasen des PCa im Vergleich zum BPH- oder normalen Prostatagewebe [132, 133]. Damit wurden die anfänglich ausschließlich positiv bewerteten hK2-Studien im Serum begründet. Gemeinsam mit dem kanadischen Kooperationspartner haben wir hingegen eine Herunterregulierung im PCa-Gewebe im Vergleich zum normalen Prostatagewebe nachgewiesen [122]. Das PSA war davon stärker betroffen als das hK2 [122]. Wir konnten damit beweisen, dass unterschiedliche Konzentrationen des hK2-Proteins im Gewebe offenbar nicht die Begründung für die veränderten hK2-Konzentration im Serum sind. Die Regulierungsmechanismen vom Übergang der im Prostatagewebe nachgewiesenen Kallikreine in das Serum bleiben damit weiterhin unklar.

## **5. Neue Tumormarker des PCa im Gewebe**

Im folgenden Kapitel wird die Evaluierung weiterer Kallikreine und eines weiteren Gens im PCa-Gewebe als erster Schritt in der Biomarker-Evaluierung für ein Organ beschrieben [134]. Dies beinhaltet die Beurteilung der Expressionshöhen zwischen Karzinom- und Nichtkarzinomgewebe.

### **5.1 Die Kallikreine 14 und 15**

Wie im Abschnitt 3.3.2.2 bereits kurz erläutert, gehören der Gruppe der Kallikreine mittlerweile 15 Gene und die entsprechenden Proteine an. Im Jahr 2001 wurden zwei neue Mitglieder identifiziert und charakterisiert [135, 136]. Die beiden Kallikrein-Gene KLK14 und KLK15 stellen dabei in der parallelen Betrachtung eine vielversprechende Kombination bezüglich der Expression im Prostatagewebe dar [135, 136]. So zeigt das KLK14 in 80% der Fälle eine starke Herunterregulierung im malignen im Vergleich zum normalen Prostatagewebe des selben Patienten [135].

An insgesamt 58 Gewebeproben (jeweils gepaarte maligne und benigne Proben) von 29 PCa-Patienten wurde ein Vergleich der Gen-Expression des KLK15 vorgenommen [136]. Im Gegensatz zum PSA, KLK2 und zum KLK14 wurde keine generelle Expressionsminderung, sondern in fast der Hälfte der Patienten (13 von 29) eine höhere Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum nicht malignen Gewebe nachgewiesen [136]. Diese ersten Untersuchungen zum KLK14 und KLK15 erfolgten nur qualitativ und nicht quantitativ.

Die Nutzung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time PCR) für Gen-Expressions-Studien war während meines Forschungsaufenthaltes im Labor von Prof. Diamandis (Toronto) ein Schwerpunkt meiner Tätigkeit. Mit der Einführung des LightCyclers im Jahr 1997 konnte erstmals die fluoreszenzgestützte photometrische Echtzeit-Messung von PCR-

Amplifikationsprodukten durchgeführt werden [137]. In den letzten Jahren stieg die Anzahl der Veröffentlichungen quantitativer RT-PCR-Daten unter Nutzung des LightCyclers sprunghaft an, welches den mittlerweile breiten Einsatz dieser Technik demonstriert. Die quantitative Real-time-PCR-Technik hat sich trotz anfänglicher analytischer Probleme in sehr kurzer Zeit als Standardmethode für Gen-Expressions-Studien durchgesetzt.

An gepaarten Proben von 90 PCa-Patienten (jeweils maligne und benigne Proben) untersuchte ich mit dem LightCycler-System (Fa. Roche) mögliche Assoziationen der KLK15-Expression mit den Parametern Tumorstadium und histologischer Differenzierungsgrad nach WHO bzw. Gleason (**Artikel Nr. E12**). Dabei konnte ich die frühere bereits mittels qualitativer PCR gefundene Überexpression des KLK15-Gens in 76 der 90 gepaarten Proben (84,4%) bestätigen [138]. Der Expressionsquotient aus der jeweiligen malignen und benignen Probe war zwar höher bei PCa-Patienten mit einem pT3/4-Stadium im Vergleich zu pT2-Tumoren, eine Signifikanz ergab sich jedoch nicht ( $p=0,1$ ). Die KLK15-Expression war ebenfalls nur in der Tendenz höher in Grad 3-Tumoren als in Grad 2-Tumoren und in Tumoren mit einem Gleason Score  $\geq 7$  als mit Gleason Score  $< 7$  [138]. Weiterführende Studien der Arbeitsgruppe zeigten, dass auch Splice-Varianten der jeweiligen Kallikreine bei der weiteren Entwicklung und Bewertung von Tumormarkern des PCa eine Rolle spielen könnten [139-141].

Kürzlich konnte erstmals vom kanadischen Kooperationspartner ein erster Prototyp eines Immunoassays zur Detektion des hK15 vorgestellt werden [142]. Dabei stellt sich die Frage, ob hK15 als Produkt des zentromerischen Genom-Nachbarn des PSA ähnlich dem hK2 (KLK2 ist telomerischer Genom-Nachbar) eine bessere Differenzierung zwischen BPH und PCa ermöglichen könnte (Abbildung 4).

Die KLK14-Expression wurde ebenfalls quantitativ untersucht, wobei sich dort gegensätzlich zur ersten Analyse von Yousef et al. [135] parallel zum KLK15 ebenfalls eine Überexprimierung im malignen versus dem benignen Gewebe bei 74% aller Patienten darstellte [143]. KLK14 war signifikant stärker exprimiert in pT3/4- im Vergleich zu pT2-Tumoren ( $p=0,002$ ), in G3- als in G2-Tumoren ( $p=0,001$ ) sowie in Tumoren mit einem Gleason Score  $\geq 7$  als in solchen mit Gleason Score  $< 7$  PCa ( $p=0,027$ ) [143].

Die Analyse weiterer vielversprechender Gene im gepaarten Gewebe von PCa-Patienten unserer Klinik wird im folgenden Abschnitt aufgezeigt.

## 5.2 Hepsin und weitere Gewebemarker des PCa

Ausgehend von Resultaten mehrerer cDNA Mikroarray-Studien [144-147], die differentiell exprimierte Gene im malignen und benignen Prostatagewebe untersuchten und dabei in allen Fällen Hepsin als am stärksten hochreguliertes Gen im PCa-Gewebe entdeckten, führte ich eine eigene Studie mit diesem Gen durch (**Artikel Nr. E13**). Dabei habe ich die quantitativen RT-PCR erstmals für dieses Gen eingesetzt [148]. Hepsin spielt eine Rolle bei der Erhaltung der Zellstruktur der Leber und deren Wachstum [149] sowie bei der Gerinnung mittels Faktor VII Aktivierung [150].

In der eigenen Studie an gepaarten Gewebeproben von 90 PCa-Patienten wurde Hepsin in 90% der Fälle stärker im malignen als im benignen Gewebe exprimiert [148]. Die Überexprimierung war im Mittel um das 46fache erhöht [148]. Eine bis zu 10fach höhere Expression im malignen Gewebe war in 33 Patienten, eine 10 bis 100fache Expression war in 35 Patienten und eine sogar mehr als 100fache Expression war in 13 Patientenproben nachweisbar [148]. Hepsin wurde signifikant höher in G3-Tumoren im Vergleich zu G2- und G1-Tumoren ( $p=0,031$ ) exprimiert, während die Expressionsraten von pT3/4- und pT2-Tumoren ( $p=0,13$ ) sich nicht signifikant voneinander unterschieden [148]. Damit bestätigten die quantitativen RT-PCR-Messungen die Ergebnisse aller cDNA-Mikroarray-Studien, so dass Hepsin mit seiner starken Überexprimierung im PCa-Gewebe als möglicher Gewebemarker und auch Serum-Biomarker für das PCa angesehen werden kann. Besonders die bevorzugte Erkennung der aggressiveren Gleason Grad 4- und 5-Tumoren (34fache Überexprimierung im Vergleich zu BPH-Gewebe) ist hoffnungsvoll [147]. Ein Serumtest muss jedoch erst noch entwickelt werden.

Von den bereits beschriebenen Serum-Tumormarkern hK11 und MIC-1 zeigten vorangehende Studien unter Nutzung der quantitativen RT-PCR-Messungen ebenfalls eine Überexprimierung im PCa-Gewebe [151, 152]. Weitere neue Gewebemarker wie die Polo-like-Kinase 1, ALCAM/CD166, CD24 oder CD59 wiesen ebenfalls Expressionsunterschiede im malignen im Vergleich zu benignem Prostatagewebe mittels Immunhistochemie, quantitativer RT-PCR oder GenChip-Analyse auf [153-157]. Dabei kann zukünftig z.B. auch eine Erweiterung eines ANN mit immunhistochemischen Daten oder molekular diagnostischen quantitativen Parametern u.a. für die Fragestellung eines präoperativen Stagings bei der Biopsieanalyse oder zur postoperativen Prognose ein weiteres perspektivisch wichtiges Aufgabenfeld darstellen. Ob jedoch diese Gewebemarker in Zukunft auch als Serummarker zur Differenzierung zwischen BPH und PCa oder zur Detektion von aggressiven PCa-Formen beitragen werden, ist derzeit noch offen.