

5. Diskussion

5.1 Methodische Aspekte der Expressionsuntersuchung von Prostatageweben

Der Einsatz von Array-Technologien zur Untersuchung von Tausenden von Genen in einem parallelen Ansatz setzt die vorherige Identifikation dieser Gene oder zumindest von Teilsequenzen voraus. Durch die internationalen Arbeiten in „The Human Genome Project“ wurde die Identifikation vieler bis dahin unbekannter Gene durch die Sequenzierung von genomischer DNA und die daran anschließende bioinformatische Analyse ermöglicht (Lander et al., 2001).

Die Kenntnis von Tausenden von Genen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung von Zellen und in ihren Interaktionen mit der Umgebung in einem komplexen Umfeld eine Rolle spielen, führte über die einfache Analyse einzelner Gene zu einer Untersuchung des Gesamtkontextes der Genregulation. Nach ersten Arbeiten von Golub et al. (1999) zur Klassifizierung von Lymphomen hat es vor allem in den letzten beiden Jahren eine Vielzahl von Publikationen zur Genexpression in Tumorgeweben im Vergleich zu Normal- und/oder weiteren Tumorgeweben gegeben. Der Schwerpunkt der Untersuchung von Arrayexperimenten richtet sich auf onkologische Fragestellungen in den verschiedensten Tumorformen mit dem Vergleich von unterschiedlichen Tumorarten eines Gewebes untereinander, mit Normalgeweben, Metastasen oder auch Zelllinien. So ist aber auch für andere Indikationsgebiete wie z. B. der Suche nach Genen in der Lungenfibrose (Katsuma et al., 2001), der Follikelbildung (Liu et al., 2001), nach Aktivierung von Signaltransduktionswegen (Fambrough et al., 1999) oder für die Untersuchung des Methylierungsmusters von CpG-Inseln (Yan et al., 2001) und genomischen Aberrationen (Pollack et al., 1999) die Chiptechnologie eingesetzt worden. Der überwiegende Anteil der Untersuchungen nutzt Gewebestücke und entweder cDNA- oder Affymetrix-Oligochips für die Hybridisierungen.

Trotz der vielfach onkologischen Orientierung sind die meisten cDNA und alle allgemein erhältlichen Affymetrix-Oligochips in ihrem Design nicht auf die onkologische Fragestellung ausgerichtet und tragen eine beliebige Genauswahl. Der in dieser Arbeit benutzte Oligochip der Firma Affymetrix wurde nach Sequenzangaben von metaGen Pharmaceuticals GmbH

hergestellt und trägt Sequenzen, die in einer bioinformatischen Analyse als tumorrelevant identifiziert wurden. Die spezifische Sequenzauswahl ermöglicht einen Vergleich von Chipexperimenten mit öffentlichen Daten nur auf der Basis einzelner Gene. Trotz einer vielfach recht kritischen Bewertung von *in silico* Methoden und einer anschließend notwendigen weiterführenden Untersuchung von Kandidatengenomen liefert die vorselektionierte Auswahl von Genen eine höhere Aussagekraft, als eine beliebige Auswahl und bietet damit einen deutlichen Vorteil gegenüber konkurrierenden Expressionsstudien.

Die Untersuchung von Expressionsprofilen dieser Gene durch die Nutzung verschiedener Systeme von cDNA- oder Oligoarrays hat große Datenmengen erzeugt, die in einer geeigneten Weise zu bewerten sind. An Hand verschiedener Parameter wie z. B. der zeitlichen Abfolge oder der Höhe der detektierten Expression in bestimmten Versuchen können einzelne Gene aus der Gesamtzahl der untersuchten Gene herausgegriffen werden. Für die Identifikation eines molekularen Profil eines Tumors hat sich die Auswertung von Arrayexperimenten durch eine anschließende Clusteranalyse (Gruppenanalyse) als „Königsweg“ etabliert, wie eine beeindruckende Anzahl von Publikationen belegt. In der Clusteranalyse werden für eine umfassende Analyse die Gene an Hand ihrer Expressionsdaten zu Gruppen zusammengefasst. Die dazu zur Verfügung stehenden mathematischen Modelle zur Ähnlichkeitsberechnung werden zur Organisation der Daten, also einer Neusortierung, und nicht zur Variation der Primärdaten eingesetzt (Eisen et al., 1998). Das Ziel der Gruppierung (Clusteranalyse) ist ein möglichst homogenes Zusammenfassen der Gene oder Gewebeproben zu Gruppen, die möglichst gut voneinander separierbar sein sollten. Methodisch gesehen misst die Clusteranalyse Abstände zwischen Merkmalsträgern. Wertepaare, die in geringem Abstand vorkommen, werden in gemeinsame Gruppen aufgenommen. Zur Visualisierung werden die numerischen Expressionswerte in eine Farbskala übersetzt, die eine optische Mustererkennung erleichtert. Der Einsatz von hierarchischen Gruppierungsverfahren, die auch in Sequenz- und Phylogenieuntersuchungen eingesetzt werden, liefert für die untersuchten Gene und Experimente einen Ähnlichkeitsbaum, dessen Astlängen ein Maß für die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der Gene oder Experimente darstellt. Die ursprüngliche Sortierung der Gene wird geändert, so dass Gruppen von Genen mit ähnlichen Expressionsprofilen benachbart stehen.

Stehen bei Vergleichen von Versuchen keine korrespondierenden Probenpaare zur Verfügung, die direkt miteinander verglichen werden können, wird der Median des entsprechenden Probensatzes von allen Versuchen gebildet und die Fluoreszenzwerte aller

Versuche werden auf diesen Wert zentriert (Welsh et al., 2001; Bhattacharjee et al., 2001). Ein Einsatz dieser Methode hätte die Verwendung von Probenpaaren eines Patienten nicht vorausgesetzt, hat jedoch auch den großen Nachteil, dass das Expressionsprofil beispielsweise eines Tumorgewebes nicht mit dem dazugehörigen Normalgewebe, sondern mit dem Median aller untersuchten Gewebe verglichen wird. So wäre z. B. die Heraufregulation eines Gens im Tumorgewebe gegenüber dem Median schon signifikant, unabhängig von der Expression des Gens in dem dazugehörigen Normalgewebe.

Neben der Auswahl des Chipsystems und der Auswertung der Daten ist natürlich des Weiteren noch das verwendete Material von essentieller Bedeutung. Die überwiegende Anzahl von Studien wurde jedoch nicht mit mikrodissenziertem Gewebe durchgeführt, sondern mit Gesamt-Gewebefragmenten. Auf Grund der histologischen Heterogenität vieler Gewebe ist die Trennung der Normal- und Tumorepithelien von weiteren Strukturen des betrachteten Organs nötig. Sowohl in den epithelialen als auch in den stromalen Bereichen von Organen sind eine Vielzahl von Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelien oder verschiedene infiltrierende Leukozyten, anwesend (Sirivatanauksorn et al., 1999). Im Gegensatz zur Laser-gestützten Mikrodissektion einzelner Zellen (Emmert-Buck et al., 1996) ist die Untersuchung direkt benachbarter Zellen mit der manuellen Mikrodissektion unter Einsatz einer Nadel nicht möglich. Für die Mikrodissektion der Prostatagewebe, die die Grundlage dieser Arbeit bilden, stand kein Gerät zur Laser-gestützten Mikrodissektion zur Verfügung, so dass die in der Pathologie des Universitätskrankenhauses Charité gut etablierte Methode der manuellen Mikrodissektion eingesetzt wurde.

Dem Vorteil einer reinen Tumor- und Normalepithelfraktion durch Einsatz der Mikrodissektion steht die äußerst geringe Ausbeute an Poly-A⁺-RNA aus den herausgeschnittenen Zellen gegenüber. Durch den Einsatz von linearen Amplifikationsprotokollen (Luo et al., 1999) ist es möglich, in aufeinander folgenden Runden die ursprüngliche Poly-A⁺-RNA zu amplifizieren und für Chiphybridisierungen einzusetzen (Luzzi et al., 2001; Ohyama et al., 2000). Durch die wiederholte Amplifikation der RNA wird der ursprüngliche Zustand der RNA-Population nicht komplett aufrechterhalten, sondern es wird eine teilweise Umgewichtung von Sequenzen herbeigeführt (Pilarsky et al., 1999). Diese Veränderung wird bei einem Vergleich von unterschiedlich häufig amplifizierten Proben besonders deutlich, ist aber bei einem Vergleich identisch bearbeiteter Proben zu vernachlässigen. Ein Vergleich von zwei unterschiedlichen RNA-Proben nach Amplifikation von verschiedenen Ausgangsmengen zeigte jeweils die erhaltene individuelle Heterogenität

der beiden Proben. Daraus lässt sich schließen, dass die Variation der RNA-Anfangspopulation nicht auf Unterschiede in der Variation der Transkriptzahlen, sondern auf Variationen auf Grund sequenzspezifischer Gegebenheiten zurückzuführen ist (Baugh et al., 2001).

Trotz des eigentlichen Schwerpunktes dieser Arbeit auf Gene, die im Prostatatumor herunterreguliert sind, wurde für die Gruppierung der Patientenproben zusätzlich ein Satz von Genen mit einer Heraufregulation im Tumor herangezogen. Die Algorithmen zur Beurteilung von Ähnlichkeiten der verschiedenen Probensätze in den einzelnen Versuchen basieren auf der Berechnung von Abständen zwischen den Expressionswerten. Die Unterschiede zwischen den Normal- und Tumorpatienten können umso deutlicher heraus gestellt werden, je konträrer die zur Berechnung verwendeten Daten sind. Eine separate Berechnung der Gruppierung der Versuche mit den Sequenzen, die im Tumor herunter- oder heraufreguliert sind, führte zu keiner aussagekräftigen Gruppenaufteilung.

5.2 Clusteranalyse der Expressionsprofile von Prostatanormal- und tumorgewebe

Aus der Gesamtheit der 6.117 Probensätze des Chips wurden für die Clusteranalyse 124 Sequenzen mit einer signifikanten Herunterregulation und 106 Sequenzen mit einer Heraufregulation in Prostatatumoren ausgewählt. Nach Normierung der Expressionswerte wurde der Satz von 230 Sequenzen für eine Berechnung durch die Software GeneMath 1.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) verwendet. Das vorherige Zentrieren der Expressionswerte auf den Median mit anschließender Gruppierung der logarithmierten Werte, wie es häufig im Umgang mit Chipdaten gemacht wird (Eisen et al., 1998), war für die getroffene Auswahl nicht von Vorteil, da die Patientenproben auf diese Weise in drei heterogene Gruppen aufgeteilt wurden. Auf Grund der Schwierigkeit einer objektiven Qualitätsbeurteilung der erhaltenen Gruppen wurde die benutzte Vorgehensweise mit anderen publizierten Algorithmen verglichen und die Fähigkeit der Aufteilung der 108 Patientenproben und Zelllinien in zwei distinkte Gruppen bewertet, um ein molekulares Profil für Normal- und Tumorgewebe zu charakterisieren.

Mit dem verwendeten Algorithmus wurden die Patientenproben mit einer Sensitivität der Auswahl von 94% und einer Spezifität von 72% der Tumor- bzw. Normalgruppe zugeordnet.

Die hohe Sensitivität zeigt eine geringe Rate von falsch negativen Proben von nur 6%, die, nach ihrem Expressionsprofil zu urteilen, nicht als Tumore erkannt wurden. Jedoch beträgt die Rate der als falsch positiv beurteilten Normalgewebe fast 28%. Wird noch zusätzlich das direkt vergleichbare Expressionsprofil von 2 Patienten und die starke Ähnlichkeit der Profile von weiteren 3 Patienten berücksichtigt, scheint ein möglicher Grund die nicht ausreichende Beurteilung von histologischen Merkmalen für eine Klassifizierung nach Normal- oder Tumorgewebe zu sein. Auch ist es nachvollziehbar, dass ein histologisch noch normal erscheinendes Gewebe aus einer Prostata mit zum Teil bösartigen Tumoren, in seiner Genexpression durch den Tumor in direkter Nachbarschaft beeinflusst wird. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Expression des Androgenrezeptors im umgebenden Stroma einen Einfluss auf die klinische Prognose des Prostatatumors hat (Henshall et al., 2001). Ein direkter Vergleich der verschiedenen Normalgewebe verschiedener Patienten wird noch zusätzlich dadurch erschwert, dass die Normalgewebe aus verschiedenen Bereichen der Prostata stammen, wie z. B. der Außen- oder Innendrüse, und dass viele als normal klassifizierte Gewebe hyperplastisch waren. Von den 54 Normalgeweben ist für 13 Proben die Entnahme aus der Prostataußendrüse bekannt. 7 dieser 13 Normalgewebe der Außendrüse gehören zu der Gruppe von 15 Normalgeweben, die in den Tumorarm gruppiert wurden. Aus dieser Gruppe von Normalgeweben mit Außendrüsensprung bilden 5 Gewebe eine in sich geschlossene Gruppe und grenzen sich deutlich von den Prostatatumoren ab. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass etwa 80% der Prostatatumore (G. Kristiansen, Pathologie Charité, persönliche Kommunikation) aus der Außendrüse der Prostata entstehen, weist die Überrepräsentation von Normalgeweben diesen Ursprungs in dem „Tumorarm“ der Gruppierung auf eine deutliche Beeinflussung des histologisch normalen Gewebes durch den Tumor hin. Eine Einbeziehung der histologischen Merkmale der Tumore, wie z. B. Gleason Grad oder TNM-Klassifizierung, in die Clusteranalyse brachte keine eindeutigen Korrelationen mit der Gruppierung der Tumore hervor. Die zwar an festgesetzten Beurteilungskriterien sich orientierenden Bewertungsmaßstäbe für den Grad oder das Stadium eines Tumors lassen sich nicht genau quantifizieren und sind damit im gewissen Rahmen der Interpretation des beurteilenden Pathologen ausgesetzt. So haben Sorlie et al. (2001) die Gruppierungen auf Grund der molekularen Expressionsprofile von Brusttumore mit der Überlebenswahrscheinlichkeit in Zusammenhang gebracht und deutliche Unterschiede im Krankheitsverlauf festgestellt, trotz gleicher histologischer Befunde.

Die Gruppierung der tumorigenen Prostatazelllinien PC3, DU145 und LNCaP und der Primärzelllinie PrEC entspricht nicht den Erwartungen, da die LNCaP-Zelllinie als einzige in den Tumorarm eingruppiert wurde, während die drei anderen Zelllinien eine Untergruppe im „Normalarm“ bilden. Wurden hingegen die 108 Prostatapatientenproben und vier Zelllinien auf Grundlage aller 3057 Probensätze, die in mindestens 10 der 112 Experimente detektiert wurden, gruppiert, separierten sich die vier Zelllinien deutlich von den Normal- und Tumorproben in einen zusätzlichen Ast des Dendogramms. Die Trennung der Zelllinien von den Gewebeproben geht aber zu Ungunsten einer Trennung von Normal- und Tumorgewebe, da die beiden Äste deutlich heterogener sind. Die Sensitivität der Trennung der Proben auf die beiden Äste sinkt auf 77%, mit einer Spezifität von nur noch 67%. Die in dieser Arbeit für die Gruppierung getroffene Auswahl an Sequenzen wurde ohne Berücksichtigung der Expressionsprofile der Zelllinien vorgenommen, so dass viele, für das Expressionsprofil der Zelllinien charakteristische Sequenzen, ausgeschlossen wurden. Ein Vergleich der Zelllinien mit den Patientengewebe zeigte eine große Anzahl von unterschiedlich exprimierten Genen. So konnten 122 Sequenzen identifiziert werden, die mit zum Teil starker Expression nur in den Zelllinien und 497 Sequenzen, die in mehr als 10 Patientengewebe, jedoch in keiner Zelllinie exprimiert wurden. Diese Gruppen von Sequenzen bilden Charakteristika, die spezifisch für die Zelllinien oder Patientengewebe sind und eine Abweichung des Modellsystems Zelllinie von dem entsprechenden Gewebe bilden. Die verstärkte Expression von proliferativ wirkenden Genen in den tumorigenen Zelllinien scheint eher ein Charakteristikum für den proliferativen Status einer Zelllinie zu sein und geht vermutlich nicht auf die ursprüngliche Generierung der Zelllinie aus einer Prostatatumor-Metastase zurück. Die Analyse der Zelllinien im Vergleich zu den Patientengewebe zeigt auch mögliche Gefahren für die vielfach vorgenommenen Interpretationen für humane Tumore auf Grund des Verhaltens von Zelllinien (Ross and Perou, 2001). So würde z. B. ein Vergleich der Zelllinien mit Prostata-Normalgewebe vermutlich eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen liefern, die im Vergleich zu den Tumorgewebe keine Relevanz zeigen.

Dhanasekaran et al. (2001) haben in ihrer Untersuchung ebenfalls die Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP sowie lokalisierte und metastatische Prostatatumore, benigne prostatiche Hyperplasien und Normalgewebe von Prostatatumor-Patienten verglichen, jedoch ohne die Gewebe zu mikrodissizieren. Im Gegensatz zu den zuvor von uns dargestellten Gruppierungen der Zelllinien zu den Normal- bzw. Tumorgewebe gruppieren Dhanasekaran

et al. (2001) die Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP in den Arm mit den Prostatatumoren. Die 20 Prostatametastasen gruppieren recht gut zusammen, von den 14 lokalisierten Prostatatumoren werden jedoch drei in den Arm mit den benignen Geweben gruppiert. In diesem Arm sind sie zwar von den benignen Proben separiert, haben jedoch eine deutlich größere Nähe zu diesen als zu den übrigen malignen Proben. Innerhalb der Gruppe der Metastasen der Prostatatumore wird zum Teil eine Feingruppierung bezüglich der Ursprungsgewebe deutlich. So gruppieren sich z. B. zwei der drei Lymphknotenmetastasen und drei der fünf Weichgewebemetastasen direkt zusammen. Auch wenn Su et al. (2001) für 75% der untersuchten Metastasen ein zu ihren Primärtumoren ähnliches Expressionsprofil zeigen konnten, ist es doch fraglich, inwieweit das Wirtsgewebe oder das veränderte metastatische Expressionsprofil die Gruppierung der Metastasen beeinflusst hat.

Die etwa zur gleichen Zeit erschienene Publikation von Welsh et al. (2001) zur Genanalyse von Prostatatumoren beschäftigt sich ebenfalls nur mit Gewebeblöcken ohne den vorherigen Einsatz einer Mikrodissektion. In ihrer Clusteranalyse, einer Auswahl von 3530 Genen, lassen sich die 23 Tumor und 9 Normalgewebe gut trennen. Die Patientengewebe teilen sich eindeutig auf zwei separate Arme des Clusters und die untersuchten Zelllinien bilden eine zusätzliche entfernte Gruppe. Die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der Zelllinien PC3, DU145, LNCaP und PrEC entspricht in ihren relativen Gruppierungen zueinander genau der zuvor erwähnten Auswertung des Datensatz von 3057 Probensätzen. Die deutliche Trennung der Tumoren von den Normalgeweben im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beobachteten teilweisen Vermischung der beiden Gruppen hat ihre Ursache möglicherweise in den unterschiedlichen Patientenauswahlen. Die Untersuchung von Welsh et al. (2001) basiert auf den Expressionsprofilen von nur 23 Tumoren und 9 Normalgeweben, zu denen keine weiteren Informationen bezüglich ihres Anteils an hyperplastischem Gewebe oder dem Entnahmeort in der Prostata bekannt sind.

Vergleiche mit den Expressionsprofilen anderer Gewebe wie Lungen- oder Brustkarzinomen, bestätigten die teilweise Heterogenität einzelner Gewebe und schlechte Übereinstimmung mit histologischen Kriterien (persönliche Kommunikation mit T. Sorlie (Stanford University, Stanford) und J. Staunton (Whithead Institute, Cambridge)). So haben Sorlie et al. (2001) Tumore, die in der Clusteranalyse mit den Normalgeweben in eine deutlich separierte Gruppe fielen, als „Normal-Brust-ähnlich“ bezeichnet.

5.3 Auswahl von herunterregulierten Genen in Tumoren der Prostata

Die Ergebnisse der Expressionsstudien von 54 verschiedenen Prostatatumoren im Vergleich zu ihren Normalgeweben zeigten eine umfangreiche Veränderung der Genexpression. Eine Änderung der Expression der einzelnen Gene und Sequenzen für die jeweiligen Prostataprobe-Paare wurde durch Bildung des Quotienten der Expressionswerte von $F = \frac{Normal}{Tumor}$ bestimmt, sofern in beiden Proben die Sequenz als anwesend detektiert wurde.

Unter Berücksichtigung der Streuung der Expressionswerte bei wiederholten Chip-Hybridisierungen von Zelllinien um den Wert von 1 und auf Grund der relativ homogenen Expressionswerte von Haushaltsgenen wurde als Signifikanzschwelle für eine Herunter- oder Heraufregulation 2 bzw. 0,5 gesetzt. Die Analyse der insgesamt 6.117 verschiedenen Probenstücke beschränkte sich auf Gene, deren Expression in mindestens 10 Patienten im Tumor herunter und mehr als fünfmal so häufig wie in anderen Patienten heraufreguliert war. Trotz der Auswahl von 54 verschiedenen Patienten (s. Anhang), die alle einen histologisch klassifizierten Tumor hatten, war die Genexpression sehr heterogen und es gab kein Gen, das in mehr als 40 Tumoren herunter reguliert wurde und insgesamt auch nur 9 Gene mit einer Herunterregulation in mehr als 30 Tumoren.

Entsprechend dem Ziel dieser Arbeit der Identifikation von tumorassoziierten Genen, wurden für weiterführende Analysen nur Gene mit einer Herunterregulation in einem signifikanten Anteil von Prostatatumoren ausgewählt. Durch diese Auswahlkriterien reduzierte sich die Zahl der Probenstücke mit einer Herunterregulation auf 124 Sequenzen. Eine Betrachtung der chromosomalen Lokalisation der Sequenzen zeigte eine relativ gleichmäßige Verteilung über das gesamte Genom. So sind in der Auswahlliste z. B. Gene aus den häufig in Prostatatumoren verlorenen Regionen 8p, 10q, 16q oder 18q, aber auch aus den in Prostatatumoren amplifizierten Regionen 1q, 2p, 8q oder 18q (Nupponen and Visakorpi, 2000). Aus der Liste der Sequenzen wurden Gene für eine Detailanalyse ausgewählt, die zum einen entweder in einer häufig in Tumoren verlorenen Region lagen, oder aber zum anderen eine mögliche „Tumor-relevante“ Funktion hatten. Die Identifikation von Tumorsuppressorgenen auf Grund ihrer Lokalisation in häufig verlorenen chromosomalen Regionen hat sich in der Vergangenheit als erfolgreich herausgestellt. So konnten Baker et al. (1989) durch Suche nach Verlusten der Heterogenizität (Loss of Heterozygosity, LOH) von chromosomalen Markern in Darmtumoren auf Chromosom 17p das p53 Gen identifizieren und Mutationen im zweiten Allel nachweisen. Ein ähnliches Vorgehen führte auch im Fall

von „Deleted in Colorectal Cancer“ (DCC) zur Identifikation eines Tumorsuppressors, von dem ein Allel verloren ging und das andere mutiert ist (Vogelstein et al., 1988). Als Gene mit einer möglichen „Tumor-relevanten“ Funktion wurden keine bereits identifizierten potentielle Tumorsuppressorkandidaten für eine weitere Untersuchung herausgegriffen, für die eine Tumor-unterdrückende Funktion zum Teil auch in der Prostata bereits bekannt ist wie z. B. Clusterin (Bettuzzi et al., 2000), „Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A (p21,Cip1)“ (Kuczyk et al., 2001) oder „Growth Arrest-Specific 1 (GAS)“ (Del Sal et al., 1994). Der Hauptfokus dieser Arbeit richtete sich vielmehr auf Sequenzen, die eine Funktion in einem für die Onkogenese relevanten Signaltransduktionsweg haben. Der metg001A Affymetrix Genechip wurde nicht ausdrücklich zur Untersuchung von expressionsregulierten Signaltransduktionswegen konstruiert, trägt aber auf Grund der häufig tumorrelevanten Funktionen der Signalwege neben den einzelnen Schlüsselgenen zusätzliche Effektoren oder Aktivatoren.

Als Gene aus zwei essentiellen Signalwegen sind hier das WIF-1 und sFRP1 aus dem Wnt-Signalweg und das Chimerin1 aus dem Ras-Signalweg aufgefallen, auf die im folgenden noch näher eingegangen wird.

5.3.1 Mögliche tumorsupprimierende Rolle der Regulatoren WIF-1 und sFRP1 des Wnt-Signalweges

Der Wnt Signalweg, ein in der Entwicklungsbiologie grundlegender Signalweg, trägt seinen Namen von dem extrazellulären Liganden Wnt. Das ursprünglich in der Maus entdeckte und dort als Integrated-1 (Int-1) bezeichnete Gen ist das Ortholog zum wingless (wng) Gen der *Drosophila M.*, einem identifizierten Kontrollgen der Entwicklung, und wurde zu dem Namen Wnt fusioniert (Pennisi, 1998). Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in entwicklungsbiologischen Prozessen und der Onkogenese (Peifer and Polakis, 2000). Mitglieder des Signalweges wurden schon vielfach mit Tumoren in Verbindung gebracht wie z. B. das „Adenomatous Polyposis Coli“-Gen (APC), das in der Mehrheit von Darmtumoren mutiert ist und damit nicht mehr in der Lage, im Komplex mit der Glykogen-Synthetase-Kinase 3 β die Signalweiterleitung zu inhibieren und so zu einer permanenten Transkription wachstumsregulierender Gene führt (Fearnhead et al., 2001). Ein weiteres Beispiel ist das WNT2, das als Ligand des Signalweges in einer Anzahl von Tumoren, unter anderem Prostatatumoren, als häufig hochreguliert identifiziert werden konnte (Kato, 2001).

Die Wnt Familie umfasst bisher 19 bekannte Mitglieder, deren Proteine an eine Reihe von extrazellulären oder Zelloberflächen-Proteinen binden. Die Wnt-Proteine binden unter anderem an die extrazelluläre Cystein-reiche Domäne (Cystein Rich Domain, CRD) der Frizzled-Rezeptor-Proteine und initiieren damit die zuvor beschriebene Signalkaskade. Ausgehend von der Identifizierung des Wnt als ein Protein mit Proto-onkogenen Effekten (Nusse and Varmus, 1982) wurde für eine Reihe von Wnt-Genen eine Fähigkeit zur Förderung der neoplastischen Transformation festgestellt (Wodarz and Nusse, 1998). Trotz Identifikation einzelner Familienmitglieder in der neoplastischen Transformation konnte für andere bisher noch kein Effekt festgestellt werden. Auch die Familie der frizzled-Gene, Rezeptoren für die Wnt-Liganden, stellt sich heterogen dar mit bisher 11 bekannten Genen. Die Bindungsspezifitäten für einzelne Wnt-Liganden sind noch größtenteils unbekannt, Bindungsstudien konnten aber für eine Reihe von Ligand-Rezeptor-Interaktionen eine darauf folgende TCF/LEF1-abhängige Transkription zeigen. So zeigt sich z. B. der frizzled-Rezeptor FzE3 in Speiseröhren-Tumoren im Vergleich zu korrespondierenden Normalgeweben überexprimiert, diese Überexpression führt zu einer nukleären Translokation von β -Catenin (Tanaka et al., 1998). Auf Grund des hierarchischen Aufbaus des Signalwegs ist darüber hinaus eine weitere Regulation an verschiedenen Stellen der Kaskade möglich.

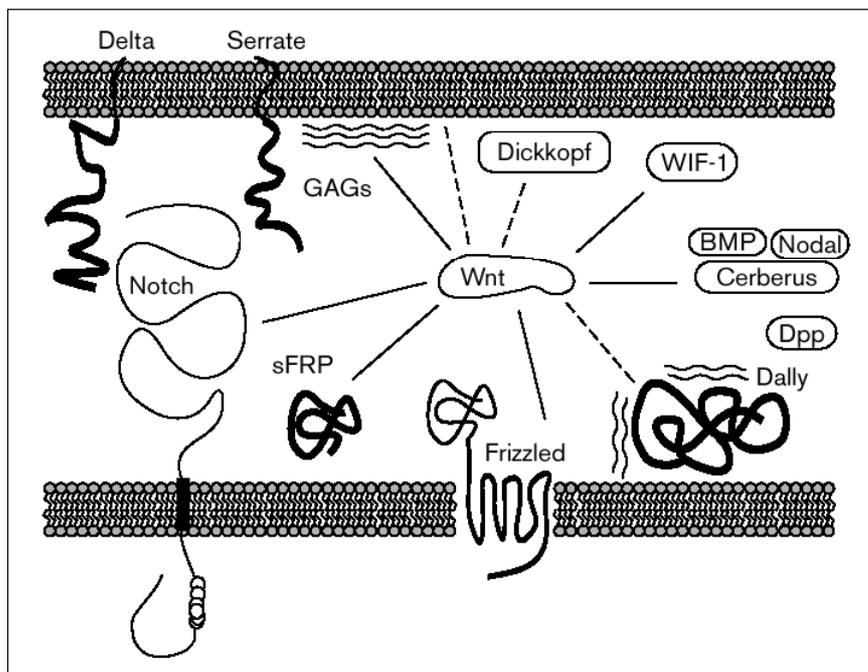


Abb. 39: Übersicht über bekannte Bindungspartner der Wnt Proteine im extrazellulären Bereich (aus Arias et al., 1999). Durchgehende Striche stehen für molekular belegte Interaktionen, während gestrichelte Verbindungen aus funktionellen und genetischen Untersuchungen abgeleitet wurden.

Neben der Bindung des Wnt-Liganden an den frizzled Rezeptor und an die sezernierten Formen der sFRPs („secreted frizzled related protein“) binden die Wnt-Proteine zusätzlich noch an weitere Proteine, die keine CRD besitzen wie z. B. Dickkopf, Cerberus und „Wnt inhibitory factor-1“ (WIF-1) und ebenso modulierend auf die Signalweiterleitung wirken (s. Abb. 39) (Arias et al., 1999).

Ein möglicher Regulator des Wnt-Signalweges mit einer deutlichen Herunterregulation in Prostatumoren ist der „Wnt Inhibitory Factor 1“ (WIF-1). Die chromosomale Lokalisation in der Region 12q14.3 konnte in Prostatumoren nicht als Verlustregion identifiziert werden, sondern zeigt sich in CGH-Studien eher amplifiziert (Zitzelsberger et al., 2001; Sattler et al., 1999). Das WIF-1 kompetitiert als extrazellulärer Inhibitor mit dem Frizzled-Rezeptor um die Bindung an das Wnt-Protein und wirkt auf diese Weise regulierend auf die Signalweiterleitung (Hsieh et al., 1999).

WIF-1 unterliegt einer stark ausgeprägten gewebsspezifischen Regulation und wird mit mindestens zwei Spleißformen in der Prostata, Lunge und dem Gehirn exprimiert im Gegensatz zu der nur einen Spleißform des Mäuse-Orthologs (Hsieh et al., 1999). In Skelettmuskeln wird WIF-1 in einer einzelnen deutlichen Spleißvariante exprimiert. In den Affymetrix Chipexperimenten zeigte sich WIF-1 als eins der am stärksten in den Tumoren herunterregulierten Gene mit einer deutlichen differentiellen Expression in 50% der untersuchten Fälle. Die Untersuchungen der Expression an einzelnen Tumoren durch Taqman-PCR verstärkte die Signifikanz und auch die Höhe der Expressionsunterschiede gegenüber den Chipexperimenten deutlich, da 64% der untersuchten Tumore eine zum Teil mehr als 100fache Herunterregulation der WIF-1 Expression zeigten. Ein Vergleich der Expressionswerte zwischen den Chipexperimenten und den Taqman-Versuchen zeigt eine deutlich sensitivere Detektion mit stärkeren Unterscheidungen durch die Taqman-PCR.

Die deutlichen Unterschiede in den Höhe der differentiellen Expression zwischen den Chipergebnissen und den in der quantitativen-PCR ermittelten Werten haben zum Teil ihren Grund in der vereinfachenden Annahme einer jeweils 100%igen Amplifikation mit jedem PCR-Zyklus. Die Größe der in der PCR-Reaktion amplifizierten Bereiche wurde um die 100 bp ausgewählt, um eine möglichst hohe Amplifikationseffizienz mit einem kurzen Amplikon zu erhalten. So ist die Amplifikationseffizienz der gewählten Primer und Sonden für das Ponsin Gen bei 79%. Ein Unterschied der Amplifikation von zwei Proben von 5 Zyklen führt

also nicht wie bei 100% Effizienz zu $2^{(1*5)}=32$ fachem Unterschied sondern zu einem $2^{(0,79*5)}=15,45$ fachen Unterschied. Dieser Effekt macht sich umso stärker bemerkbar, je größer die Unterschiede zwischen den Zyklen sind. Bei einem Vergleich von Änderungen von nur wenigen Zyklen fällt der Faktor nicht stark ins Gewicht und kann zur Berechnung vernachlässigt werden (User Bulletin #2 ABI Prism 7700 Sequence Detection System; Applied Biosystems, Weiterstadt).

Die differentielle Expression des WIF-1 konnte durch Northern-Hybridisierungen auf Membranen mit cDNAs von verschiedenen Tumorpatienten zusätzlich an Brust- und Lungengewebe gezeigt werden. Erste Untersuchungen an mikrodissezierten Geweben von Brusttumorpatientinnen haben in einem Vergleich der Tumore zu ihren Normalgeweben die Herunterregulation in den Tumoren deutlich bestätigt.

Immunhistochemische Färbungen an 46 Harnblasentumorschnitte zeigten eine deutliche Herunterregulation der WIF-1 Expression in 26% der Tumore. Die Herunterregulation der Expression in pT1-4-Tumoren war mit 44,4% deutlich höher als mit nur 14,3% in pTa-Tumoren. Die Abhängigkeit der WIF-1 Herunterregulation in Prostata Tumoren vom Stadium konnte in den untersuchten Proben auf der RNA-Ebene nicht beobachtet werden. In der Immunhistochemie von bisher 5 zur Verfügung stehenden Prostata Tumoren konnte ein Verlust der WIF-1 Expression in niedriggradigen, aber nicht in hochgradigen Tumoren beobachtet werden. Eine genauere Klärung der differentiellen Expression von WIF-1 muss ein Färbung an einer größeren Serie von Patienten zeigen.

Ein weiteres Gen das mit einem Probensatz auf dem Chip repräsentiert ist und in seiner Funktion ähnlich dem WIF-1 wirkt, ist das sFRP1 (secreted frizzled related protein 1). Zusätzlich zu der 7-transmembran-frizzled-Rezeptor-Familie existiert die Familie der sezernierten Frizzled-ähnlichen Gene, (sFRPs), die sich aus fünf bisher bekannten Genen zusammensetzt, ebenfalls eine Cystein-reiche-Domäne besitzt mit der es an Wnt-Proteine bindet und als kompetitiver Inhibitor der Wnt-Bindung an den frizzled Rezeptor fungiert (Rattner et al., 1997). Vergleichbar zu den Frizzled-Rezeptoren besitzen auch die sFRPs funktionelle Spezifität bezüglich ihrer Wnt-Liganden. So konnte gezeigt werden, das sFRP1 die Wnt-1 induzierte β -Catenin Anreicherung inhibiert (Dennis et al., 1999), während sFRP2 die intrazelluläre Konzentration von β -Catenin erhöht und zu einem antiapoptotischen Phänotyp in kultivierten MCF-7 Zellen führt (Melkonyan et al., 1997).

Die ambivalente Rolle der sFRP-Proteine mit der zuvor beschriebenen teilweisen inhibitorischen Wirkung im Wnt-Signalweg im Falle des sFRP1 oder aber antiapoptischen Wirkung des sFRP-2, wird auch in den Expressionsprofilen der Prostatapatienten deutlich. Während sFRP1 in 106 der untersuchten Prostatatumoren als anwesend detektiert wurde, jedoch ohne signifikante Regulation, zeigt das sFRP4 eine Hochregulation in 30 der untersuchten Prostatatumoren. Eine vergleichbare Hochregulation der sFRP4 Expression konnte in infiltrierenden Brusttumoren gezeigt werden (Abu-Jawdeh et al., 1999).

Die Analyse der Expression des sFRP1 durch den elektronischen Northern deutete auf eine Herunterregulation in Blasen-, Brust-, Uterus- und Nierentumoren und eine gleichmäßige Expression in der Prostata hin, die, wie zuvor angesprochen, durch die Chipexperimente bestätigt werden konnte. Ugolini et al. (1999) konnten eine Herunterregulation der Expression in 80% der Brusttumoren zeigen. In einer Serie von 54 Blasentumoren und 4 Blasennormalgeweben, die durch Affymetrix Chips untersucht wurden, konnte eine Expression des sFRP1 nur in einem Tumor, jedoch in zwei Normalgeweben detektiert werden. Die geringe Zahl der Normalgewebe erlaubt noch keine definitive Aussage über eine differentielle Expression, gibt aber schon einen Hinweis in Richtung einer Herunterregulation von sFRP1 in Blasentumoren. Die Region der Lokalisation des sFRP1 8p11.22 ist in Blasentumoren häufig verloren und wird mit fortgeschrittenen Tumoren assoziiert (Takle and Knowles, 1996; Choi et al., 2000). LOH-Untersuchungen an 99 Primärtumoren der Harnblase bestätigten einen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 8 und im besonderen der Region 8p12 (Arndt Hartmann, Institut für Pathologie der Universität Regensburg). Eine Sequenzierung der genomischen DNA des sFRP1 der betreffenden Patienten führte jedoch nicht zur Identifikation von Mutationen, die einen möglichen Verlust in den Tumoren erklärt hätten (E. Klopocki, metaGen Pharmaceuticals GmbH). Eine Herunterregulation der Expression in Blasentumoren beruht in diesem Fall wahrscheinlich nicht auf dem Verlust eines Allels und der Mutation des anderen Allels, sondern möglicherweise auf epigenetischen Phänomenen, wie einer Methylierung des Promotorbereichs (Chen et al., 2000).

Die Herunterregulation der Expression des sFRP1 konnte in Northern-Hybridisierungen von Blasen tumorpatienten deutlich bestätigt werden. Zur Untersuchung der Proteinexpression und Lokalisation wurde eine Serie von 46 Harnblasentumoren mit dem zuvor getesteten polyklonalen Kaninchen Anti-sFRP1-Antikörper untersucht. Von 46 Harnblasentumoren, die zum Teil auch noch Bereiche mit Normalgewebe enthielten, war in 12 Tumoren keine

Färbung zu beobachten, während die vorhandenen Normalurothelien dieser Schnitte eine deutliche Expression des sFRP1 zeigten. Zwischen dem Verlust der Expression von sFRP1 in den Blasen Tumoren und dem jeweiligen Grad und Stadium der Tumore konnte keine Korrelation beobachtet werden. Der Verlust des sFRP1 scheint also entweder ein früher Schritt in der Bildung von Harnblasenkarzinomen zu sein oder aber ist nicht mit einem histologisch klassifizierbaren Symptom zu beschreiben. So ist es z. B. noch ungeklärt, warum bei einer Wiederkehrrate von 60%-70% des entfernten Tumors etwa 15%-25% dieser Rezidive einen Progress des Tumors zeigen, während die Mehrheit der wiederkehrenden Tumore keinen Progress zeigt. Inwieweit sFRP1 möglicherweise eine Rolle im Progress von Harnblasenkarzinomen zeigt (8p12 wurde mit Progress assoziiert (Takle and Knowles, 1996)), müsste durch eine separate Studie zum Expressionsverhalten über mehrere Jahre gesammelter Tumore von Patienten mit und ohne Tumorprogress untersucht werden. Die Gene WIF-1 und sFRP1 stellen beides mögliche Inhibitoren des Wnt-Signalweges dar und die Proteinexpression ist jeweils in 26% der untersuchten Harnblasentumoren herunterreguliert. In den 46 untersuchten Harnblasentumoren ist in 44% der Fälle zumindest eins der beiden Gene herunter reguliert. Wie Abb. 39 gibt es eine ganze Reihe von Bindungspartnern der Wnt-Liganden, die möglicherweise in den anderen Harnblasentumoren reguliert sind.

5.3.2 Chimerin-1, funktionelles Homolog des NF-1, zeigt eine deutliche Herunterregulation in Prostatatumoren

Eine Unterfamilie der Ras-Superfamilie bildet die Gruppe der Rho-GTPasen. Sie sind ebenfalls in der Lage zwischen einem aktiven GTP-beladenen und einem inaktiven GDP-beladenen Zustand zu wechseln. Die Hydrolyse des GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der Rho-Proteine wird durch GTPase-aktivierende-Proteine (GAP) beschleunigt, während der Austausch von GDP gegen GTP durch GTP-Austauschfaktoren (GEF) unterstützt wird (Schmitz et al., 2000).

Das NF1-Gen, das als GTPase aktivierendes Protein für p21-Ras wirkt, wurde als Tumorsuppressorgen durch Kopplungsanalysen von Patient mit Neurofibromen gefunden (Cawthon et al., 1990). Eine Mutation des NF1 führt zu einer Erhöhung des Ras-GTP in den betreffenden Zellen, einer dadurch bewirkten Aktivierung des Signalweges und zu einer verstärkten Gentranskription.

Ein Gen mit einer homologen Funktion zum NF-1 in dem verwandten Signalweg der Rho/Rac-Proteine ist das Chimerin-1. Das GTPase aktivierende Protein für Rac, einem Mitglied der Rho-Unterfamilie, beschleunigt die Inaktivierung des GTP-gebundenen aktiven Rac (Hall et al., 1993). Für die Unterfamilie der Rho-Proteine wird auf Grund ihrer vielseitigen Funktionen in der Organisation des Zytoskeletts, Aktivierung von Kinasenkaskaden, Regulation der Genexpression, Förderung des Wachstums und Induzierung von Apoptose eine mögliche Schlüsselrolle in transformierenden Prozessen vermutet (Zohn et al., 1998). Die Rho GTPasen sind an der Migration und Invasion epithelialer Zellen beteiligt und spielen damit vermutlich eine entscheidende Rolle in der Tumordinvasion (Schmitz et al., 2000). So wurden mehrere Familienmitglieder als Regulatoren der transformierenden Wirkung von onkogenem Ras identifiziert. Neben der Aktivität der GAP-Domäne besitzt das Chimerin-1 noch die Fähigkeit durch Bindung an Rac1 und Cdc42 regulierend zu wirken, ohne dass der genaue Mechanismus bisher bekannt ist (Kozma et al., 1996). Vermutlich spielen die SH2-Protein-Bindungsdomäne und die regulierend wirkende C1-Domäne eine Rolle in der Interaktion des Chimerin-1 mit noch weiteren Proteinen.

Die Taqman-Untersuchungen von cDNAs normaler Gewebe bestätigen deutlich die im elektronischen Northern gefundene kräftige Expression von Chimerin-1 im Gehirn und die schwächere Expression in weiteren Geweben wie der Prostata, Plazenta, Hirnanhangdrüse und Lunge. Die Auswertung der Affymetrix-Chiphybridisierungen und die Taqman-Analysen für Prostata-Tumorpatienten zeigten übereinstimmend eine Herunterregulation in etwa 45% der untersuchten Tumore.

Chimerin-1 ist auf Chromosom 2q31-q32.1 lokalisiert, einer Region, die nicht häufig in Prostata-Tumoren verloren ist (Akers et al., 2000), die in Blasen-Tumoren aber in Zusammenhang mit einem höheren Tumorgrad gebracht wurde (Zhao et al., 1999). Auch bei Lungentumoren wurde ein Verlust der Region 2q mit einer schlechteren Differenzierung des Tumors und einer damit verbundenen höheren Aggressivität in Zusammenhang gebracht (Otsuka et al., 1996).

Die Funktion der Rho-Unterfamilie in transformierenden Prozessen und insbesondere in der Tumordinvasion sowie die Lage des Chimerin-1 in einer mit schlechterer Differenzierung und höherem Tumorgrad in Zusammenhang gebrachten Region lässt eine mögliche Rolle des Chimerin-1 auch in solchen Prozessen des Prostatakarzinoms vermuten. Eine nähere Analyse der bekannten histologischen Angaben der Prostata-Tumore zeigt jedoch keine Korrelation zwischen dem Verlust der Chimerin-1 Expression und dem Grad oder Stadium des Tumors.

5.3.3 Ursachen der differentiellen Expression von Ponsin in Chiphybridisierungen von manuell mikrodiseziertem Gewebe

Zur Betrachtung möglicher Tumorsuppressor-Kandidatengene, die neben einer Herunterregulation in Prostatumoren in chromosomalen Regionen mit einem häufigen Verlust lokalisiert sind, fällt vor allem das Gen Ponsin auf. Die Region 10q23 beinhaltet den potentiellen Tumorsuppressor PTEN an der Position 10q23.31 und wurde in LOH-Untersuchungen in bis zu 49% der untersuchten Prostatumore als verloren identifiziert (Feilotter et al., 1998). Mutationen wurden in einigen Zelllinien der Brust, Prostata und Glioblastomen entdeckt (Li et al., 1997) sowie auch in Melanomen (Birck et al., 2000) und Prostatumoren (Cairns et al., 1997). In Tumoren verschiedener anderer Gewebe konnten bei einem Verlust der Region Mutationen im Gen PTEN identifiziert werden (Birck et al., 2000), während für Prostatumore die Situation kontrovers diskutiert wird. Cairns et al. (1997) fanden in ihren Untersuchungen einen Verlust von 10q23 in 29% der untersuchten Prostatumoren, von denen 43% eine inaktivierende Mutation aufwiesen. Im Gegensatz dazu haben Feilotter et al. (1998) bei einem Verlust der Region in 49% der Prostatumoren eine Mutation nur in 4% der Fälle identifizieren können. Andere Studien kamen zu einem ähnlichen Ergebnisse, da sie in ihren Untersuchungen, trotz LOH in der Region, keine oder nur zu einem sehr geringen Anteil Mutationen finden konnten (Orikasa et al., 1998; Pesche et al., 1998; Dong et al., 1998).

In unmittelbarer Nähe zu PTEN, etwa 8 Mb entfernt in der zytogenetischen Bande 10q23.33, ist das Gen Ponsin lokalisiert. Ponsin besitzt eine besonders deutliche Expression in Prostata, Magen, Dünndarm und Brust und zeigt im Vergleich zu den Geweben in den meisten Zelllinien nur eine äußerst geringe Expression.

Ponsin gehört zu einer wachsenden Familie von Proteinen, die eine Sorbin-Homologie Domäne und drei C-terminale SH3 Domänen besitzen. Ponsin wurde in einer Hefe Zwei-Hybrid-Suche als Bindungspartner von c-Cbl identifiziert (c-Cbl associated protein, CAP). Zusätzlich bindet Ponsin an den Insulinrezeptor, dissoziiert nach Insulinstimulation und es wird als mögliches Adaptormolekül in der Insulinsignalweiterleitung betrachtet (Ribon et al., 1998). Ponsin wurde als ein p53 reguliertes Gen identifiziert (Kostic and Shaw, 2000) und ist an speziellen Membranstrukturen lokalisiert, die Zell-Zell-Kontakte vermitteln Mandai et al. (1999). Ponsin bindet das Aktinfilament-bindende Protein I-Afadin mit seiner prolinreichen Sequenz an die zweite und dritte SH3-Domäne. Außerdem bindet Ponsin über die erste und

zweite SH3 Domäne an die prolinreiche Region von Vinculin. Vinculin ist ein F-Aktin-bindendes Protein und verbindet die Aktinfilamente über α -, β - und γ -Catenin mit der cytosolischen Domäne der Cadherine, die als Adhäsionsmoleküle auf der extrazellulären Oberfläche miteinander interagieren. Die Bindung von Ponsin an die beiden Aktinfilament-bindenden Proteine findet nicht in einem ternären Komplex statt, sondern in einer kompetitiven Weise.

Für eine weiterführende Untersuchung wurde Ponsin auf Grund seiner Rolle als Adaptorprotein in tumorrelevanten Prozessen und seine chromosomale Position an einem häufig verlorenen Locus, ohne ein bisher eindeutig identifiziertes Kandidatengen, ausgewählt. Die in den Chipuntersuchungen gefundene Herunterregulation in 27% der untersuchten Prostatatumore wurde durch die Untersuchungen in der Quantitativen-PCR noch bekräftigt, da mehr als 60% der Patienten eine Herunterregulation zeigten. Die Taqman-PCR bestätigte für alle Patienten mit einer in den Chipexperimenten festgestellten differentiellen Expression die Herunter- bzw. in einem Fall auch die Heraufregulation der Ponsinexpression in den Tumoren. Für eine Reihe von Patienten, deren Faktoren $F=N/T$ in den Chipexperimenten unterhalb des Grenzwertes von 2 lagen, konnte durch Nutzung der höheren Sensitivität der Amplifikation in der PCR-Reaktion eine differentielle Expression gezeigt werden. Die Auswertung des elektronischen Northern von Ponsin zeigte zu der signifikant differentiellen Expression in Prostatatumoren zusätzlich noch in Tumoren der Harnblase, Brust und Darm eine mögliche Ponsin-Expressionsregulierung. Auf Grund der schwierigen Mikrodissektion von Blasennormalgewebe in ausreichenden Mengen konnte für die Validierung des elektronischen Northern in Blasengewebe nur eine kommerziell erhältliche Northern-Membran mit Gesamt-Gewebeproben von Blasentumor-Patienten verwendet werden. Die Northern-Hybridisierung zeigte eine deutliche Herunterregulation des Ponsins in den Tumoren.

Eine Analyse der Prostatatumore mit Ponsin-Herunterregulation durch eine LOH-Untersuchung mit einem intragenischen Marker sowie einiger benachbarter Marker, die auch den Bereich des PTEN-Gens überspannten, zeigte nur in 7% der informativen Fälle einen eindeutigen Verlust des intragenischen Markers. Unter Berücksichtigung der direkt benachbart gelegenen Marker in den homozygoten Patienten konnte der Anteil möglicher Patienten mit einem Allelverlust im Bereich des Ponsinlokus auf 22% erhöht werden. Auf

Grund der selektierten Auswahl von Patientenproben mit einer RNA-Herunterregulation in Prostatatumoren und einem Verlust des Gens in 7% bis maximal 22% der Patienten scheint ein Verlust dieses Bereiches kein generelles Charakteristikum von Prostatatumoren zu sein. Aus diesem Grund wurde auch auf eine weitere Untersuchung der Tumore durch eine Mutationsanalyse verzichtet. Die Betrachtung der weiteren Marker der LOH-Analyse führt zur Identifikation der Bande 10q26.2 um den Marker D10S1223 mit mehr als 36% LOH. Dieser Bereich wurde in Lungen- und Harnblasentumoren mit Tumorprogress in Zusammenhang gebracht (Cappellen et al., 1997; Petersen et al., 1998), konnte in den untersuchten Prostatatumoren aber nicht in Korrelation gebracht werden. Eine Analyse der Sequenzen des Chips aus dieser Region führte nicht zur Identifikation eines differentiell exprimierten Gens, so dass die Expression des Gens möglicherweise zu gering für eine Detektion in Chipexperimenten ist oder das Gen nicht auf dem Chip vorhanden ist.

Für die Untersuchung der Lokalisation des Ponsin-Proteins wurde nach Testung der Sensitivität der polyklonale Antikörper Ponsin-AKa für die Immunhistochemie eingesetzt. Die Bindung des Antikörpers an Gefrierschnitte der Prostata zeigte die spezifische Färbung von stromalen und glatt-muskulären Bereichen mit zum Teil geringer Färbung in Epithelien. Ein Unterschied in der Färbung der Epithelien der Normal- und Tumorbereiche war nicht zu beobachten. Im Vergleich zu den Prostatatumoren war bei makroskopischer Betrachtung der Normalgewebe die Färbung deutlich intensiver. Diese erhöhte Färbung ließ sich jedoch auf die unterschiedlichen histologischen Strukturen, mit einem deutlich geringeren Anteil von stromalen Geweben in den Prostatatumoren, zurückführen. Die zur Expressionsuntersuchung verwendeten Prostatagewebe wurden zu einer möglichst reinen Trennung von verschiedenen Gewebetypen mikrodiseziert, jedoch nur mit einer manuellen Methode, die eine Trennung einzelner Zellen, wie durch die Laser-gestützte Mikrodisektion, nicht erlaubt. Ponsin gehört also nicht zu der Gruppe, die eine differentielle Expression auf Grund ihrer Relevanz für tumorigene Prozesse zeigen, sondern ihre Ursache in der ungleichmäßigen Verteilung von Zellen in den Tumor- und korrespondierenden Normalproben haben (Martin et al., 2000). Zur Vermeidung einer Ungleichgewichtung von unterschiedlichen Zelltypen in den Proben ist eine Laser-gestützte Mikrodisektion (Emmert-Buck et al., 1996) für eine Trennung direkt benachbarter Zellen notwendig.