

**Untersuchungen zur Expression des Sekretoglobins
SCGB 2A1 in der humanen Prostata**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dold, Leona, geb. Schwall
aus Koblenz

Gießen 2015

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner

Tag der Disputation: 06.02.2015

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung	6
1.1. Die Prostata.....	6
1.1.1. Entwicklung und Anatomie	6
1.1.2. Mikroskopische Anatomie und Zelltypen der Prostata	7
1.1.3. Funktion und Sekrete der Prostata	10
1.2. Histologische Veränderungen der Prostata	11
1.2.1. Die Benigne Prostatahyperplasie	11
1.2.2. Das Prostatakarzinom.....	12
1.3. SCGB 2A1	14
1.4. Fragestellung der Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Material	17
2.1.1. Chemikalien	17
2.1.2. Geräte	19
2.1.3. Verschiedenes.....	20
2.1.4. Enzyme und Antikörper	21
2.1.5. Prostata Gewebe.....	22
2.1.6. Tränenflüssigkeit.....	22
2.2. Methoden	23
2.2.1. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	23
2.2.2. Expression von rekombinantem SCGB 2A1 in <i>E. coli</i>	24
2.2.2.1. Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> und Transformation	24
2.2.2.2. Expression von rekombinantem SCGB 2A1 und Aufreinigung mittels	27
Ni-NTA-Agarose Affinitätschromatografie.....	27
2.2.3. Herstellung eines SCGB 2A1 Antiserums.....	29
2.2.4. Affinitätsreinigung des SCGB 2A1 Antiserums.....	29
2.2.4.1. Aufreinigung mittels Antigen, das auf einer Nitrocellulosemembran fixiert ist ...	29
2.2.4.2. Aufreinigung mittels Protein A und G Sepharose	30
2.2.4.3. Aufreinigung mittels rekombinantem SCGB 2A1 Protein.....	31
2.2.5. Western Blot.....	33
2.2.6. Immunfluoreszenz.....	35
2.2.6.1. Antigendemaskierung.....	35
2.2.6.2. Doppel-Immunfluoreszenz zum Nachweis von SCGB 2A1 in den	
Basalzellen der humanen Prostata.....	35
2.2.6.3. Doppel-Immunfluoreszenz zum Nachweis von SCGB 2A1 und PSA	36
2.2.7. Immunhistochemischer Nachweis von SCGB 2A1 mit DAB	36
3. Ergebnisse	38
3.1. Spezifität und Herkunft des verwendeten SCGB 2A1 Antiserums.....	38
3.2. Expression von SCGB 2A1 in Prostatazellen	45
3.3. Expression von SCGB 2A1 in der humanen Prostata.....	50
4. Diskussion.....	53
4.1. Die Expression von SCGB 2A1 in den Basalzellen der humanen Prostata	53
4.2. Nachweis von SCGB 2A1 in Prostataschnitten von Patienten mit	
benigner Prostatahyperplasie (BPH) und Prostatakarzinom (PCA)	60
5. Zusammenfassung.....	64
6. Summary.....	65
7. Literaturverzeichnis.....	66
8. Anhang.....	73

8.1.	Abbildungsverzeichnis.....	73
8.2.	Danksagung.....	74
8.3.	Lebenslauf.....	75
8.4.	Eigene Publikationen und eingereichte Arbeiten.....	76
8.5.	Erklärung.....	77

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CA	Karzinom
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluorescein isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
Min	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCA	Prostatakarzinom
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amino-methan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
v/v	Volumenverhältnis
v/w	Gewichtsverhältnis

1. Einleitung

1.1. Die Prostata

1.1.1. Entwicklung und Anatomie

Zwischen der neunten und zehnten Woche der embryonalen Entwicklung beginnt das Epithel der *Pars prostatica* der Urethra (Harnröhre) zu proliferieren. Die daraus entstehenden Auswüchse wachsen in das umgebende Mesenchym ein und bilden später die Prostata im männlichen Embryo (Thomson, 2001). Das Epithel der Urethra entspringt dem Endoderm, während das umgebende Bindegewebe sowie die glatten Muskelzellen aus dem Mesoderm entstehen (Benninghoff, 2008). Beim Erwachsenen wird die Prostata aufgrund ihrer Form und Größe oft mit einer Kastanie verglichen. Sie wiegt ca. 20 g und befindet sich tief im kleinen Becken unmittelbar unterhalb der Harnblase. Die Urethra durchzieht das Organ vollständig und tritt direkt von unten, unterhalb des Blasenhalses, in die Drüse ein und tritt am Apex der Prostata auf Höhe des Diaphragma urogenitale wieder aus. Die Ausführungsgänge durchziehen die Prostata von lateral hinten und ziehen schräg Richtung medial wo sie an der hinteren Oberfläche der *Pars prostatica* in der Urethra enden (Schmidt, 2003). Die Vorderseite der Drüse liegt dem *Os pubis* an. Die Hinterseite der Prostata ist abgeflacht und wird von einer tastbaren Einkerbung überzogen, die als schmale Linie medial die Prostata überzieht und der Rektumampulle anliegt. Vom Rektum aus kann die Prostata gut durch Palpation untersucht werden (Hautmann, 2010). Eine Kapsel, die aus glatten Muskelzellen und Bindegewebe besteht, umgibt das gesamte Organ. Das Parenchym besteht aus fibromuskulärem Gewebe, welches die 30-50 tubuloalveolären Drüsen umschließt, deren Ausführungsgänge in die Urethra münden (Benninghoff, 2008). Das Innere der Prostata kann wie früher in Läppchen oder neuer in Zonen unterteilt werden. Diese Gliederung bezieht sich auf die embryonale Entwicklung des Organs, da die Prostata aus fünf verschiedenen Gruppen epithelialer Ausknospungen, die aus dem *Sinus urogenitalis* herauswachsen, entsteht (Thomson, 2001). Aus diesen Auswucherungen entsteht um die Urethra herum ein komplexes System aus Drüsengängen. Es bilden sich ein anteriorer, ein posteriorer, ein mittlerer und zwei laterale Lappen (Thomson & Marker, 2006). Heute wird, basierend auf klinischen und

pathologischen Untersuchungen, eine Einteilung in drei Zonen verwendet. Die periurethrale Zone liegt wie der Name nahelegt, direkt der Urethra an und stellt die kleinste Zone dar. Sie wird auch als Transitionalzone bezeichnet und stellt ca. 5% der gesamten Prostata dar. Die Innenzone umgibt die *Ducti ejaculatorii* und bildet rund 25%, während die Außenzone mit 70% den größten Teil der Prostata bildet (Benninghoff, 2008; McNeal, 1981).

1.1.2. Mikroskopische Anatomie und Zelltypen der Prostata

Das Prostataepithel beherbergt drei Zelltypen, die sich funktionell und histologisch unterscheiden: luminal, sekretorische Zellen und Basalzellen (El-Alfy, Pelletier, Hermo, & Labrie, 2000; Hayward, Brody, & Cunha, 1996; McNeal, 1968). Die neuroendokrinen Zellen, die einen dritten Zelltyp darstellen, verteilen sich vereinzelt zwischen den Luminal- und Basalzellen (di Sant'Agnesse, 1992). Sie enthalten Serotonin, und mikroskopisch lassen sich kleine typische Granula in ihrem Zytoplasma nachweisen. Weiterhin findet man vereinzelt spezialisierte Zellen, die zum Beispiel Muzin produzieren (Benninghoff, 2008). Das Drüsenepithel wird von festem, fibromuskulärem Gewebe umgeben, in welches viele kleine Blutgefäße und Nerven eingebettet sind. Das zweireihige Epithel wird vorwiegend von Luminal- und Basalzellen gebildet. Die basale Reihe wird von den regelmäßig angeordneten Basalzellen gebildet, welche die Luminalzellen von der Basalmembran trennen.

Die Luminalzellen kommen im Epithel mit 75% am häufigsten vor

(siehe Abb.1, weißer Pfeil). Sie sind säulenförmig und reich an Zytoplasma (Xue et al., 1998). Es handelt sich um voll differenzierte, sekretorische Zellen, die Androgen abhängig sind und durch eine Reihe von Basalzellen von der Basalmembran getrennt werden. Basalzellen sind spindelförmig und orientieren sich parallel zur Basalmembran. Sie besitzen kleine, dunkle Zellkerne und können morphologisch unterschiedliche Gestalt annehmen. Basalzellen liegen entweder klein und flach oder in kubischer, zytoplasmareicher Form vor (McNeal, 1981). Sie bilden eine kontinuierliche Reihe oberhalb der Basalmembran (Abb. 1, schwarzer Pfeil).

Innerhalb des Basalzellkompartments befinden sich die neuroendokrinen Zellen. Diese Zellen verfügen über viele Granula in unterschiedlicher Größe. Verglichen mit den

anderen Organen des Urogenitaltraktes beherbergt die Prostata die meisten neuroendokrinen Zellen. Morphologisch lassen sich zwei Typen neuroendokriner Zellen unterscheiden: offene, flaschenförmige Zellen mit langen Ausläufern zum glandulären Lumen hin sowie geschlossene Zellen ohne Ausläufer (di Sant'Agnesse, 1992). Die Zellen der Prostata können in Höhe und Größe variieren, abhängig von ihrer aktuellen sekretorischen Aktivität und dem hormonellen Status der Drüse (Stevens, 1997). Altersbedingt können Veränderungen des Prostatagewebes auftreten, wie sie in Kapitel 1.2 beschrieben werden.

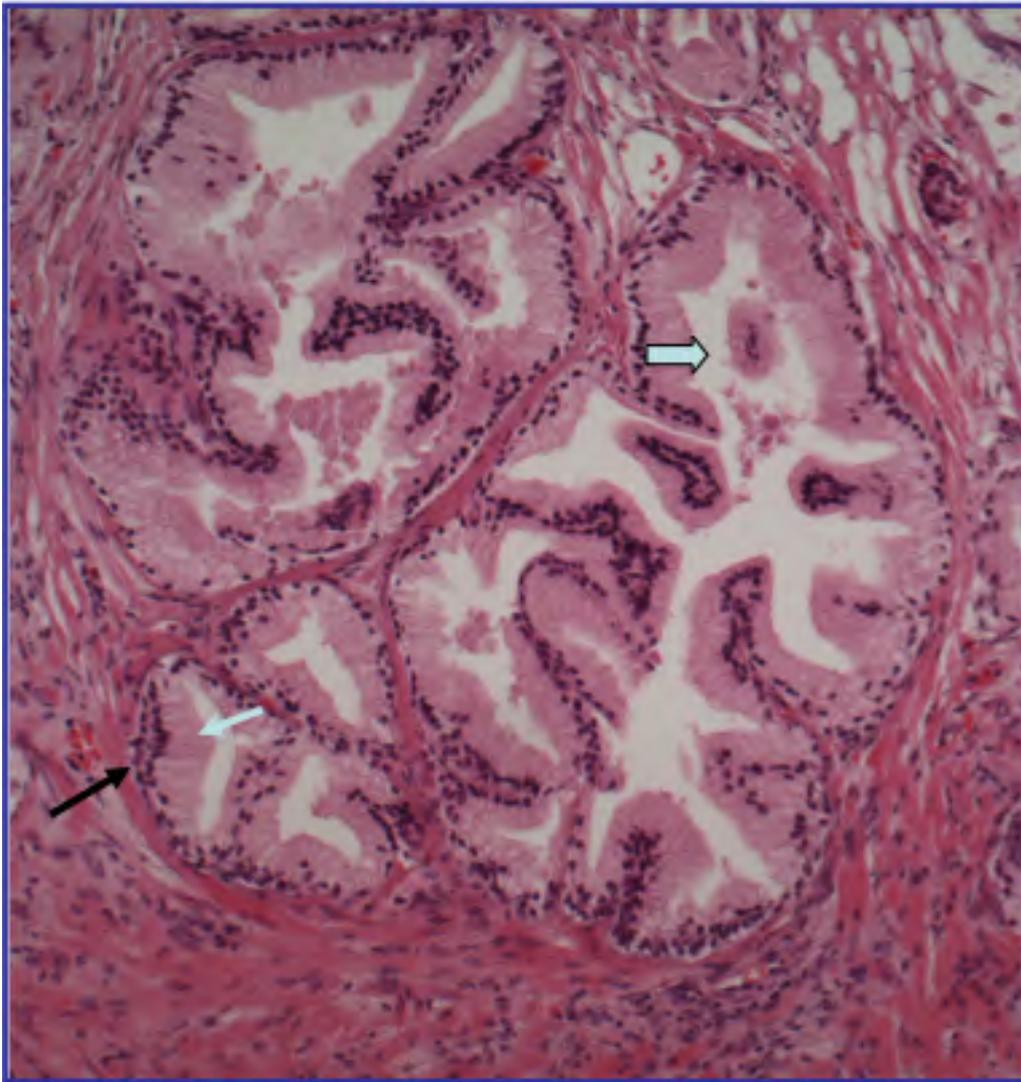


Abb. 1. Die Prostata des Erwachsenen.

Hämatoxylin/Eosin Färbung von gesundem Prostatagewebe. Zu sehen sind die tubuloalveolären Drüsen. Luminalzellen (weißer Pfeil) besitzen mehr Zytoplasma und sind säulenförmig im Vergleich zu den Basalzellen (schwarzer Pfeil). Die wenigen neuroendokrinen Zellen lassen sich mikroskopisch nicht von den Basalzellen unterscheiden. Das Drüsenlumen (offener weißer Pfeil) enthält oft Sekret oder Prostatasteine (letztere sind hier im Ausschnitt nicht zu erkennen).

Für gewöhnlich werden Luminalzellen anhand der Expression von Prostata spezifischem Antigen (PSA), saurer Phosphatase (PAP), dem Androgenrezeptor (AR) sowie CK8 und 18 identifiziert. Im Gegensatz zu den Luminalzellen sind Basalzellen androgenunabhängig (Isaacs & Coffey, 1989). Sie werden oft als undifferenzierte Zellen ohne sekretorische Aktivität beschrieben (Danielpour, 1999; Taylor & Risbridger, 2008). Die Basalzellen liegen einreihig oder zweireihig zwischen der Basalmembran und den sekretorischen Luminalzellen und können anhand ihrer Markerproteine, den Cytokeratinen 5 und 14 sowie CD44, unterschieden werden. Sie

exprimieren weder PSA noch PAP, deren Sekretion ausschließlich den Luminalzellen vorbehalten ist (Sherwood et al., 1990; Verhagen, Aalders, Ramaekers, Debruyne, & Schalken, 1988). Es wird jedoch nur wenig Androgenrezeptor in Basalzellen exprimiert (Bonkhoff & Remberger, 1993; Leav, McNeal, Kwan, Komminoth, & Merk, 1996). p63 ist ebenfalls ein häufig verwendeter Biomarker (Yang et al., 1998). Man geht davon aus, dass Basalzellen den epithelialen Stammzell/Progenitorzellpool bilden (DeKlerk & Coffey, 1978).

Die zwischen den Basalzellen liegenden neuroendokrinen Zellen exprimieren spezifisch Chromogranin A, Serotonin, Neurophysin, Synaptophysin und Calcitonin (Abrahamsson et al., 2000; Bonkhoff, Wernert, Dhom, & Remberger, 1991). Die neuroendokrinen Zellen sind, ebenso wie die Basalzellen, Androgen unabhängig (Bonkhoff, Stein, & Remberger, 1994).

1.1.3. Funktion und Sekrete der Prostata

Die Prostata gehört zur Gruppe der exokrinen Drüsen. Während sexueller Aktivität und in Abhängigkeit vom Hormonstatus stimulieren parasympathische Fasern die Acini der Prostata zur Produktion von Sekret. Die Fasern des Sympathikus erhöhen den Tonus der glatten Muskelzellen im Parenchym der Prostata und der Kapsel, um das Sekret in die Urethra abgeben zu können (Hautmann, 2010).

Ihre wichtigste Aufgabe besteht darin, den Spermatozoen Flüssigkeit beizugeben. Dieses Sekret dient dem Schutz, der Ernährung und zum Transport der Spermatozoen (Benninghoff, 2008).

Die Prostataflüssigkeit trägt 30% zum gesamten Volumen der Samenflüssigkeit bei und ist wichtig für die erfolgreiche Fertilisation (Hautmann, 2010). Die Zusammensetzung des Prostatasekrets variiert individuell, je nach Vorhandensein einer Entzündung oder der sekretorischen Aktivität. Das wichtigste Anion ist das Citrat, welches den pH-Wert der Samenflüssigkeit, der zwischen 6,2 und 8 liegt, am stärksten beeinflusst. Chlorid wird nur in geringen Konzentrationen gefunden (Kavanagh, 1985). Zusätzlich sind Kalium, Natrium, Zink, Calcium und Magnesium im Prostatasekret (Kavanagh, 1985) vorhanden. Aufgrund seiner Relevanz in der klinischen Diagnostik als Tumormarker für

das Prostatakarzinom ist das PSA das bekannteste Sekretprotein der Prostata (Shariat et al., 2011). Ein Monitoring dieses 36 kD großen Proteins kann zur Detektion von (residuaalem) Tumorgewebe oder zur Evaluation des Therapieansprechens bei fortgeschrittenem Tumorleiden verwendet werden (Mulders, Bruning, & Bonfrer, 1990). PSA wurde 1979 entdeckt und wird seitdem als Serummarker und bei der histologischen Auswertung verwendet (Daver et al., 1988). Der immunhistochemische Nachweis von PSA kann verwendet werden um Metastasen unklaren Ursprungs zuzuordnen (Mulders et al., 1990). Die Bestimmung des Gesamt-PSA beinhaltet die Messung von gebundenem und freiem PSA. Das gebundene PSA kann an Chymotrypsin und Makroglobulin gebunden vorliegen, und liegt vorwiegend bei malignen Erkrankungen in erhöhter Menge vor. Freies PSA steigt gehäuft bei benignen Prostataerkrankungen an.

1.2. Histologische Veränderungen der Prostata

1.2.1. Die Benigne Prostatahyperplasie

Bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) steigt das Drüsengewicht durch Proliferation der periurethralen Zone auf bis zu 150 g an. Dies verursacht eine starke Kompression der Harnröhre und der Blase, die nur noch unvollständig entleert werden kann, so dass Restharn in der Blase verbleibt. Dies geht mit einem erhöhten Risiko für Harnwegsinfekte einher. Der derart ausgelöste Urinverhalt führt zudem zu häufiger Miktion. Bei vielen Patienten vergrößert sich auch die Blase, da es zu einer Hypertrophie des Musculus detrusor vesicae kommt. Infolge ist die Nierenfunktion beeinträchtigt, und eine Hydronephrose kann entstehen (obstruktive Uropathie). Unter Umständen kann auch ein akuter Harnverhalt auftreten. 90% aller Männer über 60 Jahre zeigen Symptome einer BPH. Die meisten Symptome korrelieren nicht mit der Größe der Prostata, da Polyurie, Nykturie und Harndrang oft irritativ bedingt sind.

Um die Symptome eines Patienten mit BPH zu erfassen, kann der *International Prostate Symptom Score* (IPPS) verwendet werden. Er dient dazu die Symptome zu verifizieren und zu beurteilen, ob eine Therapie eingeleitet werden sollte oder nicht (Hautmann, 2010). Die BPH ist eine multifaktorielle Erkrankung für die verschiedene

Ursachen diskutiert werden. Hormonelle Veränderungen scheinen eine Rolle zu spielen. Ab einem Alter von 35 Jahren beginnt die Transitionalzone, bedingt durch durch hormonelle Veränderungen, zunehmend zu proliferieren (Sampson, Madersbacher, & Berger, 2008).

Die BPH entsteht primär in der periurethralen oder Transitionalzone der Prostata. Es ist lange bekannt, dass adenomatöses Wachstum vornehmlich in der Innenzone der Prostata auftritt, während das Prostatakarzinom vorwiegend in der Außenzone entsteht. In der BPH können sich verschiedene Veränderungen des Gewebes zeigen. Hauptsächlich zeigen die hyperplastischen Knötchen Komponenten des Stromas und nur wenige drüsige Anteile (Rohr, Krisl, Holliger, Oberholzer, & Bartsch, 1981; Shapiro, Becich, Hartanto, & Lepor, 1992).

1.2.2. Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom stellt bei Männern nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste Tumorentität dar (De Vita, 2011). Symptome des Prostatakarzinoms sind u.a. Knochenschmerzen, Schwierigkeiten bei der Miktion, sowie Erektile Dysfunktion. Die meisten Symptome entstehen erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium durch Metastasen, während zu Beginn der Erkrankung der Tumor noch klein ist und keine Beschwerden verursacht. Das Prostatakarzinom metastasiert vorwiegend in Lymphknoten und Knochen, jedoch können auch das Rektum, die Blase und die Lunge betroffen sein.

Ab einem Alter von 45 Jahren wird Männern in Deutschland eine kostenlose Vorsorgeuntersuchung empfohlen. Alle zwei Jahre sollte der PSA-Wert gemessen und eine rektale Untersuchung durchgeführt werden. Außer bei Verdacht auf Prostatakarzinom oder zur Verlaufskontrolle eines Prostatakarzinoms ist die PSA-Bestimmung jedoch eine kostenpflichtige individuelle Gesundheitsleistung. Im Rahmen der rektalen Untersuchung lassen sich Verhärtungen und Änderungen der Größe palpieren. Rund 75% aller Prostatakarzinome entstehen in der Außenzone und können sich bei der rektalen Untersuchung als Knoten oder Verhärtungen darstellen

(Hautmann, 2010). Der PSA-Wert im Serum eines Patienten ist für gewöhnlich erhöht, wenn dieser an einem Prostatakarzinom leidet. Allerdings können auch falsch positive Messungen auftreten, die durch andere Stimulationen der Prostata auftreten, wie zum Beispiel Fahrradfahren. PSA-Werte sind altersabhängig und sollten 4,0 ng/ml nicht überschreiten (Hautmann, 2010). Wichtiger als die absolute Höhe des PSA-Spiegels ist jedoch eine plötzliche Veränderung im Verlauf mehrerer Messungen. Über 95% der Prostatakarzinome sind Adenokarzinome. Andere Karzinomtypen wie das Transitionalzellkarzinom, Sarkome oder Basalzellkarzinome treten nur sporadisch auf. Prostatakarzinome zeigen meist multifokales Auftreten und ein heterogenes glanduläres Muster (Mostofi, Davis, & Sesterhenn, 1992). Das Prostatakarzinom kann anhand des Vorliegens von kleinen infiltrierend wachsenden Drüsen diagnostiziert werden. In weniger differenzierten Tumoren zeigen sich unregelmäßige drüsige Formationen mit wenig Struktur oder die Drüsen fehlen sogar völlig. Die Tumorzellen können in Strängen, Nestern oder siebartig wachsen. Interessanterweise fehlt die Basalzellreihe im Prostatakarzinom völlig, während diese in der BPH noch vorhanden ist. In verdächtigen Läsionen mit unklarer Dignität kann eine immunhistochemische Färbung mit einem Cytokeratin 34β E12 Antikörper zur Darstellung der Basalzellen hilfreich sein, um zwischen Karzinom und BPH zu unterscheiden (Wojno & Epstein, 1995). Veränderungen in den Luminalzellen sind der Schlüssel zur Entstehung von Prostatakarzinomen, da 95-99% aller Prostatakarzinome aus diesem Zelltyp hervorgehen. Weniger als 1-5% der Prostatatumoren entstehen aus neuroendokrinen Zellen (Kasper, 2008). Tumore, die aus der Basalzellreihe entstehen, gelten als Raritäten über die bislang wenig publiziert wurde (Tuan, Pandha, Corbishley, & Khoo, 2012).

Prostatakarzinome werden histologisch eingeordnet, basierend auf ihrer glandulären Differenzierung, zytologischen Atypien und Veränderungen der Zellkerne. Grundsätzlich wird der *Gleason Score* zum *Grading* des Prostatakarzinoms verwendet, da dieses System das Karzinom am besten als multifokale Erkrankung erfasst (Gleason, 1992; Gleason & Mellinger, 1974).

1.3. SCGB 2A1

SCGB 2A1 gehört zur Familie der Sekretoglobine (SCGBs). Bei diesen handelt es sich um kleine Proteine, die vornehmlich in sekretorischen Epithelien von Säugetieren nachgewiesen wurden. Bislang konnten elf humane SCGB Gene und fünf Pseudogene gefunden werden. In Mäusen hingegen wurden bislang 68 verschiedene Sekretoglobin Gene identifiziert, von denen vier ortholog zu humanen Sekretoglobinen sind (Jackson et al., 2011).

Sekretoglobine sind selten glykosyliert und liegen als Homo- oder Heterodimere vor. Bis heute konnte ihre physiologische Bedeutung nicht klar ermittelt werden. Die Sekretoglobine Uteroglobin, Lipophilin A, B und C, Mammaglobin und Lymphoglobin sind auf Chromosom 11q12.2 lokalisiert und bilden einen Gencluster von weniger als 530 Kbp (Ni et al., 2000). Zwei weitere Mitglieder der humanen Sekretoglobinfamilie, Lu103/UGRP1 (SCGB3A2) und HIN-1/UGRP2 (SCGB 3A1) sind nur entfernt mit den anderen Sekretoglobinen verwandt und auf Chromosom 5 lokalisiert (Kurotani et al., 2008; Porter, Lahti-Domenici, Torres-Arzayus, Chin, & Polyak, 2002). Das erste Sekretoglobin konnte 1967 im Uterus des Kaninchens nachgewiesen werden. Dieses zunächst als Blastokinin benannte Protein erhielt später den Namen Uteroglobin (Beier, 1968; Krishnan & Daniel, 1967).

Alle Mitglieder der Sekretoglobin Proteinfamilie zeichnen sich durch einen sehr konservierten Genaufbau aus. Alle Gene bestehen aus drei Exons, mit zwei konservierten Intronpositionen (Ni et al., 2000). Im Jahr 2000 wurde eine einheitliche Benennung der einzelnen Sekretoglobine beschlossen, da identischen Proteinen aus der Familie zahlreiche unterschiedliche Namen gegeben worden waren (Klug et al., 2000). SCGB 2A1 wird daher auch als Lipophilin C, Lacryglobin und Mammaglobin B bezeichnet. Eine aktuelle Übersicht zur Superfamilie der Sekretoglobine und den unterschiedlichen Trivialnamen der einzelnen Proteine findet man in der Übersichtsarbeit von Jackson et al. (2011).

Die physiologische Bedeutung der Sekretoglobine ist nach wie vor unklar, jedoch scheint einigen Vertretern eine Bedeutung in der Tumorgenese zuzukommen. Eine Vielzahl von Untersuchungen hat sich mit dem bekanntesten Sekretoglobin, dem Mammaglobin (SCGB 2A2) beschäftigt. Damals wurde festgestellt, dass Mammaglobin

in Tumoren der Brust überexprimiert wird und sich als neuer Tumormarker zur Diagnostik des Mammakarzinoms eignet (Fleming & Watson, 2000; Goedegebuure, Watson, Viehl, & Fleming, 2004). Darüber hinaus können mit Hilfe des Mammaglobins Mikrometastasen verschiedener gynäkologischer Tumoren identifiziert werden (Grunewald et al., 2002). Auch die Expression von Lipophilin B (SCGB 1D2) wird im humanen Mammakarzinom deutlich hochreguliert. Mammaglobin (SCGB 2A2) und Lipophilin C (SCGB 2A1) unterscheiden sich in nur 39 von insgesamt 93 Aminosäuren und haben daher eine Identität von 58% (Zhao, Nguyen, Yusifov, Glasgow, & Lehrer, 1999). Jedoch wurde Mammaglobin in der Vergangenheit auf Grund seiner Bedeutung als Tumormarker wesentlich intensiver untersucht als Lipophilin C. Bisher wurde Lipophilin C (SCGB 2A1) in verschiedenen Geweben nachgewiesen: in der Tränendrüse, dem Pankreas, der Prostata, dem Hoden, im Ovar, in der Hypophyse und in geringen Mengen auch im Thymus (Sjodin et al., 2005; Zhao et al., 1999). In der Tränenflüssigkeit bildet SCGB 2A1 Heterodimere mit SCGB 1D1 (Lipophilin A) aus (Lehrer et al., 1998). Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurde SCGB 2A1 im Epithel des Augenlids, in der Konjunktiva und im *Musculus orbicularis ori* identifiziert (Stoekelhuber et al., 2006). Des Weiteren wurde die androgenabhängige Expression von SCGB 2A1 in der humanen Prostata untersucht (Xiao, Mirwald, Papaioannou, Baniahmad, & Klug, 2005).

1.4. Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen der von Xiao (2003) durchgeführten Versuche ergaben sich Hinweise darauf, dass SCGB 2A1 in den Basalzellen des Epithels der tubuloalveolären Drüsen der humanen Prostata exprimiert wird (Xiao, 2003). Bisher wurde jedoch noch kein sezerniertes Protein in den Basalzellen der Prostata mittels Immunfärbung nachgewiesen, so dass die Sekretion der typischen Prostataproteine ausschließlich den Luminalzellen zugeschrieben wird. Zusätzlich wurde SCGB 2A1 mittels Immunfluoreszenz in der gesunden adulten wie auch der fetalen humanen Prostata gefunden, darüberhinaus im Prostatakarzinom, nicht jedoch in den hyperplastischen Arealen einer BPH.

Ziel dieser Arbeit war es daher, das Vorhandensein von SCGB 2A1 in den Basalzellen mittels Doppelimmunfluoreszenz genauer zu untersuchen. Darüberhinaus sollte die Expression von SCGB 2A1 in der normalen adulten, der fetalen und der adenomatösen Prostata sowie dem Prostatakarzinom mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie evaluiert werden.

Es sollte damit geklärt werden, ob SCGB 2A1 tatsächlich in den Basalzellen der humanen Prostata exprimiert wird, und ob sich der Nachweis dieses Proteins als Marker zur Unterscheidung von Prostatakarzinom und BPH eignet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalien

Acrylamid 30 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich, Heidelberg
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Bacto-Tryptone	BD Bioscience, Sparks, USA
Bovines Serum Albumin	Invitrogen, Karlsruhe
Bromophenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Diaminobenzidin	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol	Roch, Mannheim
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	BD Bioscience, Sparks, USA
HEPES	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt

IPTG	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Bio-Rad, München
Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid Tabletten 1g	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

2.1.2. Geräte

Confocales Laserscanning Mikroskop TCS-SP2 AOBS	Leica, Bensheim
Elektronische Waage SPB50	Ohaus, Giessen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl-Zeiss, Jena
Geltrocknungsrahmen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heizblock DB-2A	Techne, Cambridge, UK
Hochgeschwindigkeitszentrifuge Sorvall RC5C	Thermo Electron Oberhausen
Inkubationsschüttler Certomat IS	B. Braun Biotech International
Mikrowelle	Samsung, Schwalbach
Mini-Zentrifuge Galaxy	VWR International
Mini-Rocker Schüttler MR-1	PEQLAB, Erlangen
Objekträger SuperFrost Plus	Langenbrinck & Emmendingen
Potter S Homogenisator	B. Braun, Melsungen
SDS Gel Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Semi-Dry-Elektroblotter	PEQULAB, Erlangen
Sicherheitswerkbank Klasse II S-1800	BDK, Sonnenbühl Genkingen
Slab Gel-Kammer für zwei Gele	von Keutz, Reiskirchen
Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro	Biochrom, Cambridge, UK
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Vertikales Mini-Elektrophoresesystem	PEQLAB, Erlangen

2.1.3. Verschiedenes

BenchMark Protein Größenmarker	Invitrogen, Heidelberg
Crystal Mount Mounting Medium	Sigma, Heidelberg
Coomassie-Brilliant-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim
ECL Western Blot Nachweissystem	GE Healthcare, München
Hybond ECL Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, München
Inkomplettes Freund´s Adjuvant	Sigma-Aldrich, Steinheim
Komplettes Freund´s Adjuvant	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein Assay Reagenz	Bio-Rad, München
Protein A Sepharose	GE Healthcare, München
Protein G Sepharose	GE Healthcare, München
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories Inc.USA
Vivaspin 15R Ultrafiltrationsröhrchen	Sartorius, Göttingen

2.1.4. Enzyme und Antikörper

Enzyme

Trypsin der Firma Roche wurde für die Antigendemaskierung vor immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen auf paraffineingebettetem Gewebe verwendet.

Präimmunserum

Ein spezifischer SCGB 2A1 Antikörper wurde, wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben, hergestellt. Vor Injektion des Kaninchens mit rekombinantem, gereinigtem SCGB 2A1 Protein wurde das Präimmunserum entnommen.

SCGB 2A1 Antiserum

Für die Durchführung der Versuche wurde freundlicherweise ein von Fei Xiao hergestelltes SCGB 2A1 Antiserum zur Verfügung gestellt (Xiao, 2003). Für die Herstellung eines neuen SCGB 2A1 Antiserums siehe Kapitel 2.2.3.

Primärantikörper

α -human-PSA, monoklonal, Maus	DAKO, Hamburg
α -human-Zytokeratin 34 β E12, monoklonal, Maus	DAKO, Hamburg

Sekundärantikörper

IgG, Peroxidase (Esel-anti-Kaninchen)	Dianova, Hamburg
IgG, Cy2 (Ziege-anti-Kaninchen)	Dianova, Hamburg
IgG, Cy2 (Ziege-anti-Maus)	Dianova, Hamburg

IgG, Cy3 (Esel-anti-Kaninchen)	Chemicon, Hampshire, UK
IgG, biotinyliert (Esel-anti-Kaninchen)	GE Healthcare, München
IgG (Esel-anti-Kaninchen)	ICN, Ohio, USA

2.1.5. Prostata Gewebe

Tissue Arrays mit Gefrierschnitten humaner Prostata wurden von Euroimmun, Hamburg, erworben.

Paraffinblöcke mit Prostatagewebe von gesunden Probanden, von Patienten mit diagnostizierter BPH und Prostatakarzinom, sowie fetales Prostatagewebe wurde freundlicherweise von Prof. Schulz aus dem Institut für Pathologie der Justus-Liebig Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom der Firma Jung AG, Heidelberg, in 5 μ m dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger übertragen und bei 37° über Nacht getrocknet.

2.1.6. Tränenflüssigkeit

Reflektorische Tränenflüssigkeit wurde durch Reizung der Augen mit Zwiebelsaft gewonnen und nach Austreten aus dem Auge mit einer sterilen Pipette abgenommen, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und bis zum Gebrauch bei 4° C gelagert.

2.2. Methoden

2.2.1. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um natives SCGB 2A1 Protein in humaner Tränenflüssigkeit nachzuweisen und es mit dem rekombinanten Protein aus *E. coli* zu vergleichen.

Die Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen Gelsystem durchgeführt, welches sich aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel zusammensetzt. Für die Mehrzahl der verwendeten Gele wurde ein 15%- oder 18%-iges Trenngel und ein 4%-iges Sammelgel verwendet. Die Proben wurden mit 2x SDS-Probenpuffer 1:1 verdünnt und für 5 min bei 100° C in einem Heizblock erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Nach Einspannen des Gels in die Elektrophorese-Kammer wurden beide Elektrodenreservoirs mit 1x SDS Elektrophoresepuffer befüllt und die Proben aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde anschließend bei 15 mA konstantem Strom durchgeführt, bis das Bromphenol Blau den Boden des Gels erreicht hatte. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung über Nacht gefärbt und anschließend zur Konservierung zwischen Zellophan in einem Gel-Trockenrahmen getrocknet.

2x SDS Probenpuffer (10 ml):

1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	1 ml
10% (w/v) SDS	4 ml
87% Glycerin (v/v)	5 ml

Kolloidale Coomassie Färbelösung:

10% (v/v) Phosphorsäure
10% (w/v) Ammoniumsulfat, wasserfrei
0,12% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G-250
20% (v/v) Methanol

Trenngel (15%ig, 10 ml):

1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10% (w/v) SDS	100 μ l
30% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	5 ml
Wasser	2,35 ml
10% (w/v) APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

Sammelgel (4%ig, 5 ml):

0,125 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
10% (w/v) SDS	50 μ l
30% Acrylamid- Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	0,65 ml
Wasser	3 ml
10% (w/v) APS	25 μ l
TEMED	5 μ l

SDS Elektrophoresepuffer (10x):

192 mM Glycin
25 mM Tris
0,1% (w/v) SDS

2.2.2. Expression von rekombinantem SCGB 2A1 in *E. coli*

2.2.2.1. Herstellung von kompetenten *E. coli* und Transformation

Es wurde rekombinantes SCGB 2A1 Protein hergestellt, um damit die Immunisierung von zwei Kaninchen durchzuführen (2.2.3.). Ziel war es somit einen polyklonalen Antikörper zu generieren. Weiterhin wurde das rekombinante Protein verwendet, um anschließend eine Affinitätsaufreinigung des hergestellten Antikörpers durchzuführen (2.2.4.3.).

Hierzu wurden 50 ml vorgewärmtes SOB Medium mit 0.5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3) im gleichen Medium beimpft und für ca. 3 Stunden bei 37° C geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht worden war. Nach Erreichen der gewünschten Bakteriendichte wurde die Kultur für 20 min auf Eis gestellt, um das Wachstum zu stoppen. Die Kultur wurde anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und zentrifugiert (1,200 x g, 12 min bei 4°C). Der Überstand wurde dekantiert

und das Pellet in 10 ml TFB Puffer resuspendiert. Nach weiteren 10 min wurde die Zentrifugation wiederholt und das Pellet in 3,9 ml TFB Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 140 µl DMSO und 5 min Inkubation auf Eis wurden 140 µl 1M DTT hinzugefügt und die Inkubation für weitere 10 min fortgesetzt. Anschließend erfolgte die erneute Zugabe von 140 µl DMSO, gefolgt von weiteren 5 min Inkubation.

Zu 200 µl der kompetenten Zellen wurden 2 ng Plasmid pRSET-B-SCGB 2A1 (siehe Abbildung 2) hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Aliquot für exakt 45 Sekunden in einen 42°C warmen Heizblock gestellt. Die transformierten Zellen wurden daraufhin für 2 min auf Eis wieder abgekühlt, mit 800 µl erwärmtem SOC Medium versetzt und für 15 min bei 37°C geschüttelt, um eine Erholung der Bakterien und Etablierung der Antibiotikaresistenz zu ermöglichen.

200 µl der Zellsuspension wurden dann auf einer LB Agar-Platte mit Ampicillin (50 µg/ml) verteilt. Nach Absorption der gesamten Flüssigkeit wurden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

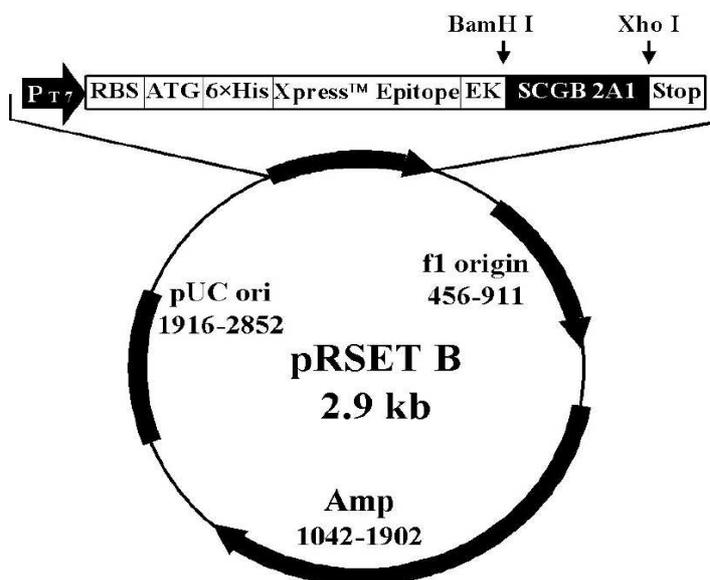


Abb. 2. Schematisches Diagramm von pRSET-B/SCGB 2A1

Die cDNA für SCGB 2A1 wurde zwischen die Bam HI- und Xho I-Schnittstellen von pRSET-B gekloniert. Die kodierende SCGB 2A1 Sequenz beginnt mit GGC für Glycin 21. Das Protein wurde als ein 12.4 kD Fusionsprotein exprimiert, das einen Hexahistidin Tag zur Aufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatografie enthält. Die Abbildung wurde aus (Xiao, 2003, Abb. 3.2-C) entnommen.

LB Medium: 1% Baktotrypton (w/v)
0,5% Hefeextrakt (w/v)
1% NaCl (w/v)

SOB Medium: 2% Baktotrypton (v/v)
0,5% Hefeextrakt (w/v)
10 mM NaCl
2,5 mM KCl

Nach Autoklavieren wurden dem SOB-Medium 5 ml einer 2 M Mg^{2+} - Stammlösung zugesetzt.

TFB Puffer: 10 mM K-MES (pH 6,2)
45 mM $MnCl_2 \cdot 2H_2O$
100 mM KCl
10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
3 mM $[Co(NH_3)_6]Cl_3$

SOC Medium: SOB Medium 980 ml
1 M Glucoselösung 20 ml

2.2.2.2. Expression von rekombinantem SCGB 2A1 und Aufreinigung mittels

Ni-NTA-Agarose Affinitätschromatografie

Zwei Erlenmeyerkolben mit je 500 ml vorgewärmtem SOB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden mit je 1 ml einer Übernachtskultur von pRSET-B/SCGB2A1 in *E. coli* BL21(DE3) im gleichen Medium beimpft und bei 37° C für ca. 3 Stunden bei 37° geschüttelt. Als eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht worden war, erfolgte die Induktion von SCGB2A1 mit 0,5 mM IPTG für 3 h. Sowohl vor Induktion als auch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion (1, 2 und 3 Stunden) wurden 1 ml Proben zur Überprüfung der Expression entnommen. Die Bakterien in diesen Proben wurden 1 min bei Raumtemperatur und max. Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 1x SDS-Auftragspuffer (Seite 24) resuspendiert. Diese Proben wurden gemeinsam mit den Proben der Eluatfraktionen (s.u.) per SDS-PAGE analysiert.

Anschließend wurden die Bakterien durch 10 min Zentrifugation (4,000x g bei 4 C°) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, und die geernteten Zellen aus einer präparativen Kultur (500 ml) entnommen und für 15 min auf Eis gestellt und in Puffer B für 1 h bei RT auf einem Schüttler lysiert. Pro Gramm Bakterienniederschlag wurden 5 ml Puffer B verwendet. Zelldebris wurde durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 10,000x g, RT), und es wurden Proben von Pellet und Überstand genommen. Der restliche Überstand wurde mit 1 ml Ni-NTA Agarose je 4 ml Lysat versetzt und für 1 h auf einem Schüttler bei RT gemischt. Die Lysat-Ni-NTA Agarose-Mischung wurde anschließend in eine Bio-Rad Polyrep-Säule gefüllt und der Durchlauf aufgefangen. Die Säule wurde zweimal mit Puffer C gewaschen (4 ml Puffer pro ml Ni-NTA Agarose), und das rekombinante Protein wurde mit vier 0,5 ml Fraktionen Puffer D und vier 0,5 ml Fraktionen Puffer E eluiert.

Die Analyse der Eluatfraktionen (und der oben beschriebenen Expressionsproben) auf einem 18%igen SDS-Polyacrylamidgel ergab, dass der größte Teil des SCGB 2A1 Proteins durch Puffer E bei pH 4,5 eluiert wurde. Ein Bradford Proteinassay wurde durchgeführt, um die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen zu bestimmen. SCGB 2A1 positive Fraktionen wurden vereinigt, und zur Renaturierung des Proteins wurde der Harnstoff durch Dialyse gegen 500 ml Dialysepuffer für 2 h entfernt. Der Dialysepuffer wurde danach erneuert und die Dialyse für weitere 3 h fortgesetzt. Die

Dialyse wurde bei 4 °C durchgeführt, und präzipitierte fehlgefaltete Proteine wurden durch Zentrifugation (5 min, 1,200x g, 4° C) entfernt. Nach Messung der Proteinkonzentration wurde die Proteinlösung in zwei 0,5 ml und vier 0,25 ml Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

SDS-Proben-Puffer (2x):

100 mM Tris-HCl pH 6,8
4 % (w/v) SDS
20% (v/v) Glycerin
5% (v/v) 2-Mercaptoethanol
0,001 % Bromophenolblau

Puffer B/ Lysepuffer:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.

Puffer C/ Waschpuffer:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,3 eingestellt.

Puffer D/ Elutionspuffer:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
Der pH-Wert wurde mit HCl auf 5,9 eingestellt.

Puffer E/ Elutionspuffer:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
Der pH-Wert wurde mit HCl auf 4,5 eingestellt.

Dialysepuffer:

10 mM HEPES
50 mM KCl
8,5% Glycerol
1 mM PMSF

2.2.3. Herstellung eines SCGB 2A1 Antiserums

Es wurde ein SCGB 2A1 Antiserum hergestellt, um hiermit anschließend SCGB 2A1 mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie im Prostatagewebe nachweisen zu können. Die Immunisierung von zwei Neuseeland Kaninchen wurde wie beschrieben durchgeführt (Xiao 2003). Sie erfolgte im Jahr 2004 an der Universität Marburg. Vorab war 1994 eine Genehmigung zur Verwendung der zwei Kaninchen durch Prof. Seitz beim Regierungspräsidium Giessen beantragt worden. Die Genehmigung wurde mit einer Gültigkeit bis 2008 erteilt. Vor der ersten Injektion von Antigen wurden 10 ml Blut zur Gewinnung des Präimmunserums abgenommen. Für die Immunisierung wurden 0,5 mg gereinigtes SCGB 2A1 Protein (siehe 2.2.2.) je Tier eingesetzt. Fünf Wochen später erfolgte eine erste Boosterung mit SCGB 2A1 (0,25 mg Protein/Tier) und drei Wochen danach eine erneute Boosterung mit der gleichen Proteinmenge. Insgesamt zehn Wochen nach Beginn der Immunisierung wurde eine erste Blutprobe entnommen. Nach Gerinnung und Zentrifugation des Blutes wurde das Serum gewonnen und mittels Western Blot (siehe 2.2.5.) getestet. Die beiden Kaninchen wurden daraufhin geopfert, das gesamte Blut wurde gesammelt und für die Präparation der zwei Antiseren wie beschrieben verwendet. Vor der Lagerung in 1 ml Aliquots bei -20°C wurde den Seren 0,02 % Natriumazid zugesetzt.

2.2.4. Affinitätsreinigung des SCGB 2A1 Antiserums

2.2.4.1. Aufreinigung mittels Antigen, das auf einer Nitrocellulosemembran fixiert ist

Eine Affinitätsreinigung wurde durchgeführt, um die Bindungsspezifität des Antiserums zu verbessern. 80 μl Tränenflüssigkeit (siehe 2.2.6.), als Quelle für SCGB 2A1, wurde mit einem 15%igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Marker wurden 5 μg rekombinantes SCGB 2A1 aufgetragen. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mit einem Semi-Dry Blotting System (siehe 2.2.5.) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Blot wurde für 1 h bei 100 mA durchgeführt.

Nach dem Blot wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt und die SCGB 2A1 Proteinbande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das Membranstück wurde in

mehrere kleine Stücke zerschnitten, die in ein Reaktionsgefäß gegeben wurden. Anschließend wurden die Membranstücke für 10 min mit PBS gewaschen. Die Absättigung freier Proteinbindungsstellen erfolgte mit 5% (w/v) Magermilchpulver gelöst in PBS für 30 min. Anschließend folgten drei Waschschrte á 5 min mit PBS. Nach dem Waschen wurden die Membranstücke mit 1 ml SCGB 2A1-Antiserum 1:20 in PBS verdünnt für 1,5 h bei 30° C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Membranstücke erneut dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Um die gebundenen Immunglobuline von der Membran zu lösen, wurden die Membranstücke in 100 µl PBS für 30 min bei 56°C in einem Wasserbad geschüttelt. Der Überstand mit dem gereinigten Antikörper wurde schnell von den Membranstücken abpipettiert. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt, sodass insgesamt 400 µl affinitätsgereinigte Antikörperlösung gewonnen werden konnten. 0,02% Natriumazid wurden der Lösung hinzugefügt, und der affinitätsgereinigte Antikörper wurde mit einer Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.2.6.) getestet.

Ponceau S Färbelösung:

Ponceau S 0,2% (w/v)
Trichloressigsäure 30% (w/v)
Sulfosalicylsäure 30% (w/v)

PBS:

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
12 mM H₂PO₄

2.2.4.2. Aufreinigung mittels Protein A und G Sepharose

Zu zwei Reaktionsgefäßen, in denen sich 50 µl SCGB 2A1 Antiserum befanden, wurden je 5 µl 1M Tris-HCl (pH 8,0) gegeben, um den pH Wert anzupassen. Je 50 µl Protein G Sepharose und Protein A Sepharose Beads wurden mit je 500 µl 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen, SCGB 2A1 Antiseren hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (5 min bei RT), und der Überstand wurde verworfen. Die Sepharose Beads mit den gebundenen SCGB 2A1

Antikörpern wurden mit je 500 µl 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen, gefolgt von einem zweiten Waschschriff mit 500 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0). Mit 100 µl 50 mM Glycin (pH 3,0) wurden dann die gebundenen Antikörper eluiert. Um den pH-Wert wieder in einen neutralen Bereich zurückzuführen, wurden 10µl 1 M Tris HCl (pH 8,0) zugegeben. Die Proteinkonzentration wurde durch einen Bradford Protein Assay bestimmt.

2.2.4.3. Aufreinigung mittels rekombinatem SCGB 2A1 Protein

Rekombinantes SCGB 2A1 wurde, wie in Kapitel 2.2.2.2. beschrieben, hergestellt. Im Anschluß an die Induktion mit IPTG wurde das Bakterienpellet gewogen, in Puffer B (5 ml Puffer/mg Pellet) lysiert und auf einem Schüttler für 1 h bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (1,200 x bei RT) wurde von Überstand und Pellet je eine Probe genommen, um damit in einer SDS-PAGE Analyse die Proteininduktion zu überprüfen (siehe 2.2.1.). Danach wurden 9.5 ml Überstand mit 2.4 ml Ni-NTA-Agarose gemischt, für 1h bei RT inkubiert, bevor die Lösung in eine Bio-Rad Polyprep-Säule gefüllt wurde. Wie in Kapitel 2.2.2.2. beschrieben, wurde die Säule zweimal mit Puffer C und Puffer D gewaschen. Die Säule wurde mit 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) äquilibriert. Folgend wurde 1 ml SCGB 2A1 Antiserum auf die Säule mit dem gebundenen rekombinanten SCGB 2A1 Protein gegeben und für 1 h inkubiert. Anschließend folgten fünf Waschvorgänge mit je 2.5 ml Äquilibrierungspuffer und fünf Waschungen mit je 2,5 ml Waschluffer (2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4), wovon 2,5 ml dem Säulenvolumen entsprachen. Für die Elution wurde ein halbes Säulenvolumen (1,25 ml) 4 M MgCl₂ Lösung hinzugegeben und der Durchfluss gestoppt, damit die Lösung für 15 min in der Säule einwirken kann. Anschließend wurde der Durchfluss gesammelt und gebundene Antikörper erneut zweimal mit 500 µl 4M MgCl₂ eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und für eine Stunde gegen *A. dest* sowie über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford Proteinassay gemessen.

Puffer B/ Lysepuffer:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.

Puffer C/ Waschpuffer:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,3 eingestellt.

Puffer D/ Elutionspuffer:

100 mM NaH₂PO₄
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
Der pH-Wert wurde mit HCl auf 5,9 eingestellt.

2.2.5. Western Blot

Um die Bindungsspezifitäten der unterschiedlich aufgereinigten SCGB 2A1 Antisera (siehe 2.2.4.) zu vergleichen, wurden diese in einem Western Blot getestet. Tränenflüssigkeit (siehe 2.1.6.) enthält von Natur aus große Mengen an SCGB 2A1 und wurde daher für den Western Blot als Positivkontrolle und physiologische Testprobe gleichermaßen verwendet. Dazu wurden gleiche Mengen von Tränenflüssigkeit mit dem gleichen Volumen 1x SDS Probenpuffer versetzt. Die in einem 15%igen SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-Dry-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde der Blot wie folgt zusammengesetzt:

Kathode

- vier Lagen Filterpapier, in Kathodenpuffer getränkt
- Gel, in Kathodenpuffer getränkt
- Nitrocellulosemembran, in Anodenpuffer getränkt
- vier Lagen Filterpapier, in Anodenpuffer getränkt
- vier Lagen Filterpapier, in konzentriertem Anodenpuffer getränkt

Anode

Im Anschluss wurde bei 1 mA pro cm² Gel für 1 h geblottet. Der Erfolg des Proteintransfers wurde mit einer Ponceau S Färbung geprüft. Hierzu wurde die Membran für 10 min in Ponceaus S Lösung auf einem Schüttler inkubiert. Die

Ponceau S Lösung wurde anschließend durch Waschen mit PBS wieder von der Membran entfernt. Folgend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei RT mit 5% (w/v) Milchpulver in PBS-Tween auf einem Schüttler inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Das als Erstantikörper verwendete und nicht aufgereinigte SCGB 2A1 Antiserum wurde 1:1000 in 5% (w/v) Milchpulver in PBS-Tween über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran

für 5 min mit PBS-Tween gewaschen und mit dem anti-Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (1:10,000 in PBS-Tween) für 1h bei RT inkubiert. Zum Nachweis des Zweitantikörpers wurde das Western Blot Detection Reagent (ECL plus) nach den Herstellerangaben verwendet. Die Membran wurde für 60 sec mit dem Reagenz inkubiert, in Plastikfolie verpackt und für 1-10 min einem Röntgenfilm ausgesetzt, der anschließend per Hand entwickelt wurde.

PBS-Tween: PBS
0,1 % Tween 20 (v/v)

Kathodenpuffer:
40 mM 6-Aminohexansäure
25 mM Tris-HCl (pH 9,4)
20% Methanol (v/v)

Anodenpuffer: 30 mM Tris-HCl (pH 10,4)
20% Methanol

Konzentrierter Anodenpuffer:
300 mM Tris-HCl (pH 10,4)
20% Methanol (v/v)

Ponceau S Färbelösung:
Ponceau S 0,2% (w/v)
Trichloressigsäure 30% (w/v)
Sulfosalicylsäure 30% (w/v)

2.2.6. Immunfluoreszenz

2.2.6.1. Antigendemaskierung

Um die Detektion von Antigenen im paraffinfixierten Prostatagewebe zu ermöglichen, wurde eine Antigendemaskierung durchgeführt. Dazu wurden paraffinfixierte Prostataschnitte mit 0,2% Trypsin in PBS für 20 min bei RT inkubiert. Es wurden unterschiedlich lange Inkubationszeiten getestet und ein Optimum bei 20 min gefunden. Ebenso wurden einige Schnitte durch Mikrowellenerhitzung vorbereitet. Hierzu wurden die Schnitte dreimal je 5 min in einem 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) erhitzt.

2.2.6.2. Doppel-Immunfluoreszenz zum Nachweis von SCGB 2A1 in den Basalzellen der humanen Prostata

Um die Expression von SCGB 2A1 in den Basalzellen der humanen Prostata zu demonstrieren, wurde eine Doppel-Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden Prostataschnitte von gesundem adulten Prostatagewebe verwendet. Diese wurden cryofixiert von Euroimmun (Lübeck) erworben. Das Gewebe war bereits vom Hersteller fixiert und geblockt. Daher konnten die Schnitte umgehend mit dem SCGB 2A1 Antiserum (1:2.000 in PBS verdünnt) und dem für die Färbung der Basalzellen verwendeten monoklonalen 34 β E12 Zytokeratin Antikörper (1:50 in PBS verdünnt) inkubiert werden. Die Gewebeschnitte wurden zeitgleich mit beiden Erstantikörpern für zwei Stunden inkubiert. Nach einer gründlichen Waschung mit PBS-Tween wurden die Schnitte für 45 min mit einer Mischung aus den beiden Sekundärantikörpern inkubiert. Als Zweitantikörper wurden ein Cy2-konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper (1:100 in PBS) und ein Cy3-konjugierter Esel anti-Kaninchen Antikörper (1:900 in PBS) verwendet. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Objektträger mit DAPI Mounting Medium (Vectashield) eingedeckelt. Für die Negativkontrolle wurde Präimmunserum (siehe 2.1.4.) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Die lichtgeschützt gelagerten Objektträger wurden anschließend mit einem Confocalen Laserscanning Mikroskop (TCS-SP2 AOBS, Leica, Bensheim, Germany) betrachtet und photographisch dokumentiert.

2.2.6.3. Doppel-Immunfluoreszenz zum Nachweis von SCGB 2A1 und PSA

Der simultane Nachweis von SCGB 2A1 und PSA erfolgte auf paraffinfixiertem Prostatagewebe. Um das Paraffin zu entfernen, wurden die Schnitte dreimal für 5 min in Xylol gewaschen, dann weiter für je 5 min in absteigender Konzentration in 100% Ethanol, 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol, und zuletzt in 50% Ethanol. Danach wurden die Schnitte für 3 min mit A. dest. gewaschen und abschließend für 45 min mit 5% (w/v) BSA in PBS inkubiert. Da durch eine Antigendemaskierung mit Trypsin die besten Ergebnisse in der Immunfluoreszenz auf paraffineingebettetem Gewebe erzielt werden konnten, wurden die Gewebeschnitte für 15 min mit 0,2% Trypsin verdaut und anschließend mit PBS gewaschen. Um einen simultanen Nachweis von SCGB 2A1 und PSA im Prostataepithel zu erzielen, wurde ein Maus anti-Mensch PSA Antikörper (1:25 in PBS) und das Kaninchen SCGB 2A1 Antiserum (1:5.000 in PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Eine Negativkontrolle erfolgte unter Verwendung von Präimmunserum. Die Erstantikörper wurden durch fünfmaliges Waschen mit PBS entfernt, bevor erneut mit den in 2.2.6.2. aufgeführten Zweitantikörpern für 60 min inkubiert wurde.

Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit DAPI Mounting Medium (Vectashield) eingedeckelt. Die lichtgeschützt gelagerten Objektträger wurden anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss (Axioplan2) betrachtet und photographisch dokumentiert.

2.2.7. Immunhistochemischer Nachweis von SCGB 2A1 mit DAB

Um SCGB 2A1 im Prostataepithel immunhistochemisch nachzuweisen, wurden paraffineingebettete Prostataschnitte von BPH Patienten verwendet. Die Paraffinschnitte wurden wie in 2.2.6.1 beschrieben vorbereitet. Nach einer Waschung mit A. dest. wurden die Schnitte je dreimal für 5 min in Zitratpuffer (10 mM Zitronensäure, pH 6) in einer Mikrowelle bei 800 W gekocht. Im Anschluß daran wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und die endogene Peroxidaseaktivität durch eine 30 min Inkubation mit 3% H₂O₂ (v/v) geblockt. Dieser Schritt wurde im Dunkeln durchgeführt. Die Schnitte wurden erneut mit PBS gewaschen und unspezifische Proteinbindungsstellen durch Inkubation über 45 min mit 5% BSA in PBS (w/v)

blockiert. Anschließend wurde über Nacht mit dem SCGB 2A1 Antiserum (1:250 in PBS) bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Präimmunserum verwendet. Am folgenden Tag wurden die Gewebeschnitte drei Mal gründlich mit PBS gewaschen und mit einem Biotin-konjugierten anti-Kaninchen-IgG (1:200) für 1 h bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit Peroxidase gekoppeltem Streptavidin (1:1,100 in PBS) für 1 h behandelt. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurde die Färbung mit DAB unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Die Färbung wurde durch Waschung mit PBS gestoppt, sobald eine intensive Braunfärbung des Prostataepithels unter dem Mikroskop gesehen wurde. Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen und mit Crystal Mount Mounting Medium eingedeckelt. Das Ergebnis wurde unter einem Leica Mikroskop (DMLB) betrachtet und photographisch dokumentiert.

3. Ergebnisse

3.1. Spezifität und Herkunft des verwendeten SCGB 2A1 Antiserums

Um SCGB 2A1 in den Basalzellen des Prostataepithels, sowie in den hyperplastischen Drüsen bei BPH nachzuweisen, wurden immunhistologische Färbungen mit einem SCGB 2A1 spezifischen Antiserum geplant.

Für die Durchführung der Untersuchungen in dieser Arbeit wurde ein von Fei Xiao erzeugtes polyklonales Kaninchen SCGB 2A1 Antiserum zur Verfügung gestellt

(Xiao, 2005). Da sich unspezifische Bindungen des SCGB 2A1 Antikörpers im Prostataepithel zeigten, wurde versucht das Antiserum zu reinigen. Hierdurch sollte die Spezifität verbessert werden. Des Weiteren wurde ein neues SCGB 2A1 Antiserum hergestellt. In diesem Kapitel werden daher zunächst die Vorversuche mit den SCGB 2A1 Antiseren und die damit verbundenen Versuche zur Verbesserung der Spezifität beschrieben. Schlussendlich konnte kein Antiserum mit höherer Spezifität erzeugt werden, ebenso erbrachten auch die Affinitätsreinigungen keine Verbesserung, weshalb alle Versuche zuletzt mit dem von Xiao generierten Antiserum auf Gefrierschnitten von Prostatagewebe durchgeführt wurden.

Bei der Verwendung des SCGB 2A1 Antiserums in Immunfluoreszenzfärbungen auf paraffineingebettetem Prostatagewebe, wurden die Schnitte zunächst in der Mikrowelle erhitzt, um dadurch eine Demaskierung der Epitope zu erzielen. Allerdings zeigte sich hierauf eine unerwartete Bindung sowohl der Zellkerne im Drüsenepithel (Abb. 3. A blauer Pfeil), als auch der glatten Muskelzellen im Stroma (siehe Abb. 3. A weißer Pfeil). Die Drüsenepithelzellen zeigten eine deutliche Färbung der Zellkerne (Abb. 3. A blauer Pfeil), welche im Falle eines sezernierten Proteins eine unspezifische Bindung vermuten lässt, da ein sezerniertes Protein wäre im Cytoplasma der Zellen zu erwarten. Erfolgt die Demaskierung der Epitope dagegen mit Hilfe einer Trypsinverdauung, werden die Kerne der Epithelzellen nicht mehr angefärbt, und die Hintergrundfärbung ist reduziert (Abb. 3. B). Bei Paraffinschnitten wurde daher folgend immer eine Trypsinbehandlung durchgeführt.

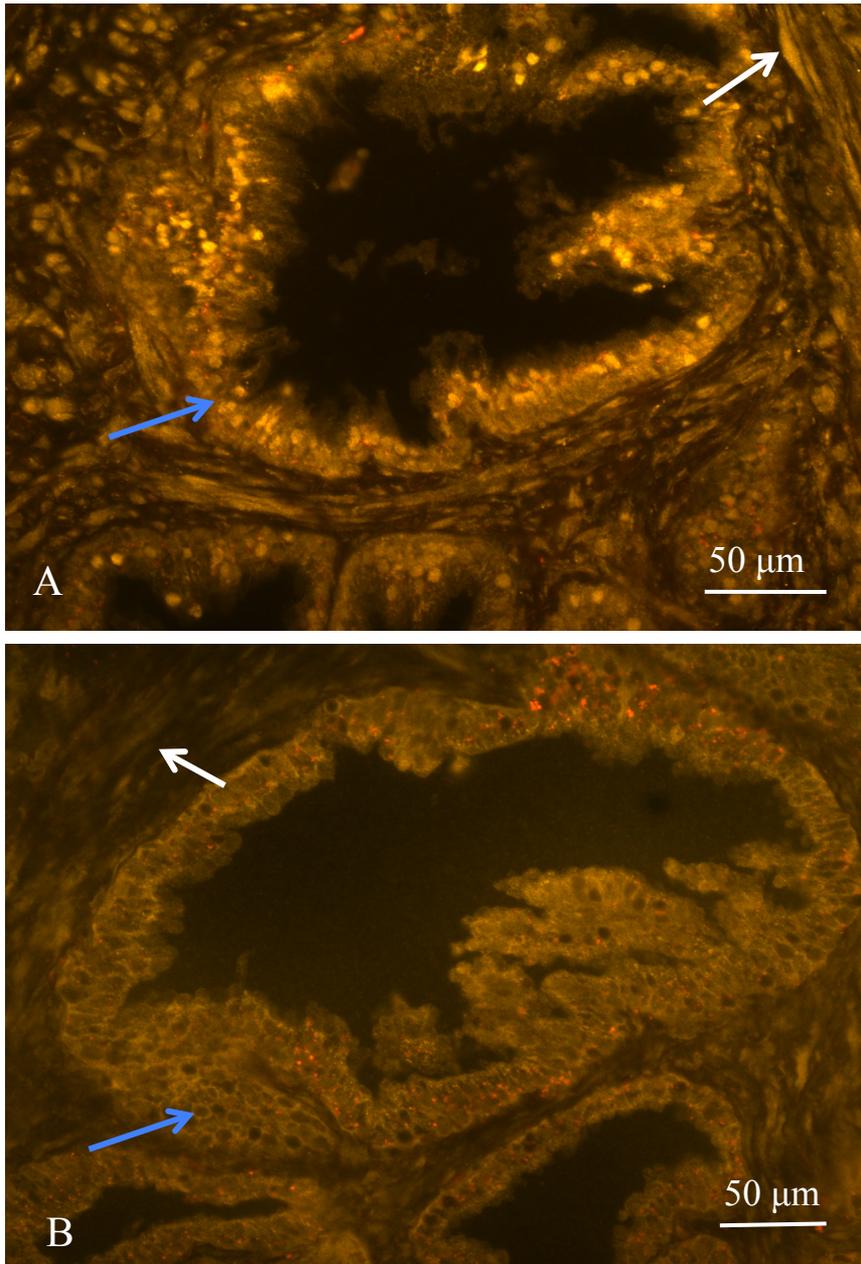


Abb. 3. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung an paraffineingebettetem normalen Prostatagewebe

Paraffineingebettetes Prostatagewebe gesunder Probanden wurden mit dem SCGB 2A1 Antiserum inkubiert, gefolgt von einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper.

A. Antigendemaskierung durch Erhitzen in der Mikrowelle. Weißer Pfeil: Glatte Muskelzellen, Blauer Pfeil: der Zellkern einer Drüsenepithelzelle zeigt intensive Färbung.

B. Antigendemaskierung mit Trypsin. Weißer Pfeil: Glatte Muskelzellen. Blauer Pfeil: die Kerne der Drüsenepithelzellen werden nicht angefärbt und erscheinen dunkel.

Um die unspezifischen Bindungen des SCGB 2A1 Antiserums (von F. Xiao) in der Immunfluoreszenz zu reduzieren wurden verschiedene Affinitätsreinigungen

durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.4). Die aufgereinigten Antiseren wurden in einem vergleichenden Western Blot aufgetragen (siehe Abb. 5.). Da SCGB 2A1 in einem Gesamt-Zelllysat aus Prostatagewebe im Western Blot nicht nachweisbar war (nicht gezeigt), wurden Immunoblots zur Überprüfung der Spezifität der SCGB 2A1 Antiseren mit Tränenflüssigkeit durchgeführt. Tränenflüssigkeit enthält große Mengen SCGB 2A1 und ist leicht zu gewinnen (Lehrer et al., 1998).

Zur Herstellung eines weiteren SCGB 2A1 Antiserums wurde zunächst mit einem Histidin-Tag versehenes Protein in *E. coli* mit dem Expressionsvector pRSET-B exprimiert. Abbildung 4 zeigt, dass drei Stunden nach Induktion mit IPTG signifikante Mengen SCGB 2A1 in den Bakterien hergestellt wurden. His-SCGB 2A1 wurde in einer 500 ml Kultur exprimiert und in denaturierter Form über eine Ni-NTA-Agarose Säule aufgereinigt. Die Hauptelutionsfraktionen E1 und E2 wurden vereinigt und das Protein anschließend durch Dialyse renaturiert (Spur D, Abb. 4.).

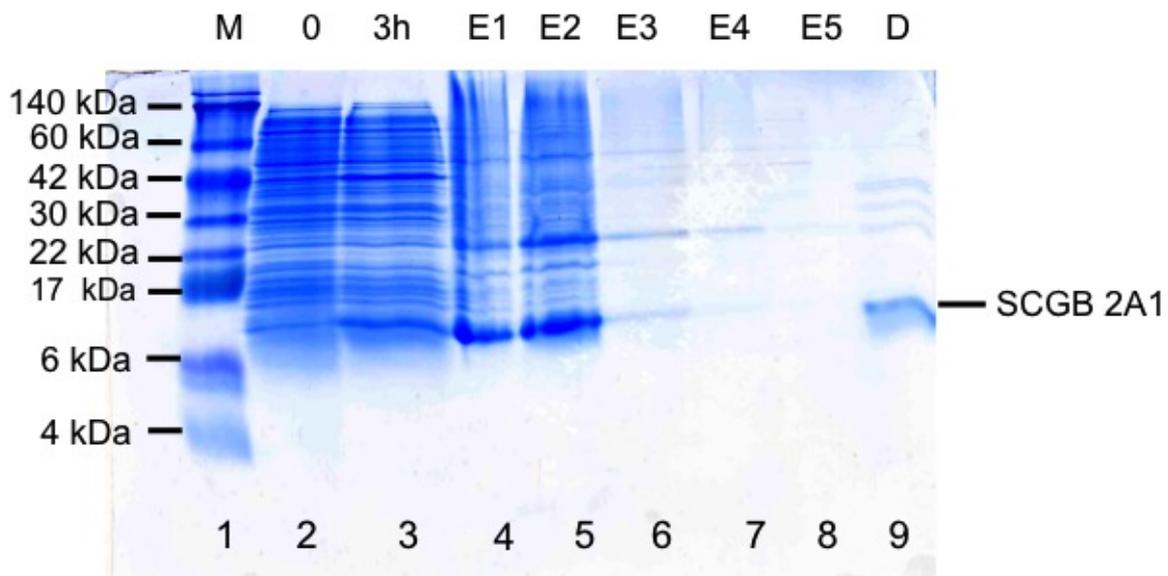


Abb. 4. Expression von SCGB 2A1 in *E. coli*.

His-SCGB 2A1 wurde mit IPTG für 3 Stunden induziert (Spur 3) und mittels Ni-NTA Agarose Chromatographie aufgereinigt. Elutionsfraktionen E1 und E2 wurden vereinigt und SCGB2A1 wurde durch Dialyse renaturiert (D). Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt (siehe Kapitel 2.2.1.).

Das gereinigte Protein wurde zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet. Es wurde von beiden Kaninchen Antiserum durch Zentrifugation des geronnenen Blutes gewonnen. Nach Zentrifugation wurde das Serum abpipettiert. Das Serum von Kaninchen 1 zeigte bereits bei Austestung in der Immunfluoreszenz keine Bindung und wurde daher nicht weiter verwendet. Von Kaninchen 2 konnte das Serum zwar für die Immunfluoreszenz verwendet werden, zeigte jedoch noch stärkere Hintergrundfärbung als das SCGB 2A1 Antiserum (F. Xiao), welches bisher verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden das SCGB 2A1 Antiserum (F. Xiao), die aufgereinigten Fraktionen, sowie das neu generierte Antiserum (Kaninchen 2) mittels Western Blot-Analyse verglichen (Abb. 5).

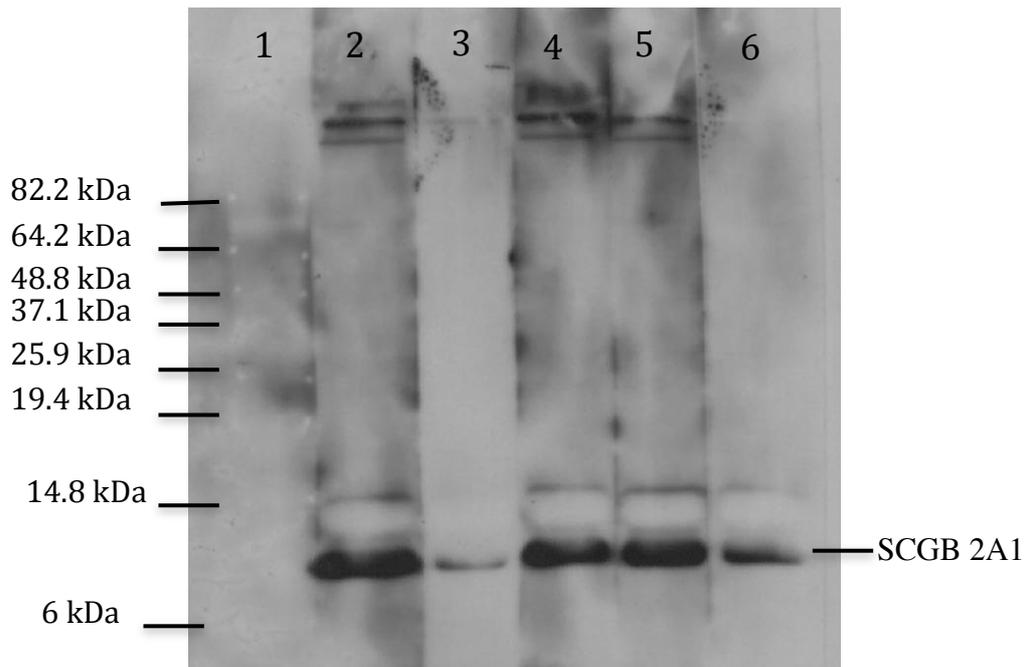


Abb. 5. Test der SCGB 2A1 Antiseren im Western Blot.

3 µl Tränenflüssigkeit wurden je Spur über ein 18%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den zu vergleichenden Antiseren inkubiert.

Spur 1: BenchMark Proteinmarker

Spur 2: SCGB 2A1 Antiserum (F. Xiao) vor Aufreinigung, Verdünnung 1:1000.

Spur 3: Antiserum von Kaninchen 2, Verdünnung 1:1000.

Spur 4: SCGB 2A1 Antiserum (F. Xiao) nach Aufreinigung mit Protein A Sepharose, Verdünnung 1:100.

Spur 5: SCGB 2A1 Antiserum (F. Xiao) nach Aufreinigung mit Protein G Sepharose, Verdünnung 1:100.

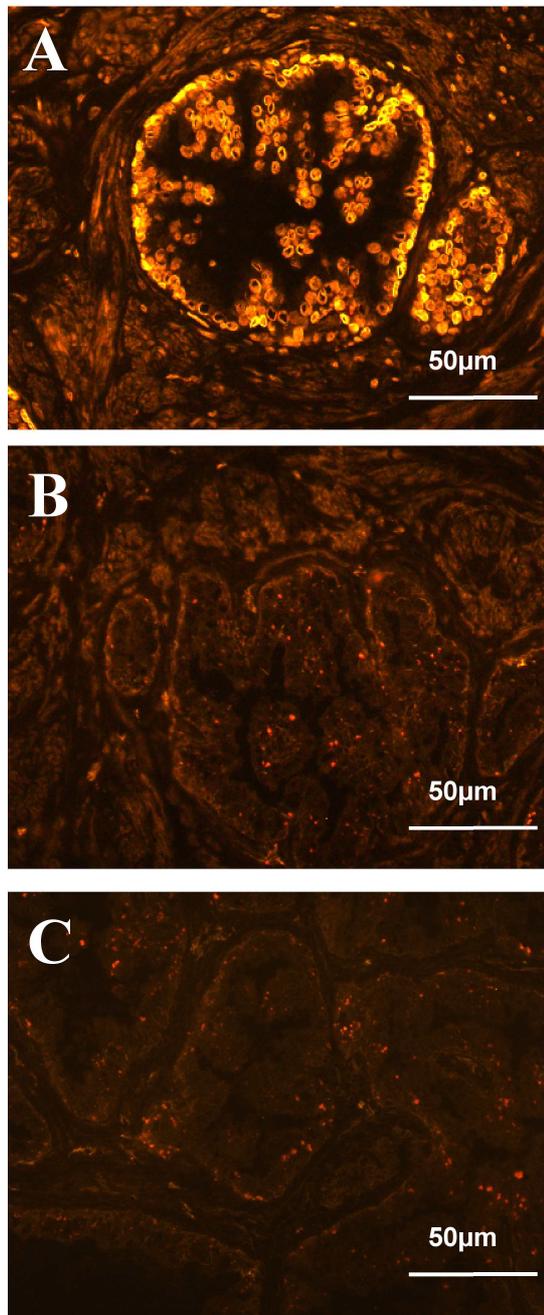
Spur 6: SCGB 2A1 Antiserum (F. Xiao) nach Aufreinigung mit rekombinatem SCGB 2A Protein, Verdünnung 1:100.

Im Western Blot zeigte das neu hergestellte Antiserum eine viel geringere Sensitivität aufwies als das bis dahin verwendete (F. Xiao), so daß letzteres weiterhin Verwendung fand. Eine Reinigung des Antiserums über Protein A oder G Sepharose brachte keine Vorteile, wogegen die Aufreinigung über Bindung an das Antigen SCGB 2A1 die Spezifität zu verbessern schien.

Darüberhinaus zeigte sich, dass das SCGB 2A1 Antiserum auf Prostatagefrierschnitten deutlich spezifischer bindet als bei Verwendung auf paraffineingebettetem Prostatagewebe. Bei der Antigendemaskierung der Paraffinschnitte war die

Trypsinverdauung einer Mikrowellenbehandlung vorzuziehen.

Abschließend wurde die Spezifität des SCGB 2A1 Antiserums mit Hilfe eines Kompetitionsversuches in der Immunfluoreszenz überprüft. Dazu wurde ein Gewebe-Array mit drei Prostatagefrierschnitten verwendet. Der erste Schnitt wurde nur mit SCGB 2A1 Antiserum als Erstantikörper behandelt, während die beiden übrigen mit einer Mischung aus SCGB 2A1 Antiserum und steigenden Konzentrationen SCGB 2A1 Antigen inkubiert wurden. Dabei zeigte sich, dass das Antiserum sein Antigen spezifisch im Prostataepithel erkennt, da rekombinantes SCGB 2A1 Antigen effektiv mit dem Gewebeanigen kompetiert (siehe Abb. 6.).



**Abb. 6. Immunfluoreszenz: SCGB 2A1 Immunreaktivität in der Prostata und
Kompetition mit Antigen**

A, SCGB 2A1 Antiserum (1:1500)

B, SCGB 2A1 Antiserum (1:1500) gemischt mit 1µl rekombinatem SCGB 2A1 Protein verdünnt in 100 µl PBS.

C, SCGB 2A1 Antiserum (1:1500) gemischt mit 1µl rekombinatem SCGB 2A1 Protein verdünnt in 50 µl PBS.

3.2. Expression von SCGB 2A1 in Prostatazellen

Innerhalb des Prostataepithels können drei verschiedene Zelltypen unterschieden werden. Luminalzellen stellen den größten Anteil dar, gefolgt von den Basalzellen, welche eine Reihe zwischen der Basalmembran und den Luminalzellen bilden. Zusätzlich treten vereinzelt neuroendokrine Zellen im Prostataepithel auf.

Um SCGB 2A1 in den unterschiedlichen Zellen des Prostataepithels nachweisen zu können, wurde eine Doppelimmunfluoreszenz durchgeführt. Vornehmlich war der Nachweis von SCGB 2A1 in den prostatistischen Basalzellen von Interesse, da diese als putative Stammzellen gelten.

Dazu wurden die Luminalzellen mittels PSA-Antikörper spezifisch markiert. Für die Basalzellen wurde ein Cytokeratin 34BE12 Antikörper verwendet. Die Durchführung der Doppelimmunfluoreszenz wurde allerdings durch die oben genannten unspezifischen Bindungen des SCGB 2A1 Antiserums erschwert. Die Immunfluoreszenz mit dem SCGB 2A1 Antiserum in Kombination mit dem basalzellspezifischen Cytokeratin konnte auf Gefrierschnitten humaner Prostata durchgeführt werden (Abb. 7 und 8). Die Doppelimmunfluoreszenz mit dem SCGB 2A1 Antiserum und dem PSA Antikörper musste dagegen auf paraffineingebettetem Prostatagewebe erfolgen, da der PSA Antikörper (Firma DAKO) nicht auf Gefrierschnitten binden kann (Abb. 9).

Die Doppelimmunfluoreszenz zeigte deutlich, dass SCGB 2A1 sowohl in den Luminalzellen, als auch in den Basalzellen vorhanden ist (Abb. 7), was sich am besten in einer stärkeren Vergrößerung der Aufnahme nachvollziehen lässt (Abb. 8). Diese Zellen lassen sich anhand des Basalzellcytokeratins eindeutig als Basalzellen identifizieren. Hier ist auch zu erkennen, dass einige Basalzellen weniger Reaktion für SCGB 2A1 zeigen als andere (Abb. 8 weißer Pfeil).

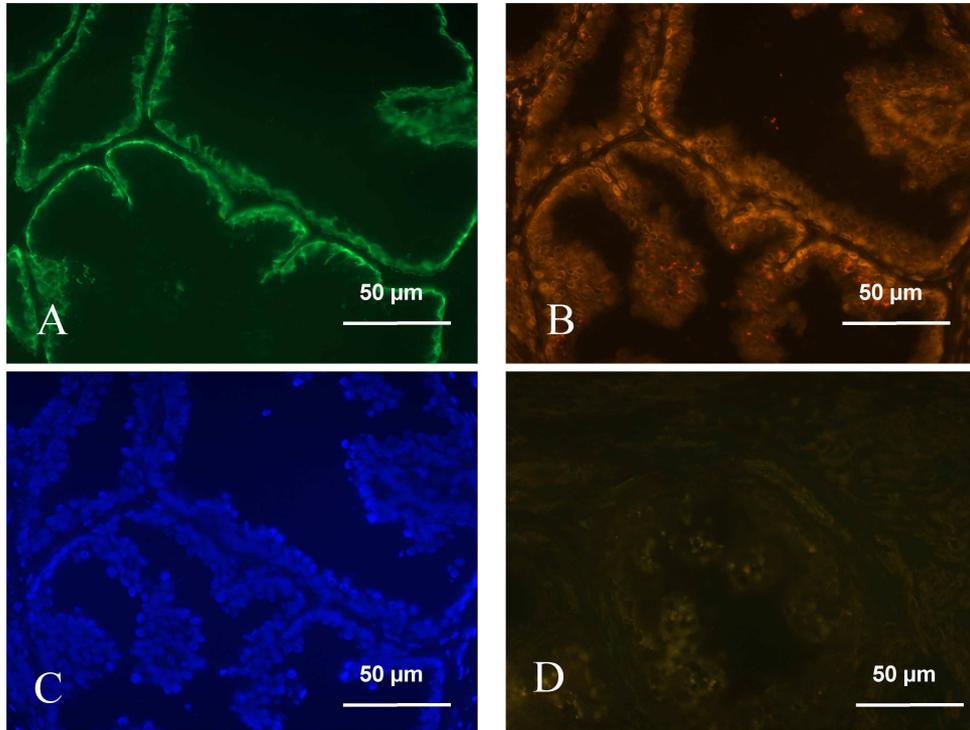


Abb.7. Expression von SCGB 2A1 im Prostataepithel

Doppelimmunfluoreszenz auf Prostatagewebe gesunder Probanden.

A. Markierung der Basalzellen mit einem Cytokeratin 34β E12 Antikörper mit Cy2- markiertem Sekundäantikörper.

B. SCGB 2A1 Antiserum mit Cy3-konjugiertem Sekundäantikörper.

C. Färbung der Zellkerne mit DAPI.

D. Negativkontrolle mit H₂O.

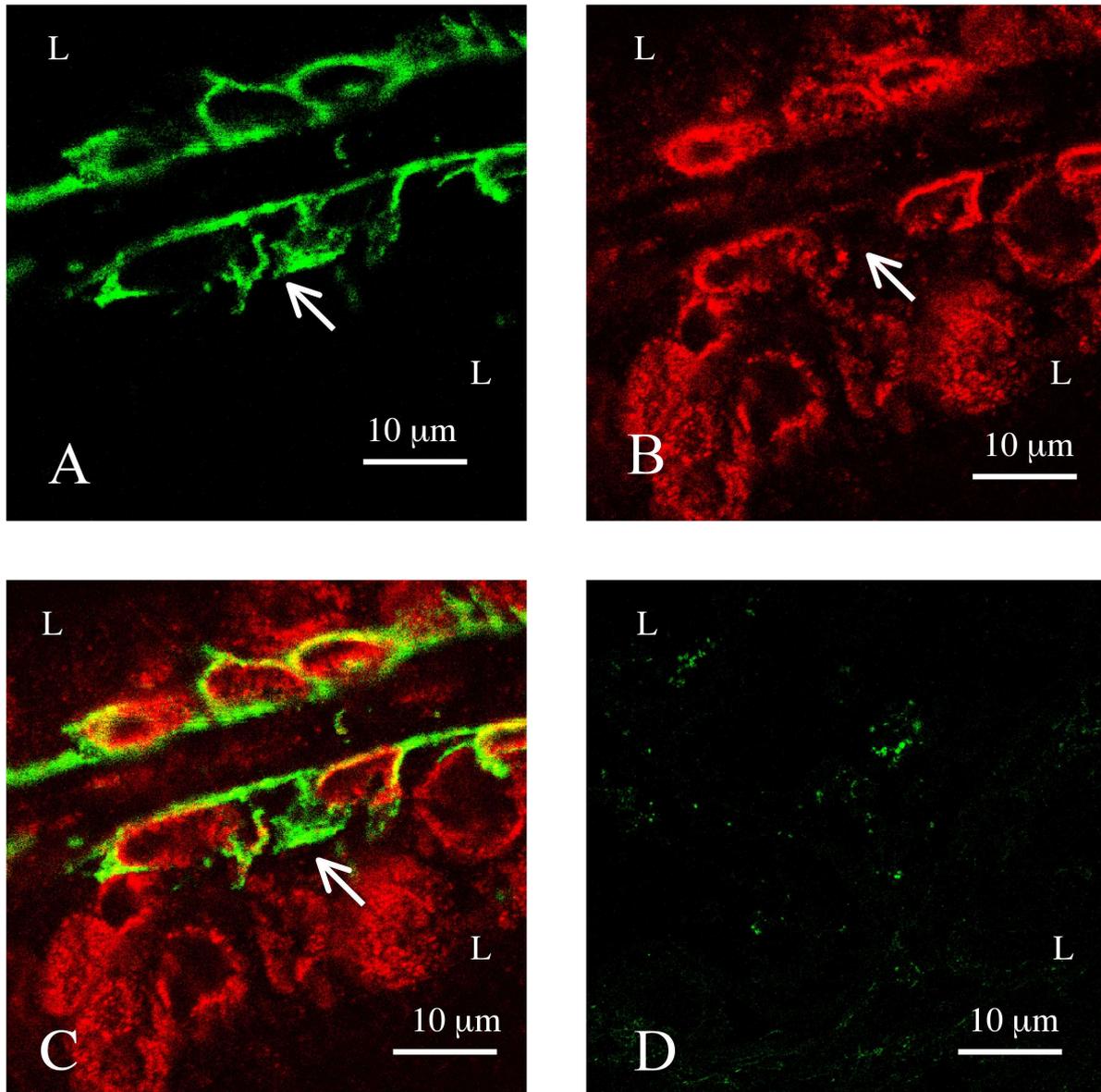


Abb. 8. Lokalisation von SCGB 2A1 in den Zellen der Prostata

Derselbe Prostataschnitt wie in Abbildung 7 fotografiert mit einem Konfokalen-Mikroskop. Dieser Ausschnitt zeigt zwei benachbarte Prostata Tubuli. L markiert das Lumen der Drüsen.

A. Markierung der Basalzellen mittels 34β E12 Antikörper und Cy2-konjugiertem Sekundärantikörper.

B. Dasselbe Detail des Drüsenepithels wie in A, SCGB 2A1 Färbung mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper. Einige wenige Basalzellen exprimieren kein SCGB 2A1 (Pfeil).

C. Superposition von A und B zur Demonstration der Co-Expression von SCGB 2A1 und Cytokeratin 34β E12 in den Basalzellen.

D. Negativkontrolle mit H₂O

Der weiße Pfeil markiert eine Basalzelle ohne Reaktion für SCGB 2A1 (B). In der gleichen Zelle kann jedoch 34β E12 als Marker für Basalzellen nachgewiesen werden (A).

Zur Ergänzung dieser Befunde wurde weiterhin eine Doppelimmunfluoreszenz mit PSA Antikörper zur Identifizierung der Luminalzellen und SCGB 2A1 Antiserum durchgeführt.

Abbildung 9 zeigt PSA in den Luminalzellen (weißer Pfeil), während die Basalzellen nicht markiert werden (roter Pfeil). PSA befindet sich im Zytoplasma der Luminalzellen. Im Vergleich dazu liegt SCGB 2A im Zytoplasma beider Zelltypen vor. Da für die Ausführung dieses Versuchs paraffineingebettetes Prostatagewebe verwendet werden musste, zeigt sich erneut eine deutliche unspezifische Färbung des Hintergrundes und der Zellkerne durch das SCGB 2A1 Antiserum.

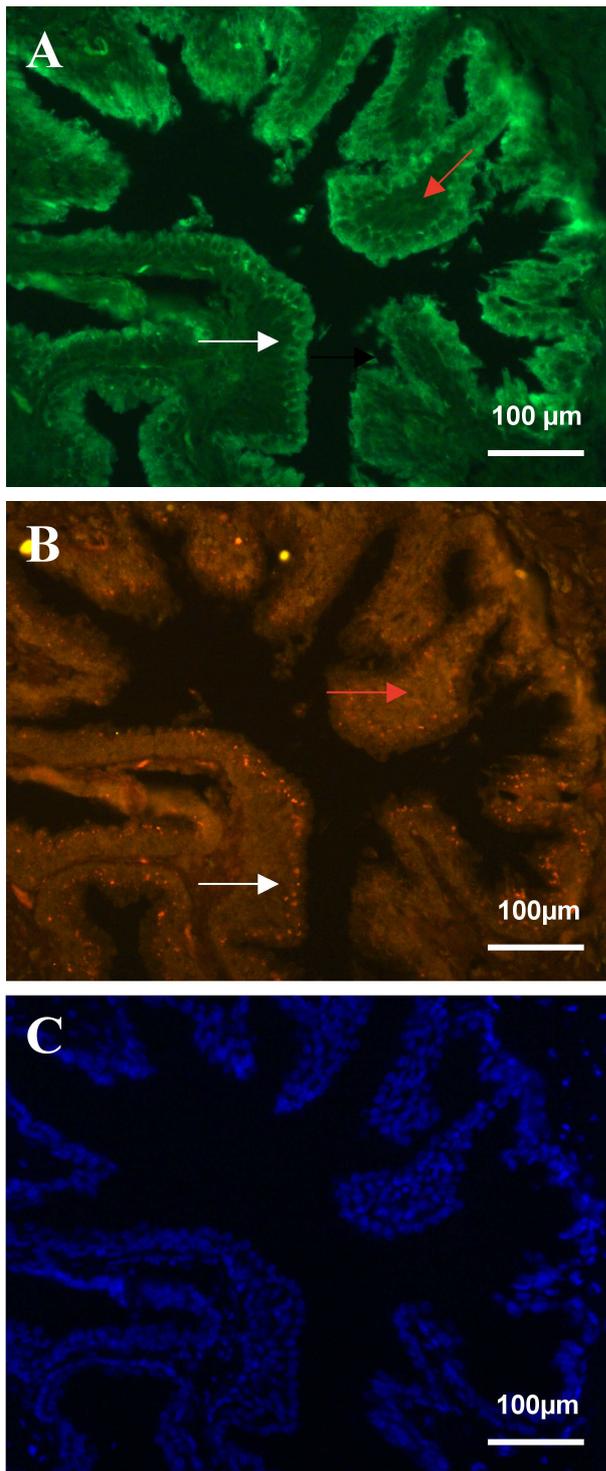


Abb. 9. Expression von PSA und SCGB 2A1 im Prostataepithel

Ein humaner Prostata Gewebe-Array wurde für die Anfertigung der Doppelimmunfluoreszenz-Analyse verwendet.

A. PSA Antikörper mit Cy2-konjugiertem Sekundärantikörper.

B. SCGB 2A1 Antikörper mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper.

C. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

3.3. Expression von SCGB 2A1 in der humanen Prostata

Die Expression von SCGB 2A1 in der humanen Prostata wurde bereits mit Immunfluoreszenz und *in situ* Hybridisierung untersucht (Xiao 2003). Das Protein wurde dabei in der gesunden adulten und fetalen humanen Prostata gefunden, darüberhinaus im Prostatakarzinom (PCA), jedoch nicht in den hyperplastischen Arealen einer benignen Prostatahyperplasie (BPH). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde ein Nachweis mit DAB Immunhistochemie von SCGB 2A1 auf BPH Prostatageweben durchgeführt. Abbildung 10 zeigt, dass SCGB 2A1 in den Tubuli der hyperplastischen Areale einer BPH nachgewiesen werden konnte. Es wurden 15 Prostata Proben unterschiedlicher Patienten mit diagnostizierter BPH immunhistochemisch gefärbt. Die Diagnosestellung war vorab durch das Pathologische Institut der Universitätsklinik Gießen (Prof. Schulz, Dr. Woenckhaus) erfolgt. Es zeigte sich in allen Proben eine starke Intensität der SCGB 2A1 Färbung, was auf eine ausgeprägte Expression des Proteins schließen lässt. Für die Versuche lagen unterschiedliche BPH Anschnitte zur Verfügung. Bei der BPH kann es sowohl zu einer Hyperplasie der bindegewebigen (z.B. in 11C), als auch der drüsigen Prostataanteile kommen. Zumeist jedoch werden in einem histologischen Schnitt sowohl der hyperplastische, oft knotige Anteil, und die gesunden Areale gleichermaßen angeschnitten. SCGB 2A1 ließ sich regelmäßig sowohl in den hyperplastischen Drüsenanschnitten, als auch den gesunden Drüsenanteilen nachweisen.

Um einen besseren Vergleich aller Ergebnisse zu erzielen, wurden zusätzlich PCA Proben und fetale Prostata untersucht. Auch in der fetalen Prostata konnte SCGB 2A1 nachgewiesen werden (Abb. 11D), jedoch in geringerer Intensität. Abb. 11 A und F zeigen unterschiedliche Prostatakarzinome. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden insgesamt 10 verschiedene Prostatakarzinomschnitte von zehn verschiedenen Patienten untersucht. Auch hier waren regelhaft gesunde Prostataareale mit angeschnitten. Im Prostatakarzinom geht die Basalzellreihe verloren, und es kommt zu Anreihungen kleiner drüsiger Anteile, in denen oft Zellkerne nur schwer abzugrenzen sind. In 11F sieht man typische Zellnester, die beim Prostatakarzinom auftreten können, deren Anordnung nur noch wenig an eine Drüse erinnern. Hier konnte in allen Schnitten SCGB in hoher Färbeintensität nachgewiesen werden.

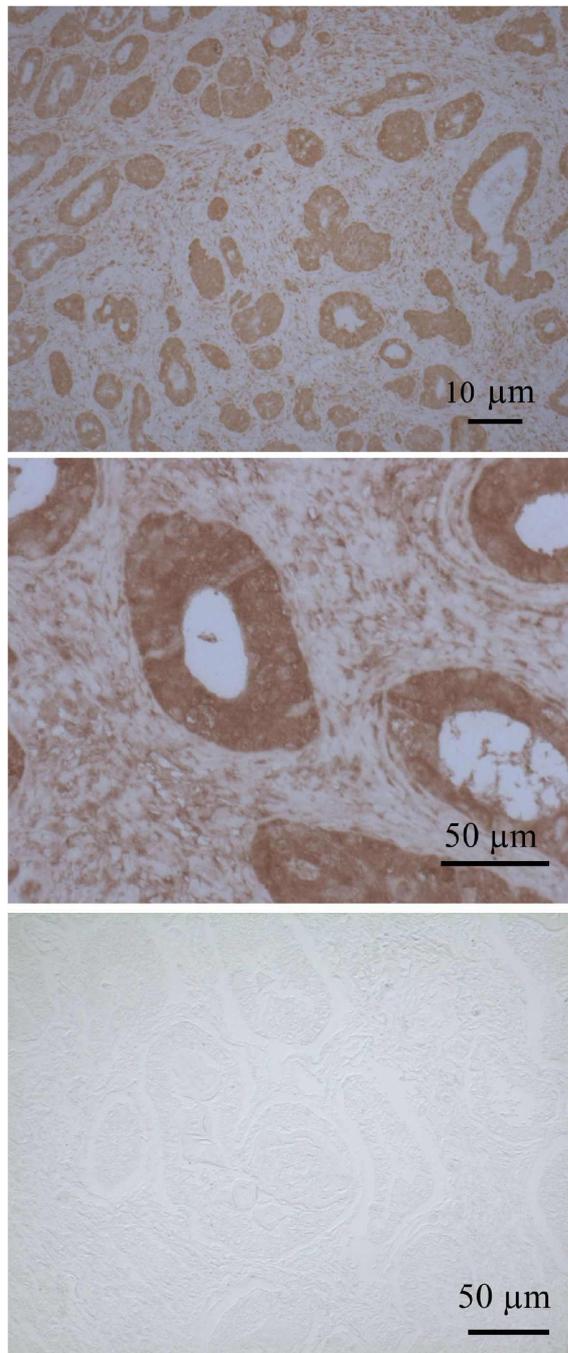


Abb. 10. Expression von SCGB 2A1 in der Prostata von BPH Patienten

- A. Immunhistochemische Analyse von BPH Prostatagewebe mit DAB Färbung.
- B. Expression von SCGB 2A1 in den Drüsenepithelien in höherer Vergrößerung.
- C. Negativkontrolle mit Präimmunsereum als Erstantikörper.

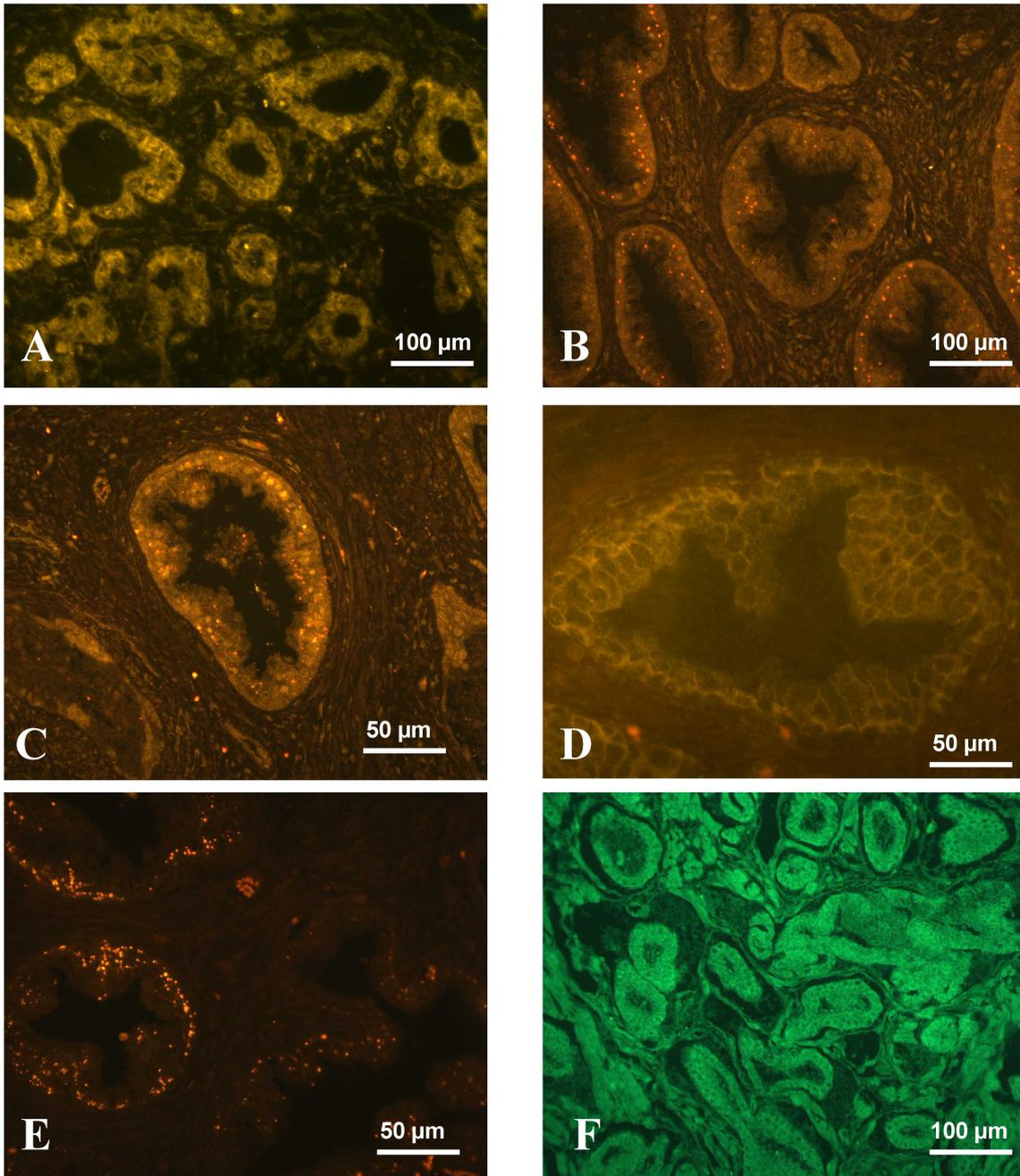


Abb. 11. Expression von SCGB 2A1 in der humanen Prostata

Paraffineingebettete Prostataschnitte von verschiedenen Probanden wurden für die Immunfluoreszenz verwendet. Alle Schnitte wurden zuerst mit dem SCGB 2A1 Antiserum inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Cy2-konjugierten anti-Kaninchen IgG-Antikörper gefärbt; außer Schnitt F, für den ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper verwendet wurde.

- A. SCGB 2A1 Sekretion in den Drüsenzellen eines Prostatakarzinoms.
- B. BPH Prostata.
- C. BPH Prostata in der gleichen Vergrößerung gezeigt wie D.
- D. SCGB 2A1 in der fetalen Prostata, ca. 24. Schwangerschaftswoche.
- E. Negativkontrolle mit Präimmunserum.
- F. Expression von SCGB 2A1 im Prostatakarzinom (Prostataprobe eines anderen Proband als in A)

4. Diskussion

4.1. Die Expression von SCGB 2A1 in den Basalzellen der humanen Prostata

Die eingehende Untersuchung der Basalzellen und ihres Expressionsmusters ist von besonderem Interesse, da man davon ausgeht, dass sich ausschließlich in der Basalzellreihe die prostatistischen Stammzellen befinden. Inzwischen haben diese vor allem auf Grund ihrer Rolle in der Tumorentstehung und als Tumorstammzellen an Bedeutung gewonnen. Daher beschäftigen sich viele Publikationen mit dem Expressionsprofil der einzelnen Zelltypen im Prostataepithel, um daran mögliche Stammzellen zu erkennen. Die Identifizierung spezifischer Marker erlaubt eine präzisere Definition der verschiedenen prostatistischen Zelltypen, aus denen sich möglicherweise maligne Zellen entwickeln können. Darüber hinaus ergeben sich eventuell Hinweise auf neue Biomarker für das Prostatakarzinom.

In diesem Zusammenhang sollte daher untersucht werden, ob die Basalzellen der Prostata SCGB 2A1, ein sekretorisches Protein das bereits im Prostataepithel gefunden wurde, exprimieren.

Die mutmaßliche Rolle der Basalzellen als Stammzellen wurde bereits vielfach diskutiert und ist bis heute nicht einheitlich akzeptiert (Nagle et al., 1987; Sherwood et al., 1990). Es existieren diverse Theorien über die verschiedenen Prostatazellen und ihren Ursprung.

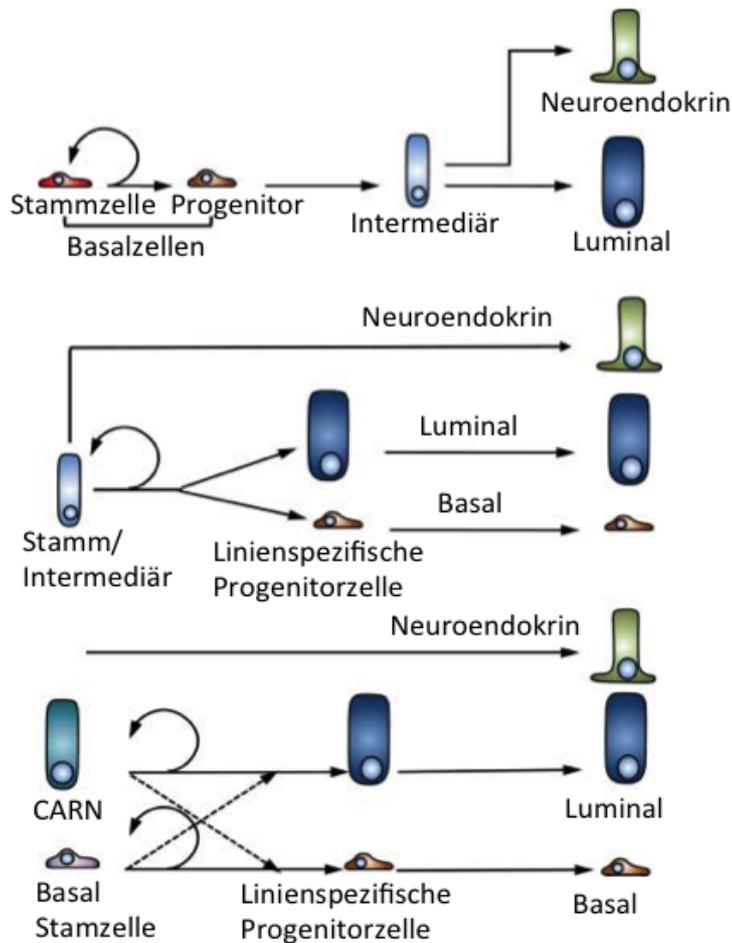


Abbildung 12. Modelle zur prostaticen Stammzellhierarchie

Entnommen aus Taylor et al. 2010.

1. Lineares Stammzellmodell. Prostatiche Stammzellen befinden sich in der Basalzellreihe. Die Basalzelle erneuert sich selbst und bringt eine einzige Progenitorzelle für alle Zelltypen hervor.
2. Bidirektionales Stammzellmodell. Alle Prostatazellen entspringen einer gemeinsamen Stammzelle, aber unterschiedlichen Progenitorzellen.
3. Unabhängiges Stammzellmodell. Aus luminalen Stammzellen (CARNS) und basalen Stammzellen gehen unabhängig voneinander die verschiedenen Zelltypen hervor.

Die Unterschiede in den Immunprofilen der drei prostaticen Zelltypen lassen sich nur schwer mit einem einzigen Stammzellkonzept vereinbaren. So beschreiben Taylor et al. (2010) auch drei mögliche Modelle der Stammzellhierarchie in der Prostata (siehe Abb. 12).

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die Stammzellen ausschließlich innerhalb des Basalzellkompartiments zu finden sind und von dort aus das Prostataepithel regenerieren (DeKlerk & Coffey, 1978; Taylor, Toivanen, & Risbridger, 2010). Die Stammzell-Hypothese von Isaacs und Coffey (Isaacs & Coffey, 1989) geht von basalen

Prostatastammzellen innerhalb der Basalzellpopulation aus, die Stammzellkopien hervorbringen (Selbsterneuerung) sowie Progenitorzellen, die sich dann über Intermediärzellen in Luminalzellen und neuroendokrine Zellen ausdifferenzieren (Abb. 12.1). Sie gehen davon aus, dass auch noch die Intermediärzellen in der Basalzellreihe lokalisiert sind (Bonkhoff & Remberger, 1996; De Marzo, Meeker, Epstein, & Coffey, 1998; van Leenders & Schalken, 2001).

Die moderne Version dieses ersten Stammzellmodells beschreibt die Stammzellendifferenzierung dagegen als einen in zwei Richtungen ablaufenden Prozess. Ging man ursprünglich davon aus, dass die Stammzellen den Basalzellen entspringen, welche CK 5 positiv und CK 8 negativ sind, so hätte man Zellen mit diesem Markerprofil auch im Epithel des embryonalen Urogenitalsinus erwartet. Allerdings konnten solche Zellen (CK 5+, CK 8-) dort nicht nachgewiesen werden. Es wurde hingegen eine kleine Fraktion prostatischer Basalzellen beschrieben, die das volle Spektrum aller Basal- und Luminalzellmarker exprimieren (CK 5, CK 14, CK 8, CK 18, CK 19, p 63). Diese Subpopulation adulter prostatischer Basalzellen entspricht dem Markerprofil, welches man bei den Zellen im embryonalen Urogenitalsinus gefunden hat. Wang et al. gehen daher davon aus, dass diese Zellen die originalen Progenitor-/Stammzellen darstellen (Y. Wang, Hayward, Cao, Thayer, & Cunha, 2001). Es wird angenommen, dass sich diese Progenitorzellen im Verlauf zu reifen Luminalzellen (CK 8+, CK 18+) oder zu reifen Basalzellen (CK 5+, CK 8-) differenzieren können (Burger et al., 2005; Lawson, Xin, Lukacs, Cheng, & Witte, 2007).

Diese beiden hierarchischen Stammzellmodelle werden mittlerweile durch ein drittes Modell ergänzt (Abb. 12. 3). Im linearen und bidirektionalen Stammzellmodell entspringt die Stammzelle entweder dem Basalzellkompartiment oder der Reihe der Intermediärzellen. Mittlerweile gibt es aber Hinweise, dass auch innerhalb des Luminalzellkompartiments Stammzellen zu finden sind. Somit werden die ursprünglichen hierarchischen Modelle durch ein unabhängiges Stammzellmodell ergänzt. Innerhalb der Luminalzellpopulation wurden Luminalzellen mit Progenitor-/Stammzeleigenschaften identifiziert, aus denen sich die Prostata regenerieren kann (X. Wang et al., 2009). Die so genannten CARNS (*Castrate-resistant Nkx3-1-expressing cells*) werden nicht durch Kastration beeinflusst und können ohne testikuläres Androgen proliferieren. Sie sind dazu bipotent, behalten die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und exprimieren Nkx3-1, welches für den Erhalt von Stammzellen

benötigt wird (X. Wang et al., 2009). Es wird vermutet, dass neben den bereits bekannten basalen Stammzellen CARNS existieren, die sich sowohl im Luminal- wie auch dem Basalzellkompartiment aufhalten können, von wo aus sie sich selbst erneuern oder jeden anderen prostatistischen Zelltyp entwickeln können. Somit scheinen die unterschiedlichen Zellen des Prostataepithels nicht von einer gemeinsamen, sondern von unterschiedlichen Stammzellpopulationen abzustammen. Zusammengefasst bleibt derzeit noch unklar, welches Modell tatsächlich für die Prostata zutrifft. Jedoch schließen sich alle drei Modelle nicht grundsätzlich aus und existieren vielleicht sogar parallel.

Die meisten Stammzelltheorien konzentrieren sich ausschließlich auf den Ursprung der Luminal- und Basalzellen, da diese für die Entstehung des Prostatakarzinoms entscheidend sind. Prostatakarzinome, die aus neuroendokrinen Zellen entstehen, finden sich mit 1-5% aller Prostatakarzinome sehr selten. Interessanterweise zeichnet sich das Prostatakarzinom dadurch aus, dass hier keine Basalzellreihe mehr nachgewiesen werden kann.

In situ Hybridisierungen und Immunfluoreszenzuntersuchungen von Xiao (Xiao, 2003) gaben erste Hinweise darauf, dass SCGB 2A1 sowohl in Luminal- wie auch Basalzellen der humanen Prostata exprimiert wird. Mittels doppelimmunfluoreszenzmikroskopischer Analyse konnte in dieser Arbeit jetzt zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass Sekretoglobin SCGB 2A1 tatsächlich im Zytoplasma von Luminal- wie Basalzellen vorkommt (Abb. 7 und 8). Damit ist SCGB 2A1 das erste Protein, das so ein Expressionsmuster in der Prostata aufweist. Bislang wurden sezernierte Proteine nur in den Luminalzellen gefunden (Danielpour, 1999; Robinson, Neal, & Collins, 1998).

Innerhalb der Basalzellreihe fallen bei stärkerer Vergrößerung vereinzelte SCGB2A1-negative Zellen auf (Abb. 8, weißer Pfeil), die mittels Cytokeratin 34 β spezifischer Färbung als Basalzellen identifiziert werden konnten. Der Anteil dieser Zellen ist nur sehr gering. Diese Ergebnisse stützen andere Beobachtungen, die zeigen, dass sich innerhalb des Basalzellkompartiments verschiedene Gruppen von Basalzellen befinden. So konnten Wang et al. einige wenige Basalzellen identifizieren, die das volle Spektrum von Markerproteinen aufwiesen, wie es auch die Zellen im Urogenitalsinus zeigen (Y. Wang et al., 2001). Es könnte also sein, dass es sich bei den SCGB 2A1 negativen Zellen um diese Vorläuferzellen handelt, die erst später nach einer weiteren

Ausdifferenzierung in Luminal- und Basalzellen die Fähigkeit entwickeln SCGB 2A1 zu exprimieren.

Ob es sich bei den von Wang beschriebenen Vorläuferzellen um Stammzellen handelt bleibt unklar. Wang gibt keine Schätzung darüber, wieviele Stammzellen prozentual nachgewiesen werden können. Kasper et al. schätzen diese auf nur 1% aller Prostataepithelzellen (Kasper, 2008).

Die Expression eines sekretorischen Proteins wie SCGB 2A1 in beiden Zelltypen ist eine unerwartete Entdeckung, da Sekretoglobine typische sezernierte Proteine sind, und diese für gewöhnlich nur von den Luminalzellen gebildet werden. Es gibt bisher zwar einige Fälle, in denen Proteine gleichzeitig in beiden Zelltypen nachgewiesen wurden, jedoch nicht in Immunfärbungen, sondern mittels PCR. Oudes et al. (2006) haben in einer umfangreichen Transkriptomanalyse die Genexpression in den verschiedenen Zelltypen der Prostata mittels PCR untersucht. Hierzu wurden monoklonale Antikörper für Basalzellen (Integrin $\beta 4$), Luminalzellen (Dipeptidylpeptidase IV), Fibroblasten (Integrin $\alpha 1$) und Endothelzellen (PECAM-1) eingesetzt, um die verschiedenen Zelltypen mittels magnetischer Zellsortierung zu trennen. Ein unerwartetes Ergebnis dieser Studie ist, daß Luminal- und Basalzellen hinsichtlich ihrer Transkriptome überraschend ähnlich sind. Auf der Proteinebene läßt sich dieser Befund jedoch nicht so ohne weiteres bestätigen. PSA (auch KLK3 genannt) wurde in dieser Studie zwar, wie vielfach beschrieben, in großen Mengen in den Luminalzellen gefunden, aber auch in allen anderen untersuchten Zelltypen. Dies konnte mit Hilfe statistischer Methoden jedoch auf Kontaminationen zurückgeführt werden. Das Transkript für SCGB 2A1 wurde in dieser Studie ebenfalls nur in den Luminalzellen nachgewiesen. Dies könnte aber auch bedeuten, dass SCGB 2A1 in den Luminalzellen synthetisiert und anschließend in die Basalzellen transportiert wird. Ein solcher Proteintransport zwischen beiden Zelltypen wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben, jedoch wurden *gap junction* Proteine beschrieben, die prinzipiell einen Austausch zwischen den Zelltypen ermöglichen (Habermann, Ray, Habermann, & Prins, 2002). In jedem Fall bestätigen die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde die Gemeinsamkeiten beider Zelltypen auch auf der Proteinebene.

Auffällig an der Studie von Oudes et al. (2006) ist, dass der Androgenrezeptor in keinem Zelltyp gefunden wurde. Zahlreiche Publikationen beschreiben die Prostata jedoch als Androgen-sensibles Organ, das den Androgenrezeptor im Prostataepithel

exprimiert (Bonkhoff & Remberger, 1996; Leav et al., 1996). Publikationen, welche sich mit der Gen- und Proteinexpression in der Prostata beschäftigen, um den Grad der Konkordanz zwischen immunhistochemischem Nachweis und tatsächlicher Proteinmenge zu untersuchen (Pascal et al., 2008) zeigen, dass die Korrelation von mRNA und Proteinexpression bei unterschiedlichen Proteinen variiert. So korreliert die Aussage „mRNA und immunhistochemischer Nachweis sind da“ in nur etwa der Hälfte der Fälle. Darüberhinaus war die Korrelation des Expressionsniveaus nur schwach bis moderat.

Sehr oft werden Proteine auch durch die sehr sensitive RT-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen, sind aber nur in geringen Mengen vorhanden, und mit immunhistologischen Methoden nicht oder nur kaum auf Proteinebene nachzuweisen. Auch in einigen anderen Fällen konnten Proteine durch Immunfärbung detektiert werden, aber nicht deren mRNA im Gene-Array (Pascal et al., 2008).

Die durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen von SCGB 2A1 im Epithel der humanen Prostata haben gezeigt, dass SCGB 2A1 bereits in frühen Entwicklungsstadien vom Prostataepithel gebildet wird (Abb. 11 D). Interessanterweise sieht man hier in den Basalzellen eine vermehrte Färbeintensität verglichen mit den Luminalzellen; eine Beobachtung, die sowohl in der fetalen, als auch der adulten Prostata immer wieder auffiel. Funktionen in der Entwicklung wurden bereits für einen entfernten Verwandten der Sekretoglobinfamilie beschrieben. SCGB 3A2 wurde in der Lunge entdeckt und scheint dort eine Rolle in der Entwicklung der Lungenbläschen zu spielen (Kurotani et al., 2008). Es wäre interessant weiterhin zu untersuchen, ob SCGB 2A1 Eigenschaften eines Wachstumsfaktors besitzt. Hätte es eine Wachstumsfaktor-Funktion, so würde dies die Expression in den Basalzellen erklären, da sich diese durch eine hohe proliferative Kapazität auszeichnen. Somit ist anzunehmen, dass von ihnen ausgehend das Prostataepithel regeneriert wird. Daher scheint es plausibel, dass ein Protein mit Wachstumsfaktoreigenschaft vornehmlich in den Basalzellen der Prostata nachgewiesen werden kann. Bisher ist jedoch nichts über die Rolle von SCGB 2A1 in der Entwicklung der humanen Prostata bekannt. Zusammenfassend scheinen auch die Basalzellen in der Lage zu sein, mit SCGB 2A1 ein sezerniertes Protein zu exprimieren. In der Basalzellzeihe finden sich einige wenige Basalzellen, die als solche anhand spezifischer Marker identifiziert werden konnten, aber kein SCGB 2A1 exprimieren. Somit konnten im Basalzellkompartiment unterschiedliche Basalzelltypen

nachgewiesen werden.

In allen immunhistologischen Färbungen zeigten die glatten Muskelzellen des prostatistischen Stromas eine positive Färbung von SCGB 2A1. Eine Färbung von Muskelgewebe, in dem Falle von quergestreifter Muskulatur, wurde auch bereits für den *Musculus orbicularis oculi* gefunden (Stoeckelhuber et al., 2006). Zhao et al. konnten darüberhinaus eine schwache Expression in quergestreifter Muskulatur mittels RT-PCR nachweisen (Zhao et al., 1999). Die Expression von SCGB 2A1 ist Androgen abhängig und es scheint eine Korrelation mit der Expression des Androgenrezeptors zu geben.

4.2. Nachweis von SCGB 2A1 in Prostataschnitten von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) und Prostatakarzinom (PCA)

Die immunhistochemischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen, daß SCGB 2A1 sowohl in den BPH-Arealen der humanen Prostata exprimiert wird, wie auch im umliegenden gesunden Prostataparenchym. Darüber hinaus konnte SCGB 2A1 mittels Immunfluoreszenz in Prostataschnitten von gesunden Probanden, solchen mit PCA, wie auch in Schnitten der fetalen Prostata detektiert werden. In einer von Xiao et al. durchgeführten Untersuchung wurde die Expression von SCGB 2A1 ebenfalls mit Hilfe von Immunfluoreszenz in verschiedenen Prostatageweben untersucht (Xiao, 2003). Dort wurde SCGB 2A1 in der gesunden adulten Prostata wie auch in einem PCA-Schnitt detektiert, nicht jedoch in einem exemplarischen BPH-Schnitt. In den hier beschriebenen Ergebnissen konnte der negative Erstbefund für SCGB 2A1 in einem einzigen BPH-Schnitt nicht bestätigt werden. In mehreren Schnitten, wie auch im Vergleich mit normalem Gewebe in der Nähe von BPH-Arealen auf einem Schnitt, konnte kein signifikanter Unterschied in der Färbung nachgewiesen werden.

SCGB 2A1 wurde als ein durch Androgene reguliertes Gen in der humanen Prostata beschrieben (Xiao et al., 2005). Sowohl für die Entwicklung als auch den Erhalt der Prostata, insbesondere des Epithels, sind Androgene unabdingbar. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die belegen, dass sowohl Androgene wie auch der Androgenrezeptor eine Rolle in der Ätiologie der BPH spielen (Nicholson & Ricke, 2011). Weiterhin ist bekannt, dass das Fortschreiten der Hyperplasie durch Inhibitoren der 5 α -Reduktase, einem Enzym, das Testosteron in Dihydrotestosteron umwandelt, verlangsamt werden kann. O'Malley et al. (2009) haben gefunden, dass die Androgen abhängigen Gene für Eaf2/U19, ELLA2, FKBP5 und PSA bei einer BPH stärker exprimiert werden als in der normalen Prostata. Einige andere Androgen abhängige Proteine wurden in der BPH jedoch auch weniger stark exprimiert gefunden. Darüberhinaus muss es noch weitere Androgen unabhängige Faktoren geben, die eine BPH mitverursachen oder verstärken können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das polyklonale Kaninchen Antiserum verwendet, das auch in den Arbeiten von Xiao et al. (2003) und Stoeckelhuber et al. (2003) Verwendung fand. Bei Xiao et al. (2003) wurden überwiegend paraffineingebettete

Schnitte verwendet. Bei den hier durchgeführten Immunfärbungen stellte sich jedoch heraus, dass dieser Antikörper auf paraffineingebetteten Schnitten nicht zu verwenden ist, so dass hier meist Kryoschnitte Verwendung fanden. Dies könnte auch die unterschiedlichen Ergebnisse bei den BPH-Proben erklären.

SCGB 2A1 gehört zur Familie der Sekretoglobine. Diese kleinen sezernierten Proteine werden in unterschiedlichen Geweben von Mensch und Säugetier exprimiert, vorwiegend in Schleimhäuten und Epithelien (Ni et al., 2000). Ihre physiologische Bedeutung bleibt nach wie vor unklar, jedoch wird in neueren Publikationen ein Zusammenhang mit der Tumorgenese vermutet. Kurotani et al. (2011) unterteilen die Sekretoglobine in zwei unterschiedliche Klassen ein. Demnach lassen sich die Sekretoglobine in solche einteilen, die als Tumorsuppressoren fungieren und im Tumorgewebe vermindert nachgewiesen werden. Die zweite Gruppe Sekretoglobine wird in Tumoren überexprimiert .

Eine tumorsuppressive Funktion wird für SCGB 3A2 (*uteroglobin-related protein 1*) in Lungentumoren und im Bronchialepithel beschrieben (Kurotani et al., 2011). Von SCGB 1A1 (Uteroglobin) wird vermutet, dass es in Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) und in metastatischen Prostatazelllinien tumorsuppressiv wirkt (Leyton et al., 1994). Für SCGB 3A1 (HIN-1) wird ebenfalls eine tumorsuppressive Wirkung vermutet. So wird das Gen in einer signifikanten Zahl von Brust-, Prostata-, Lungen- Magen- und Pankreaskarzinomen durch Methylierung stillgelegt (Gong et al., 2011; Krop et al., 2005). Vermutlich über den AKT-Signalweg vermittelt, inhibiert SCGB 3A1 Zellwachstum, Zellmigration und –invasion. Ein weiteres Beispiel ist SCGB 1D2 (Lipophilin B), welches in Adenomen der Hypophyse nur vermindert nachgewiesen werden kann (Sjodin et al., 2005).

Zur zweiten Gruppe der Sekretoglobine werden diejenigen gezählt, welche in Tumoren überexprimiert werden. Diese können durch die vermehrte Expression im Tumorgewebe als Tumormarker fungieren. So wurde SCGB 3A2 vermehrt in pulmonalen Tumoren nachgewiesen und ist ein neuer Marker für Lungentumoren des Menschen (Kurotani et al., 2011; Tachihara-Yoshikawa et al., 2008). Es sei erwähnt, dass SCGB 3A2 darüberhinaus als Wachstumsfaktor für die pulmonale Entwicklung dient (Kurotani et al., 2008) und antiinflammatorische Wirkung aufweist (Chiba et al., 2006).

SCGB 2A2 (Mammaglobin) wurde bislang von allen Sekretoglobinen am intensivsten untersucht. Mit Hilfe von SCGB 2A2 können Mikrometastasen und im Blut zirkulierende Tumorzellen detektiert werden, weshalb sich SCGB 2A1 mittlerweile als diagnostischer Marker für das Mammakarzinom etabliert hat (Ghossein, Carusone, & Bhattacharya, 2000).

Die Expression von SCGB 2A1 (Lipophilin C) dagegen wurde bislang noch nicht eingehender in Karzinomen wie dem PCA untersucht. Interessant wäre zu untersuchen, ob im Prostatakarzinom eine Überexpression besteht. Anhand unserer Untersuchungen, in denen SCGB 2A1 in PCA Proben nachgewiesen wurde, wäre es durchaus möglich, dass das Protein überexprimiert wird. Alle Immunfluoreszenz-Untersuchungen von SCGB 2A1 in Prostatageweben ergaben einen positiven Nachweis (siehe Abb. 11F). Die ausgeprägte Färbeintensität lässt vermuten, dass hier SCGB 2A1 stark exprimiert wird. Allgemein ist bekannt, dass sich das Expressionsverhalten von Proteinen in Tumoren verändert, verursacht durch veränderte Differenzierung der Zellen und gestörte Genregulation der entarteten Zellen.

Das bekannteste Beispiel hierzu ist das PSA, welches im Prostatakarzinom deutlich vermehrt exprimiert wird und dadurch zum Screening des PCA als Tumormarker verwendet wird. Seit der Verwendung von PSA als diagnostischem Marker konnte die Mortalität bei PCA deutlich gesenkt werden und der Tumor kann bereits in einem Frühstadium erfasst werden (Jin et al., 2013). Jedoch liegen bei ca. 15% aller PCA-Fälle keine erhöhten PSA Werte vor. Dahingehend wäre es interessant, SCGB 2A1 im Serum männlicher Probanden zu bestimmen und die Werte von Gesunden mit an Prostatakarzinom erkrankten Männern zu vergleichen. Sollte eine Messung von SCGB 2A1 im Serum möglich sein, wäre es darüber hinaus interessant, die Werte mit den PSA Werten zu korrelieren, um zu prüfen, ob so eine höhere Spezifität bei der Erkennung von Prostatakarzinomen erreicht werden kann.

In den hier durchgeführten Versuchen wurden 10 verschiedene Prostatakarzinomproben untersucht, die von zehn verschiedenen Patienten in unterschiedlichen Erkrankungsstadien stammten. Ob sich die Karzinome noch im Androgen abhängigen Tumorstadium befanden, war jedoch nicht bekannt. Um die Bedeutung dieses Nachweises zu beurteilen, ist eine wesentlich größere Patientenkohorte notwendig. Es wäre interessant zu testen, ob in hormonrefraktären Prostatakarzinomen SCGB 2A1 nachgewiesen werden kann. Zwar wird in den hormonrefraktären PCAs der

Androgenrezeptor weiterhin exprimiert (Mohler et al., 1996; Mohler, Partin, Isaacs, & Coffey, 1987; van der Kwast et al., 1991), doch kommt es im Krankheitsverlauf bis hin zum Therapierefraktären Stadium möglicherweise zu einer Abnahme der Androgen regulierten SCGB 2A1 Expression.

Meine Untersuchungen deuten auf eine starke Expression von SCGB 2A1 in PCA-Schnitten hin (Abb.11 F). Daher scheint für SCGB 2A1 am Ehesten eine Überexpression im Prostatakarzinom vorzuliegen. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigen jedenfalls keine Herunterregulierung von SCGB 2A1, da dieses im Prostatakarzinom reichhaltig nachgewiesen werden kann. Allerdings erfolgte der Nachweis dieser Arbeit ausschließlich auf histologischer Ebene. Eine vergleichende, quantitative Studie der SCGB 2A1 Expression in der gesunden Prostata sowie in BPH und PCA-Proben, ähnlich wie beim Ovarialkarzinom, wäre weiterführend sinnvoll. So wurde SCGB 2A1 zunächst in einem Microarray als Marker für das epitheliale Ovarialkarzinom identifiziert und dann auf der mRNA- und Proteinebene weiter untersucht. Der Nachweis von SCGB 2A1 ist in diesem Fall mit einem verminderten Risiko für einen Tumorrückfall assoziiert (Tassi et al., 2009).

Allgemein weisen Sekretoglobine nur geringe Gewebsspezifität auf und werden in verschiedenen Epithelien co-exprimiert. Mammaglobin A (SCGB 2A2) zum Beispiel wird nicht nur in der Mamma, sondern auch in Uterus, Ovar, Hoden und Speicheldrüse nachgewiesen (Lehrer et al., 1998). Trotz eingeschränkter Gewebespezifität hat es dennoch diagnostische Bedeutung für das Mammakarzinom erlangt.

Auch SCGB 2A1 (Lipophilin C) wurde mittels PCR in multiplen Geweben gesunder Probanden nachgewiesen. Darunter in Ovar, Uterus, Hoden, Brustdrüse, Speicheldrüse, Niere, Thymus, Muskel und Prostata (Lehrer, Nguyen, Zhao, Ha, & Glasgow, 2000). Allerdings haben die hier vorgestellten Untersuchungen keinen Hinweis darauf gebracht, dass SCGB 2A1 ein Markerpotential für BPH oder das PCA haben könnte. Carter et al. (2003) konnten zeigen, dass Antikörper gegen SCGB 1D2 (Lipophilin B) im Serum von an Brustkrebs erkrankten Patientinnen auftreten, insbesondere, wenn sich diese in einem späten Krankheitsstadium befinden. Solche Antikörper wurden auch in geringeren Mengen bei PCA- und Ovarialkarzinompatienten gefunden. Es wäre demzufolge sinnvoll auch das Auftreten von Antikörpern gegen SCGB 2A1, insbesondere bei PCA, zu überprüfen.

5. Zusammenfassung

In der Dissertationsarbeit von Xiao (Xiao, 2003) ergaben sich Hinweise darauf, dass das Sekretoglobin SCGB 2A1, ein typisches Sekretprotein der Prostata, sowohl in den Basalzellen wie auch den Luminalzellen der humanen Prostata exprimiert wird. Bislang wurden jedoch die sezernierten Proteine der Prostata ausschließlich in den Luminalzellen gefunden. Darüber hinaus fand Xiao SCGB 2A1 sowohl im Epithel der fetalen und adulten Prostata wie auch im Prostatakarzinom, jedoch konnte das Protein in einer benignen Prostatahyperplasie nicht nachweisen werden. Möglicherweise könnte SCGB2A1 daher einen Marker darstellen, mit dem es möglich ist Karzinom von BPH zu unterscheiden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression in den Basalzellen mit Hilfe der doppelimmunfluoreszenzmikroskopischen Analyse abzuklären und die Expression in BPH Proben mittels Immunhistochemie zu überprüfen.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass SCGB 2A1 gleichermaßen in den Basalzellen wie den Luminalzellen der Prostata vorliegt. Damit scheint es das erste sezernierte Prostataprotein zu sein, das in beiden Zelltypen nachzuweisen ist. Dieser Befund unterstützt andere Berichte, die Ähnlichkeiten im Expressionsprofil von Basal- und Luminalzellen gefunden haben, wie auch die These, dass beide Zelltypen sich aus einer gemeinsamen Stammzelle entwickeln.

Darüber hinaus wurde SCGB 2A1 im Drüsenepithel sowohl von BPH wie auch Prostatakarzinomproben nachgewiesen. Das Protein stellt damit also keinen spezifischen Karzinommarker dar. Es ergaben sich jedoch Hinweise darauf, dass SCGB 2A1 bei Prostatakarzinom wie auch BPH im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert wird. Dies wurde bereits für ein anderes Sekretoglobin, das Mammaglobin (SCGB 2A2), beim Mammakarzinom vielfach gezeigt, so dass es heute als etablierter Tumormarker gilt. Es könnte sich also lohnen, auch die Überexpression von SCGB 2A1 bei BPH und Prostatakarzinom genauer und mit anderen geeigneten Methoden wie der qPCR zu untersuchen, um zu überprüfen, ob das Protein nicht als Tumormarker diagnostischen Wert hat.

6. Summary

The Secretoglobin SCGB 2A1, a typical secretory protein of the prostate, can be detected in the basal as well as luminal cells of the human prostate. To date, secreted proteins were only found to be expressed by the luminal cells. Moreover, Xiao (2003) found SCGB 2A1 in the epithelium of the fetal and adult prostate as well as in prostate carcinoma, but could not detect the protein in a sample of benign prostate hyperplasia (BPH). Therefore, SCGB 2A1 could represent a valuable diagnostic marker protein that is able to distinguish between prostate carcinoma and BPH. Aim of this thesis was therefore to verify expression of SCGB 2A1 in basal cells by using double immunofluorescence and to survey expression in BPH samples by immunohistochemistry.

The results show that SCGB 2A1 is present in basal and prostate cells alike. This identifies SCGB 2A1 as the first secreted prostate protein that can be demonstrated in both cell types. This finding supports other publications reporting similarities in the expression profiles of basal and luminal cells and the hypothesis that both cell types develop from a common precursor stem cell.

Moreover, SCGB 2A1 could be detected in the glandular epithelium of BPH as well as in prostate carcinoma samples. Therefore, it does not qualify as carcinoma-specific marker. However it appears that SCGB 2A1 is overexpressed in prostate carcinoma and BPH samples in comparison to normal tissue. This was also shown for another secretoglobin – mammaglobin (SCGB 2A2) – that is specifically overexpressed and secreted into the circulation by breast cancer cells and represents an established tumor marker for this malignancy. Therefore, it would be worthwhile to thoroughly investigate overexpression of SCGB 2A1 in BPH and prostate cancer with adequate methods like qPCR in order to find out if the protein may qualify as a diagnostic marker for prostate cancer.

7. Literaturverzeichnis

- Abrahamsson, P. A., Dizeyi, N., Alm, P., di Sant'Agnesse, P. A., Defetos, L. J., & Aumuller, G. (2000). Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. *Prostate*, *44*(3), 181-186.
- Beier, H. M. (1968). Uteroglobin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim Biophys Acta*, *160*(2), 289-291.
- Benninghoff, A. D., D. (2008). *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. (17. Auflage ed. Vol. Band 1). München: Urban und Fischer.
- Bonkhoff, H., & Remberger, K. (1993). Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, *422*(1), 35-38.
- Bonkhoff, H., & Remberger, K. (1996). Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate*, *28*(2), 98-106.
- Bonkhoff, H., Stein, U., & Remberger, K. (1994). Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Hum Pathol*, *25*(1), 42-46.
- Bonkhoff, H., Wernert, N., Dhom, G., & Remberger, K. (1991). Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate*, *19*(2), 91-98.
- Burger, P. E., Xiong, X., Coetzee, S., Salm, S. N., Moscatelli, D., Goto, K., & Wilson, E. L. (2005). Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(20), 7180-7185.
- Carter, D., Dillon, D. C., Reynolds, L. D., Retter, M. W., Fanger, G., Molesh, D. A., Houghton, R. L. (2003). Serum antibodies to lipophilin B detected in late stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, *9*(2), 749-754.
- Chiba, Y., Kurotani, R., Kusakabe, T., Miura, T., Link, B. W., Misawa, M., & Kimura, S. (2006). Uteroglobin-related protein 1 expression suppresses allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, *173*(9), 958-964.
- Danielpour, D. (1999). Transdifferentiation of NRP-152 rat prostatic basal epithelial cells toward a luminal phenotype: regulation by glucocorticoid, insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta. *J Cell Sci*, *112* (Pt 2), 169-179.
- Daver, A., Soret, J. Y., Coblenz, Y., Allain, Y. M., Cellier, P., & Chauveau, P. (1988). The usefulness of prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in clinical practice. *Am J Clin Oncol*, *11* Suppl 2, S53-60.

- De Marzo, A. M., Meeke, A. K., Epstein, J. I., & Coffey, D. S. (1998). Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol*, *153*(3), 911-919.
- De Vita, R. (2011). *Cancer, Principles and practice of oncology* (Vol. 9 th edition). Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- DeKlerk, D. P., & Coffey, D. S. (1978). Quantitative determination of prostatic epithelial and stromal hyperplasia by a new technique. *Biomorphometrics. Invest Urol*, *16*(3), 240-245.
- di Sant'Agnese, P. A. (1992). Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol*, *23*(3), 287-296.
- El-Alfy, M., Pelletier, G., Hermo, L. S., & Labrie, F. (2000). Unique features of the basal cells of human prostate epithelium. *Microsc Res Tech*, *51*(5), 436-446.
- Fleming, T. P., & Watson, M. A. (2000). Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*, *923*, 78-89.
- Ghossein, R. A., Carusone, L., & Bhattacharya, S. (2000). Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in melanoma prostatic and breast carcinomas. *In Vivo*, *14*(1), 237-250.
- Gleason, D. F. (1992). Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*, *23*(3), 273-279.
- Gleason, D. F., & Mellinger, G. T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*, *111*(1), 58-64.
- Goedegebuure, P. S., Watson, M. A., Viehl, C. T., & Fleming, T. P. (2004). Mammaglobin-based strategies for treatment of breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, *4*(6), 531-542.
- Gong, Y., Guo, M. Z., Ye, Z. J., Zhang, X. L., Zhao, Y. L., & Yang, Y. S. (2011). Silence of HIN-1 expression through methylation of its gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, *17*(4), 526-533.
- Grunewald, K., Haun, M., Fiegl, M., Urbanek, M., Muller-Holzner, E., Massoner, A., Gastl, G. (2002). Mammaglobin expression in gynecologic malignancies and malignant effusions detected by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Lab Invest*, *82*(9), 1147-1153.
- Habermann, H., Ray, V., Habermann, W., & Prins, G. S. (2002). Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol*, *167*(2 Pt 1), 655-660.
- Hautmann, H. (2010). *Urologie* (Vol. 4. Auflage). Heidelberg: Springer

- Hayward, S. W., Brody, J. R., & Cunha, G. R. (1996). An edgewise look at basal epithelial cells: three-dimensional views of the rat prostate, mammary gland and salivary gland. *Differentiation*, 60(4), 219-227.
- Isaacs, J. T., & Coffey, D. S. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl*, 2, 33-50.
- Jackson, B. C., Thompson, D. C., Wright, M. W., McAndrews, M., Bernard, A., Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2011). Update of the human secretoglobin (SCGB) gene superfamily and an example of 'evolutionary bloom' of androgen-binding protein genes within the mouse Scgb gene superfamily. *Hum Genomics*, 5(6), 691-702.
- Jin, G., Zheng, S. L., Lilja, H., Kim, S. T., Tao, S., Gao, Z., Xu, J. (2013). Genome-wide association study identifies loci at ATF7IP and KLK2 associated with percentage of circulating free PSA. *Neoplasia*, 15(1), 95-101.
- Kasper, S. (2008). Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Rev*, 4(3), 193-201.
- Kavanagh, J. P. (1985). Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid. *J Reprod Fertil*, 75(1), 35-41.
- Klug, J., Beier, H. M., Bernard, A., Chilton, B. S., Fleming, T. P., Lehrer, R. I., Singh, G. (2000). Uteroglobins/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann N Y Acad Sci*, 923, 348-354.
- Krishnan, R. S., & Daniel, J. C., Jr. (1967). "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science*, 158(3800), 490-492.
- Krop, I., Parker, M. T., Bloushtain-Qimron, N., Porter, D., Gelman, R., Sasaki, H., Polyak, K. (2005). HIN-1, an inhibitor of cell growth, invasion, and AKT activation. *Cancer Res*, 65(21), 9659-9669.
- Kurotani, R., Kumaki, N., Naizhen, X., Ward, J. M., Linnoila, R. I., & Kimura, S. (2011). Secretoglobin 3A2/uteroglobin-related protein 1 is a novel marker for pulmonary carcinoma in mice and humans. *Lung Cancer*, 71(1), 42-48.
- Kurotani, R., Tomita, T., Yang, Q., Carlson, B. A., Chen, C., & Kimura, S. (2008). Role of secretoglobin 3A2 in lung development. *Am J Respir Crit Care Med*, 178(4), 389-398.
- Lawson, D. A., Xin, L., Lukacs, R. U., Cheng, D., & Witte, O. N. (2007). Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(1), 181-186.
- Leav, I., McNeal, J. E., Kwan, P. W., Komminoth, P., & Merk, F. B. (1996). Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Prostate*, 29(3), 137-145.

- Lehrer, R. I., Nguyen, T., Zhao, C., Ha, C. X., & Glasgow, B. J. (2000). Secretory lipophilins: a tale of two species. *Ann N Y Acad Sci*, 923, 59-67.
- Lehrer, R. I., Xu, G., Abduragimov, A., Dinh, N. N., Qu, X. D., Martin, D., & Glasgow, B. J. (1998). Lipophilin, a novel heterodimeric protein of human tears. *FEBS Lett*, 432(3), 163-167.
- Leyton, J., Manyak, M. J., Mukherjee, A. B., Miele, L., Mantile, G., & Patierno, S. R. (1994). Recombinant human uteroglobin inhibits the in vitro invasiveness of human metastatic prostate tumor cells and the release of arachidonic acid stimulated by fibroblast-conditioned medium. *Cancer Res*, 54(14), 3696-3699.
- McNeal, J. E. (1968). Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol*, 49(3), 347-357.
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2(1), 35-49.
- Mohler, J. L., Chen, Y., Hamil, K., Hall, S. H., Cidlowski, J. A., Wilson, E. M., Sar, M. (1996). Androgen and glucocorticoid receptors in the stroma and epithelium of prostatic hyperplasia and carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2(5), 889-895.
- Mohler, J. L., Partin, A. W., Isaacs, W. B., & Coffey, D. S. (1987). Time lapse videomicroscopic identification of Dunning R-3327 adenocarcinoma and normal rat prostate cells. *J Urol*, 137(3), 544-547.
- Mostofi, F. K., Davis, C. J., Jr., & Sesterhenn, I. A. (1992). Pathology of carcinoma of the prostate. *Cancer*, 70(1 Suppl), 235-253.
- Mulders, T. M., Bruning, P. F., & Bonfrer, J. M. (1990). Prostate-specific antigen (PSA). A tissue-specific and sensitive tumor marker. *Eur J Surg Oncol*, 16(1), 37-41.
- Nagle, R. B., Ahmann, F. R., McDaniel, K. M., Paquin, M. L., Clark, V. A., & Celniker, A. (1987). Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res*, 47(1), 281-286.
- Ni, J., Kalf-Suske, M., Gentz, R., Schageman, J., Beato, M., & Klug, J. (2000). All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann N Y Acad Sci*, 923, 25-42.
- Nicholson, T. M., & Ricke, W. A. (2011). Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation*, 82(4-5), 184-199.
- O'Malley, K. J., Dhir, R., Nelson, J. B., Bost, J., Lin, Y., & Wang, Z. (2009). The expression of androgen-responsive genes is up-regulated in the epithelia of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*, 69(16), 1716-1723.
- Oudes, A. J., Campbell, D. S., Sorensen, C. M., Walashek, L. S., True, L. D., & Liu, A. Y. (2006). Transcriptomes of human prostate cells. *BMC Genomics*, 7, 92.

- Pascal, L. E., True, L. D., Campbell, D. S., Deutsch, E. W., Risk, M., Coleman, I. M., Liu, A. Y. (2008). Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics*, 9, 246.
- Porter, D., Lahti-Domenici, J., Torres-Arzayus, M., Chin, L., & Polyak, K. (2002). Expression of high in normal-1 (HIN-1) and uteroglobin related protein-1 (UGRP-1) in adult and developing tissues. *Mech Dev*, 114(1-2), 201-204.
- Robinson, E. J., Neal, D. E., & Collins, A. T. (1998). Basal cells are progenitors of luminal cells in primary cultures of differentiating human prostatic epithelium. *Prostate*, 37(3), 149-160.
- Rohr, H. P., Krisl, I., Holliger, O., Oberholzer, M., & Bartsch, G. (1981). Stereological analysis of the dog prostate (analytical model). *Urol Res*, 9(4), 193-199.
- Sampson, N., Madersbacher, S., & Berger, P. (2008). [Pathophysiology and therapy of benign prostatic hyperplasia]. *Wien Klin Wochenschr*, 120(13-14), 390-401.
- Schmidt, U. (2003). *Lehrbuch Vorklinik* (Vol. Band C). Köln: Deutscher Ärzte Verlag.
- Shapiro, E., Becich, M. J., Hartanto, V., & Lepor, H. (1992). The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic benign prostate hyperplasia. *J Urol*, 147(5), 1293-1297.
- Shariat, S. F., Semjonow, A., Lilja, H., Savage, C., Vickers, A. J., & Bjartell, A. (2011). Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol*, 50 Suppl 1, 61-75.
- Sherwood, E. R., Berg, L. A., Mitchell, N. J., McNeal, J. E., Kozlowski, J. M., & Lee, C. (1990). Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J Urol*, 143(1), 167-171.
- Sjodin, A., Guo, D., Lund-Johansen, M., Krossnes, B. K., Lilleng, P., Henriksson, R., & Hedman, H. (2005). Secretoglobins in the human pituitary: high expression of lipophilin B and its down-regulation in pituitary adenomas. *Acta Neuropathol*, 109(4), 381-386.
- Stevens, L. a. L., J. (1997). *Histologie des Menschen* (Vol. 2. Auflage). London: Chapman and Hall.
- Stoeckelhuber, M., Stoeckelhuber, B. M., & Welsch, U. (2003). Human glands of Moll: histochemical and ultrastructural characterization of the glands of Moll in the human eyelid. *J Invest Dermatol*, 121(1), 28-36.
- Stoeckelhuber, M., Messmer, E. M., Schmidt, C., Xiao, F., Schubert, C., & Klug, J. (2006). Immunohistochemical analysis of secretoglobin SCGB 2A1 expression in human ocular glands and tissues. *Histochem Cell Biol*, 126(1), 103-109.
- Tachihara-Yoshikawa, M., Ishida, T., Watanabe, K., Sugawara, A., Kanazawa, K., Kanno, R., Munakata, M. (2008). Expression of secretoglobin3A2 (SCGB3A2) in primary pulmonary carcinomas. *Fukushima J Med Sci*, 54(2), 61-72.

- Tassi, R. A., Calza, S., Ravaggi, A., Bignotti, E., Odicino, F. E., Tognon, G., Santin, A. D. (2009). Mammaglobin B is an independent prognostic marker in epithelial ovarian cancer and its expression is associated with reduced risk of disease recurrence. *BMC Cancer*, 9, 253.
- Taylor, R. A., & Risbridger, G. P. (2008). The path toward identifying prostatic stem cells. *Differentiation*, 76(6), 671-681.
- Taylor, R. A., Toivanen, R., & Risbridger, G. P. (2010). Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem. *Endocr Relat Cancer*, 17(4), R273-285.
- Thomson, A. A. (2001). Role of androgens and fibroblast growth factors in prostatic development. *Reproduction*, 121(2), 187-195.
- Thomson, A. A., & Marker, P. C. (2006). Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *Differentiation*, 74(7), 382-392.
- Tuan, J., Pandha, H., Corbishley, C., & Khoo, V. (2012). Basaloid carcinoma of the prostate: A literature review with case report. *Indian J Urol*, 28(3), 322-324.
- van der Kwast, T. H., Schalken, J., Ruizeveld de Winter, J. A., van Vroonhoven, C. C., Mulder, E., Boersma, W., & Trapman, J. (1991). Androgen receptors in endocrine-therapy-resistant human prostate cancer. *Int J Cancer*, 48(2), 189-193.
- van Leenders, G. J., & Schalken, J. A. (2001). Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. *BJU Int*, 88 Suppl 2, 35-42; discussion 49-50.
- Verhagen, A. P., Aalders, T. W., Ramaekers, F. C., Debruyne, F. M., & Schalken, J. A. (1988). Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate*, 13(1), 25-38.
- Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K. D., Walker, D., Yu, H., Halili, M. V., Shen, M. M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature*, 461(7263), 495-500.
- Wang, Y., Hayward, S., Cao, M., Thayer, K., & Cunha, G. (2001). Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation*, 68(4-5), 270-279.
- Wojno, K. J., & Epstein, J. I. (1995). The utility of basal cell-specific anti-cytokeratin antibody (34 beta E12) in the diagnosis of prostate cancer. A review of 228 cases. *Am J Surg Pathol*, 19(3), 251-260.
- Xiao, F. (2003). *The gene encoding human SCGB 2A1 is under indirect androgen control operating through an SP family binding site in prostate cells.* Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.

- Xiao, F., Mirwald, A., Papaioannou, M., Baniahmad, A., & Klug, J. (2005). Secretoglobin 2A1 is under selective androgen control mediated by a peculiar binding site for Sp family transcription factors. *Mol Endocrinol*, 19(12), 2964-2978.
- Xue, Y., Smedts, F., Verhofstad, A., Debruyne, F., de la Rosette, J., & Schalken, J. (1998). Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives. *Prostate Suppl*, 8, 62-73.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dotsch, V., McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, 2(3), 305-316.
- Zhao, C., Nguyen, T., Yusifov, T., Glasgow, B. J., & Lehrer, R. I. (1999). Lipophilins: human peptides homologous to rat prostatein. *Biochem Biophys Res Commun*, 256(1), 147-155.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

1.	Die Prostata des Erwachsenen.....	9
2.	Schematisches Diagramm von pRSET-B/SCGB 2A1.....	25
3.	Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung an paraffineingebettetem normalen Prostatagewebe.....	39
4.	Expression von SCGB 2A1 in <i>E. coli</i>	41
5.	Test der SCGB 2A1 Antiseren mit Western Blot.....	42
6.	Immunfluoreszenz: SCGB 2A1 Immunreaktivität in der Prostata und Kompetition gegen Antigen.....	44
7.	Expression von SCGB 2A1 im Prostataepithel.....	46
8.	Lokalisation von SCGB 2A1 in den Zellen der Prostata.....	47
9.	Expression von PSA und SCGB 2A1 im Prostataepithel.....	49
10.	Expression von SCGB 2A1 in der Prostata von BPH Patienten.....	51
11.	Expression von SCGB 2A1 in der humanen Prostata.....	52
12.	Modell zur prostatistischen Stammzellhierarchie.....	54

8.2. Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen, die mich durch die lange Zeit der Promotion begleitet haben:

Mein besonderer Dank Prof. Dr. Andreas Meinhardt und Dr. Jörg Klug für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die hilfreiche Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten und die Supervision meines Projektes. Besonders möchte ich mich bei Dr. Klug für die Geduld und für die Korrektur dieser Arbeit bedanken. Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie der Anatomie, insbesondere Suada Fröhlich und Eva Wahle danke ich für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Dr. Radu Iosub möchte ich für die Hilfe bei der Aufnahme, der in dieser Arbeit gezeigten Mikroskopie-Bilder danken! Prof. Andreas Schulz danke ich herzlich für die Bereitstellung von Prostataprobe für die Durchführung meiner Versuche.

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet. Ich danke Euch für Eure stete, liebevolle Unterstützung. Ihr habt mich immer auf meinem Weg begleitet und mich motiviert.

Meinem Bruder Vincent danke ich dafür, dass er mir immer zur Seite steht. Ich bin sehr froh, dass du da bist!

Meinem Mann Thorsten danke ich für Verständnis und Unterstützung.

Meine Kinder Benedikt, Jasper, Meira und Isabell: Ihr schenkt mir so viel Freude. Erst durch Euch ist mein Leben vollständig.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

8.4. Eigene Publikationen und eingereichte Arbeiten

Publikationen:

Dold L, Berger C, Luda C, Boesecke C, Schwarze-Zander C, Nischalke HD, Wasmuth JC, Rockstroh JK, Spengler U.

Single Nucleotide Polymorphisms associated with alimentary fatty liver disease are not genetic risk factors for treatment-associated hepatic steatosis in HIV patients on HAART

Open Access pub. Journal of Clinical research in HIV AIDS and Prevention (2013)

ISSN NO: 2324-7339

Dold L, Althausen E, Luda C, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Wasmuth JC, Strassburg C, Rockstroh JK, Spengler U.

Survival and HLA-B*57 in HIV/HCV Co-infected patients under highly active antiretroviral therapy (HAART)

Eingereicht

Poster:

Dold L, Baumgarten A, Lutz T, Karcher H, Kreckel P, Rausch M, Alshuth U, Goesseringer R, Rockstroh JK, Mauss S.

Higher Age leads to lower SVR rates in both, chronic hepatitis C (cHCV mono-) and cHCV/HIV coinfecting patients treated with Peginterferon alfa 2a and ribavirin (RBV)
Controversies in Hepatitis C (Berlin) 2012

Dold L, Althausen E, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Wasmuth JC, Strassburg C, Rockstroh JK, Spengler U.

HLA footprints of HIV and HCV in HIV/HCV co-infected patients
European Association for the Study of the Liver (Amsterdam) 2013

Dold L, Althausen E, Luda C, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Wasmuth JC, Strassburg C, Rockstroh JK, Spengler U.

Survival and HLA class I in HIV/HCV co-infected patients under highly active antiretroviral therapy (HAART)

Controversies in Hepatitis C (Berlin) 2014

Dold L, Althausen E, Luda C, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Wasmuth JC, Strassburg C, Rockstroh JK, Spengler U.

Überleben von HIV/HCV Co-infizierten Patienten: Einfluss von HLA und HAART
Kurzvortrag DGVS Leipzig 2014 (angenommen)

Auszeichnungen und Preise:

Erster 1. C-Hep Young Investigator Posterpreis für den Beitrag:

Dold L, Althausen E, Luda C, Schwarze-Zander C, Boesecke C, Wasmuth JC, Strassburg C, Rockstroh JK, Spengler U.

Survival and HLA class I in HIV/HCV co-infected patients under highly active antiretroviral therapy (HAART)

Controversies in Hepatitis C (Berlin) 2014

8.5. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“