

Aus der  
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Einfluss des Androgenrezeptors auf Metabolismus-  
assoziierte Gene von Prostatakarzinomzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Bührmann, Hendrik  
2025**



Aus der  
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Einfluss des Androgenrezeptors auf Metabolismus-  
assoziierte Gene von Prostatakarzinomzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Bührmann, Hendrik**

**2025**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Todenhöfer  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Heitmann

Tag der Disputation: 20.12.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>13</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>16</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Die Prostata</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 Das Prostata-Karzinom</b> .....	<b>18</b>
1.2.1 Epidemiologie .....	18
1.2.2 Entstehung.....	19
1.2.3 Diagnostik.....	19
1.2.4 Klassifikation.....	22
1.2.4.1 T-Stadium.....	22
1.2.4.2 Das N-Stadium und das M-Stadium.....	23
1.2.4.3 Die UICC Stadieneinteilung .....	23
1.2.4.4 Gleason-Score.....	24
1.2.4.5 Prognostic Grade Group .....	25
1.2.5 Verlauf.....	25
1.2.5.1 Therapie.....	26
1.2.6 Prognose.....	27
1.2.6.1 Überlebensraten.....	27
1.2.6.2 Klassifikation für Wachstum und Ausbreitung .....	28
1.2.6.3 Klassifikation für Rezidive.....	28
1.2.6.4 Histologische Marker .....	29
<b>1.3 Der Androgenrezeptor</b> .....	<b>31</b>
1.3.1 Der Androgenrezeptor .....	31
1.3.2 Gene mit Androgenabhängigkeit.....	32
1.3.2.1 KLK2 und PSA.....	32
1.3.2.2 TMPRSS2 .....	33
1.3.3 Gene des Glukosestoffwechsels .....	33
1.3.3.1 SLC2A1 .....	33
1.3.3.2 SLC16A3.....	34
1.3.3.3 LDHA .....	34
<b>1.4 Relevante Energiestoffwechselprozesse bei Karzinomzellen</b> .....	<b>35</b>

1.4.1	Warburg – Effekt.....	35
1.4.2	Reverser Warburg – Effekt und Laktat – Shuttle.....	35
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung dieser Arbeit.....</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1</b>	<b>Patientenkollektiv.....</b>	<b>38</b>
2.1.1	Einschlusskriterien .....	39
2.1.2	Ausschlusskriterien .....	40
<b>2.2</b>	<b>Gewinnung, Aufbereitung und Analyse der Gewebeproben .....</b>	<b>41</b>
2.2.1	Verwendete Arbeitsmaterialien .....	41
2.2.1.1	Verwendete Geräte .....	41
2.2.1.2	Verwendete Chemikalien und Substanzen.....	41
2.2.1.3	Verwendete Kits.....	42
2.2.1.4	Sonstige verwendete Materialien.....	43
2.2.1.5	Verwendete Software .....	44
2.2.2	Gewebe Gewinnung.....	44
2.2.3	Herstellung der Schnittpräparate .....	45
2.2.4	Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung.....	46
2.2.5	Histologische Begutachtung.....	47
2.2.6	Ermittlung der klinischen Daten .....	48
2.2.7	RNA-Isolierung aus tiefgefrorenem Frischgewebe .....	49
2.2.7.1	Prinzip .....	49
2.2.7.2	Vorbereitung des Arbeitsplatzes .....	52
2.2.7.3	Abwiegen und Gewebezerkleinerung.....	52
2.2.7.4	Aufreinigung der RNA-Lösung.....	53
2.2.7.5	DNase-Verdau .....	54
2.2.7.6	Weitere Aufreinigung der RNA-Lösung.....	54
2.2.7.7	Asservierung der RNA-Lösung und Qualitätskontrolle.....	55
2.2.7.8	Vortest zur Bestimmung der optimalen Menge an Frischgewebe für die RNA- Isolierung .....	56
2.2.8	Umschreiben in cDNA.....	58
2.2.8.1	Prinzip .....	58
2.2.8.2	Vorbereitende Anmerkungen zum Kit und zur Primerauswahl.....	58
2.2.8.3	Vorbereitung der Reagenzien .....	58
2.2.8.4	Berechnung der benötigten Menge RNA-Lösung.....	59
2.2.8.5	Durchführung der cDNA-Synthese .....	60
2.2.9	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	61
2.2.9.1	Der Gen-Strang .....	61
2.2.9.2	Funktionsprinzip der PCR / qPCR.....	62

2.2.9.3	Die Rolle des Housekeeping-Gens.....	63
2.2.9.4	Durchführung der qPCR .....	64
2.2.9.5	Ermittlung der Rohdaten .....	66
2.2.10	Berechnung der Ratio nach der $\Delta$ Ct-Methode.....	69
<b>2.3</b>	<b>Heranziehung von Daten aus der TCGA-Datenbank .....</b>	<b>70</b>
2.3.1	Auswahl und Download der Daten.....	71
2.3.2	Import der Daten in SPSS .....	73
<b>2.4</b>	<b>Statistische Analyse der ermittelten Daten.....</b>	<b>75</b>
2.4.1	Kodierung von Gleason-Score, T-Stadium und Risikogruppe.....	75
2.4.2	Deskriptive Statistik und Prüfung des Kollektivs auf Plausibilität .....	76
2.4.3	Nachweis der Korrelationen mittels Student's t-Test für unabhängige Stichproben .. .....	77
2.4.4	Zentraler Grenzwertsatz der Statistik.....	78
2.4.5	Darstellung der Ergebnisse .....	78
<b>2.5</b>	<b>Datenschutz .....</b>	<b>79</b>
<b>2.6</b>	<b>Ethik.....</b>	<b>80</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientenstammdaten.....</b>	<b>81</b>
<b>3.2</b>	<b>Klinische Daten.....</b>	<b>82</b>
3.2.1	Präoperative PSA-Werte.....	82
3.2.2	Tumorstadium nach TNM-Klassifikation.....	83
3.2.3	Kombinierter Gleason Score .....	84
3.2.4	Verteilung hinsichtlich Risikogruppe nach NCCN.....	84
<b>3.3</b>	<b>Prüfung des Kollektivs auf Plausibilität .....</b>	<b>85</b>
<b>3.4</b>	<b>Korrelation der experimentellen Daten mittels Student's t-Test für unverbundene Stichproben.....</b>	<b>87</b>
3.4.1	Korrelation der experimentellen Daten mit den Patientenstammdaten.....	87
3.4.1.1	Experimentelle Ergebnisse in Abhängigkeit vom Alter .....	87
3.4.2	Korrelation der experimentellen Daten mit den klinischen Patientendaten .....	88
3.4.2.1	T-Stadium.....	88
3.4.2.2	Nodalstatus.....	89
3.4.2.3	Gleason Summe .....	90
3.4.2.4	PSA-Wert.....	91
<b>3.5</b>	<b>Korrelation der experimentellen Ergebnisse von AR und seinen Down-Stream- Parametern und Vergleich mit der TCGA-Datenbank.....</b>	<b>92</b>
3.5.1	Deskriptive Statistik der TCGA-Daten.....	92
3.5.2	Korrelationen der eigen-experimentellen Ergebnisse in Abhängigkeit von AR.....	94

3.5.3	Korrelationen der TCGA-Daten in Abhängigkeit von AR .....	95
3.5.4	Graphische Gegenüberstellung der Korrelationen in Abhängigkeit von AR.....	97
3.5.4.1	KLK2 .....	97
3.5.4.2	TMPRSS2 .....	98
3.5.4.3	SLC2A1 .....	99
3.5.4.4	SLC16A3.....	100
3.5.4.5	LDHA .....	101
<b>3.6</b>	<b>Korrelation der Downstream-Parameter untereinander und Vergleich der eigenen Daten mit den TCGA-Daten .....</b>	<b>102</b>
3.6.1	Korrelationen der Daten in Abhängigkeit von KLK2 .....	102
3.6.1.1	Eigene Daten .....	102
3.6.1.2	TCGA-Daten.....	103
3.6.1.3	Graphische Gegenüberstellung.....	104
3.6.2	Korrelationen der Daten in Abhängigkeit von TMPRSS2.....	107
3.6.2.1	Eigene Daten .....	107
3.6.2.2	TCGA-Daten.....	107
3.6.2.3	Graphische Gegenüberstellung.....	108
3.6.3	Korrelationen der Daten in Abhängigkeit von SLC2A1.....	110
3.6.3.1	Eigene Daten .....	110
3.6.3.2	TCGA-Daten.....	110
3.6.3.3	Graphische Gegenüberstellung.....	111
3.6.4	Korrelationen der Daten in Abhängigkeit von SLC16A3.....	112
3.6.4.1	Eigene Daten .....	112
3.6.4.2	TCGA-Daten.....	112
3.6.4.3	Graphische Gegenüberstellung.....	113
3.6.5	Zusammenfassung der Korrelationen der eigenen Daten .....	114
3.6.6	Zusammenfassung der Korrelationen der TCGA-Daten .....	116
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>117</b>
4.1	Hintergrund und Übersicht.....	117
4.2	Patientenstammdaten und Plausibilitätsprüfung des Kollektivs .....	119
4.3	Korrelation der klinischen Daten .....	121
4.3.1	T-Stadium.....	121
4.3.2	Nodalstatus.....	121
4.3.3	Gleason-Summe.....	122
4.3.4	PSA .....	123
4.4	Korrelation der experimentellen Daten und Vergleich mit dem TCGA-Datensatz. .....	124

## Inhaltsverzeichnis

---

4.4.1	AR und AR-Aktivität .....	124
4.4.2	SLC2A1 und GLUT1 .....	126
4.4.3	SLC16A3 / MCT4, Laktatshuttle und LDHA / LDH .....	130
4.4.3.1	SLC16A3 und MCT4 .....	130
4.4.3.2	Der (reverse) Warburg – Effekt .....	132
4.4.3.3	LDHA bzw. LDH .....	134
<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>135</b>
<b>4.6</b>	<b>Limitationen der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>137</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>139</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>161</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>162</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Androgenrezeptor als nukleärer Transkriptionsfaktor .....	31
Abbildung 2: Selbsterarbeitete Anleitung zur RNA-Extraktion mittels RNeasy mini kit inklusive DNase-Verdau bis zum Einfrieren der RNA-Lösung, Seite 1.....	50
Abbildung 3: Selbsterarbeitete Anleitung zur RNA-Extraktion mittels RNeasy mini kit inklusive DNase-Verdau bis zum Einfrieren der RNA-Lösung, Seite 2.....	51
Abbildung 4: Beispielhafte Gesamtergebnisanzeige der Rohdaten eines Durchlaufs von UCHL-5 als Graph .....	66
Abbildung 5: Beispielhafte Ergebnisanzeige der Rohdaten der Duplikate der Probe 10-429 mit dem Gen SLC16A3 als Graph .....	67
Abbildung 6: Beispielhafter Ausschnitt einer Ergebnistabelle der Rohdaten .....	68
Abbildung 7: Screenshot der Oberfläche vom cBioPortal und der dort auszuwählenden Felder bis zum Download .....	72
Abbildung 8: Anfang des Textdokuments mit den heruntergeladenen Daten aus der TCGA-Datenbank.....	73
Abbildung 9: Histogramm zur Verteilung der präoperativ gemessenen PSA-Werte mit eingezeichneter erwarteter Häufigkeit bei Normalverteilung .....	82
Abbildung 10: Streudiagramm der eigenexperimentellen Ergebnisse von AR mit KLK2 .....	97
Abbildung 11: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit KLK2 .....	97
Abbildung 12: Streudiagramm der eigenen Daten von AR und TMPRSS2 .....	98
Abbildung 13: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit TMPRSS2.....	98
Abbildung 14: Streudiagramm der eigenen Daten von AR mit SLC2A1 .....	99
Abbildung 15: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit SLC2A1.....	99
Abbildung 16: Korrelation der eigenen Daten von AR mit SLC16A3 .....	100

Abbildung 17: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit SLC16A3.....	100
Abbildung 18: Streudiagramm der eigenen Daten von AR mit LDHA.....	101
Abbildung 19: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit LDHA .....	101
Abbildung 20: (links) Streudiagramm der eigenen Daten der KLK2-Ratio mit der TMPRSS2-Ratio.....	104
Abbildung 21: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von KLK2 mit TMPRSS2	104
Abbildung 22: (links) Streudiagramm der eigenen Daten der KLK2-Ratio mit der SLC2A1-Ratio .....	105
Abbildung 23: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von KLK2 mit SLC2A1 ...	105
Abbildung 24: (links) Streudiagramm der eigenen Daten der KLK2-Ratio mit der SLC16A3-Ratio .....	105
Abbildung 25: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von KLK2 mit SCL2A1 ...	105
Abbildung 26: (links) Streudiagramm der eigenen Daten der KLK2-Ratio mit der LDHA- Ratio .....	106
Abbildung 27: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von KLK2 mit LDHA.....	106
Abbildung 28: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von TMPRSS2 mit SLC2A1 .....	108
Abbildung 29: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von TMPRSS2 mit SLC2A1 .....	108
Abbildung 30: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von TMPRSS2 mit SLC16A3 .....	109
Abbildung 31: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von TMPRSS2 mit SLC16A3. .....	109
Abbildung 32: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von TMPRSS2 mit LDHA .....	109

Abbildung 33: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von TMPRSS2 mit LDHA  
..... 109

Abbildung 34: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von SLC2A1 mit SLC16A3  
..... 111

Abbildung 35: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von SLC2A1 mit SLC16A3  
..... 111

Abbildung 36: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von SLC2A1 mit LDHA.. 111

Abbildung 37: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von SLC2A1 mit LDHA.. 111

Abbildung 38: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von SLC16A3 mit LDHA 113

Abbildung 39: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von SLC16A3 mit LDHA 113

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische und histopathologische Ermittlung des T-Stadiums, modifiziert nach B. Helpap (1997).....	22
Tabelle 2: Histopathologische bzw. radiologische Ermittlung des N-Stadiums und des M-Stadiums, modifiziert nach (B. Helpap, 1997). .....	23
Tabelle 3: Ermittlung der Prognostic Grade Group durch die Gleason-Summe, in Anlehnung an (Schlomm and Sauter, 2016).....	25
Tabelle 4: Risikogruppen nach NCCN in Anlehnung an (Cancer.net, 2018). .....	28
Tabelle 5: WHO-Einteilung in prognostische Gruppen nach dem Gleason-Score in Anlehnung an (Gasser, 2019). .....	29
Tabelle 6: Ablaufplan der HE-Färbung .....	46
Tabelle 7: Ergebnis des Vortests zur Ermittlung der optimalen Menge Frischgewebe zur RNA-Extraktion. Die Probe 20* ist kurzfristig aufgetaut, die Kühlkette ist also unterbrochen worden. Mit dieser Probe ist nur für diesen Test weitergearbeitet worden.....	56
Tabelle 8: Beispielhafte Berechnungen der benötigten Menge an RNA-Lösung .....	60
Tabelle 9: Vergebene Ränge zur einfacheren graphischen Darstellung und vor allem für Berechnungen mit dem T-Stadium und der durch den kombinierten Gleason-Score ermittelten Risikogruppe (low/mid/high-risk carcinoma).....	75
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der klinischen Patientendaten.....	82
Tabelle 11: Verteilung der PSA-Werte.....	82
Tabelle 12: Verteilung der Tumorstadien: 49% der Patienten hatten ein T-Stadium niedriger als T3.....	83
Tabelle 13: Verteilung der Patienten nach kombiniertem Gleason-Score. Unterschieden ist die Gleason-Summe von 7 in 7a (3+4) und 7b (4+3).....	84

Tabelle 14: Tabelle zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Risikogruppen nach NCCN.....	85
Tabelle 15: Tests auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk. Signifikante Ergebnisse beweisen, dass keine Normalverteilung vorliegt. Nicht signifikante Ergebnisse weisen eine Normalverteilung nach, dies gilt nach beiden Tests für Körpergröße und Körpergewicht.....	85
Tabelle 16: Gruppenstatistik der experimentell bestimmten Daten in Abhängigkeit vom Patientenalter. ....	87
Tabelle 17: Gruppenstatistik der experimentell bestimmten Daten bei Gruppenbildung anhand des T-Stadiums. ....	88
Tabelle 18: Gruppenstatistiken der Einteilung der experimentell bestimmten Daten nach dem Nodalstatus.....	89
Tabelle 19: Gebildete Gruppen der experimentell bestimmten Daten nach dem kombinierten Gleason-Score.....	90
Tabelle 20: Gruppenstatistik der experimentell bestimmten Daten bei Gruppierung durch den präoperativ ermittelten PSA-Wert.....	91
Tabelle 21: Deskriptive Statistik zu den Daten aus der TCGA-Datenbank.....	92
Tabelle 22: Gruppenstatistik bei Einteilung der experimentellen Daten anhand der AR-Ratio.....	94
Tabelle 23: Gruppenstatistiken der TCGA-Daten von AR bei Aufteilung nach dem Median.....	96
Tabelle 24: Gruppenstatistiken der TCGA-Daten für AR bei Aufteilung nach dem Mittelwert.....	96
Tabelle 25: Gruppenstatistiken bei Einteilung der experimentellen Daten anhand der KLK2-Ratio.....	102
Tabelle 26: Gruppenstatistiken für die TCGA-Daten von KLK2.....	103
Tabelle 27: Gruppenstatistik der experimentellen Daten bei Einteilung nach der TMPRSS2-Ratio.....	107

Tabelle 28: Gruppenstatistiken für die TCGA-Daten von TMPRSS2.....	108
Tabelle 29: Gruppenstatistik bei Einteilung der experimentellen Daten anhand der SLC2A1-Ratio. ....	110
Tabelle 30: Gruppenstatistiken für die TCGA-Daten von SLC2A1 .....	110
Tabelle 31: Gruppenstatistik bei Einteilung der experimentellen Daten anhand der SLC16A3-Ratio. ....	112
Tabelle 32: Gruppenstatistiken für die TCGA-Daten von SLC16A3 bei Aufteilung nach dem Median.....	112
Tabelle 33: Zusammenfassung der mittels t-Test nachgewiesenen Korrelationen der Patientendaten mit den experimentell ermittelten Daten. Einseitige Korrelationen sind in Klammern gesetzt. ....	115
Tabelle 34: Zusammenfassung der mittels t-Test nachgewiesenen Korrelationen, einseitige Korrelationen in Klammern. ....	115
Tabelle 35: Zusammenfassung der im t-Test nachgewiesenen zweiseitig signifikanten Korrelationen für die TCGA-Daten mit Trennmarke Median.....	116
Tabelle 36: Zusammenfassung der im t-Test nachgewiesenen zweiseitig signifikanten Korrelationen für die TCGA-Daten mit Trennmarke Mittelwert. ....	116

## Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BPS	benignes Prostatasyndrom
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DRU	digital-rektale Untersuchung
ELISA	enzyme linked immuno sorbend essay
fPSA	freies PSA
GLUT1	Glukosetransporter Typ 1, kodiert durch das Gen SLC2A1
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
H.E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IGRT	Image Guided Radiation Therapy
ISUP	International Society of Urological Pathology
KLK2	Kallikrein related Peptidase 2
LDH(A)	Lactate Dehydrogenase (A)
LDR	low dose rate (Brachytherapie)
LK	Lymphknoten
MCT4	Monocarboxylat-Transporter 4, kodiert durch das Gen SLC16A3
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD(H)	(reduzierte Form vom) Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

## Abkürzungsverzeichnis

NCCN	National Comprehensive Cancer Network
OP	Operation
PCa	malignes Prostatakarzinom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie mit Computertomographie
PGG	Prognostic Grade Group
PIN	Prostatische Intraepitheliale Neoplasie
PSA	prostataspezifisches Antigen
p-Wert	empirisches Signifikanzniveau
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute = Umdrehungen pro Minute
SLC2A1	Solute Carrier Family 2 Member 1, kodiert GLUT1
SLC16A3	Solute Carrier Family 16 Member 3, kodiert MCT4
SPSS	Statistical Package für Social Sciences
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2
TNM	Klassifikation der UICC für Tumorerkrankungen für Primärtumor (T), lymphonodale Metastasen (N) und Fernmetastasen (M)
tPSA	totales PSA
TRUS	Transrektaler Ultraschall
UCHL5	Ubiquitin Carboxyl-Terminale Hydrolase L5
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
10-JÜR	10-Jahres-Überlebensrate

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Prostata

Die Prostata liegt an der Basis der Harnblase und umgibt dort die Urethra des Mannes. Sie besteht aus 30-50 Einzeldrüsen, die je einen eigenen Ausführungsgang in die Urethra haben. Sie ist von einer fibrösen Kapsel umgeben, die auch einige glatte Muskelzellen enthält. Nach dorsal grenzt sie an das Rektum, wo sie ca. 4 cm ab ano derb tastbar ist. Man teilt die Prostata nach McNeal in fünf Zonen ein. Klinisch am relevantesten sind die periurethrale Zone, in der die benigne Prostatahyperplasie zur Einengung der Urethra führt, sowie die periphere Zone, in der vorwiegend das maligne Prostatakarzinom entsteht. Letzteres führt im Regelfall nicht zur Einengung der Urethra und bleibt dadurch lange unerkannt. Diese beiden zellulären Veränderungen entstehen unabhängig voneinander, können also auch parallel in der gleichen Prostata vorhanden sein.

## 1.2 Das Prostata-Karzinom

### 1.2.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes, es macht 25,4% aller diagnostizierten Krebserkrankungen aus. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 bis 70,9 Jahren. Pro Jahr werden etwa 59.620 Neuerkrankungen verzeichnet. Die Prävalenz liegt zwischen 14 und 70 pro 100.000 Männern, wobei ein Nord-Süd- und ein West-Ost-Gefälle zu beobachten ist. Durch vermehrte Vorsorge mittels PSA-Test kommt es zur häufigeren Erkennung niedrigerer Stadien. 40% der Männer in der westlichen Welt bekommen irgendwann ein Prostatakarzinom, allerdings werden nur 10% symptomatisch und nur bei 3% führt es direkt zum Tod. Das relative 5-Jahres-Überleben liegt bei 93%, die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei 91%. Die Wahrscheinlichkeit, mit einem Prostatakarzinom zu versterben, ist höher als die Wahrscheinlichkeit, dass das Prostatakarzinom ursächlich für den Tod ist. (Institut, 2016, Leitlinienprogramm Onkologie & Deutsche Krebsgesellschaft, 2019)

### **1.2.2 Entstehung**

Die genauen Ursachen für die Entstehung eines Prostatakarzinoms sind im Wesentlichen unbekannt. Es gibt lediglich statistische Hinweise auf Risikofaktoren. Der wichtigste Risikofaktor für eine Erkrankung am Prostatakarzinom ist das hohe Lebensalter. Ein weiterer signifikanter Faktor ist eine positive Familienanamnese. So ist das relative Risiko verdoppelt, wenn ein erstgradiger Verwandter bereits an einem Prostatakarzinom erkrankt ist. Weiterhin ist das Prostatakarzinom assoziiert mit anderen Ernährungsweisen und sozioökonomischen Faktoren – dies wird wegen des Nord-Süd- und des West-Ost-Gefälles angenommen – und mit chronischen lokalen entzündlichen Prozessen. Nicht nachweisen konnte man einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit Vasektomien und Adipositas, ebenso wenig mit Testosteronsubstitution bei Hypogonadismus. Diabetes mellitus scheint statistisch gesehen eher protektiv hinsichtlich der Entstehung eines Prostatakarzinoms zu sein (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019).

Ein wichtiger Faktor für den Progress der Erkrankung scheint der Androgenrezeptor zu sein. Dies zeigt sich durch die Effektivität der antiandrogenen Hormontherapie bei Patienten mit hohen Stadien, wobei diese bei Patienten in niedrigen Stadien bisher nicht eingesetzt wird (Crawford et al., 2018).

### **1.2.3 Diagnostik**

Die Früherkennung ist als sehr ineffektiv zu bezeichnen. Viele der so erkannten Prostatakarzinome wären vermutlich niemals symptomatisch geworden, sodass dadurch vielfach eine Übertherapie erfolgt. Ein Vorteil der Früherkennungsmaßnahmen hinsichtlich des Überlebens konnte bisher nicht nachgewiesen werden, daher werden diese nicht allen Patienten empfohlen. Es ist schwierig, einerseits eine Übertherapie mit vorhandenen Nebenwirkungen zu vermeiden und gleichzeitig aber den richtigen Patienten in frühen Stadien noch eine Therapie mit kurativem Ansatz anbieten zu können (Sikaris, 2012). Daher wird in anderen Ländern, bspw. Dänemark kein standardisiertes Screening bei asymptomatischen Männern durchgeführt (Nguyen-Nielsen and Borre, 2016). Die Entwicklung neuer prognostischer Biomarker ist sehr aufwändig. Außerdem müssen auch immer die Kosteneffektivität und die tatsächliche Hilfe bei der klinischen Entscheidungsfindung mit einbezogen werden (Kretschmer and Tilki, 2017).

Am verbreitetsten ist der **PSA-Test**, der gerne von Hausärzten für Männer in der Altersgruppe von 45-70 Jahren angeboten wird. Die erhaltenen Werte sind allerdings sehr differenziert zu betrachten, da sie abhängig von der Prostatagröße, aber auch von der vorherigen lokalen physischen Belastung oder auch einer Entzündung der Prostata physiologisch erhöht sein können. Hierdurch gibt es einen Graubereich, in dem die Werte weitere Unsicherheit für den Patienten bedeuten und diese zum Teil unnötig weiter kontrolliert werden. Des Weiteren sind nicht-PSA-produzierende Prostatakarzinome zu erwähnen, bei denen dieser Test zur Detektion nicht fähig ist. Lediglich 1% der Männer profitierten von der flächendeckenden Durchführung von regelmäßigen PSA-Tests und der daraus resultierenden Therapie (Börgermann et al., 2006). Neuere Studien zeigen durch die Verwendung von Scoring-Systemen eine Verbesserung von Sensitivität und Spezifität und empfehlen die Bestimmung des PSA-Wertes in der fünften Lebensdekade zur Zuordnung zu einer Risikogruppe mittels dieses Baseline-PSA (Lakes and Arsov, 2019). Ebenfalls ist mit der PSA-Dichte, also dem Quotienten aus PSA und Prostatavolumen, ein neuer Wert entstanden, der gerade in niedrig- bis mittelgradigen Neoplasien eine bessere Trennschärfe bietet (Park and Yu, 2023).

Zusätzlich empfohlen wird die **digitorektale Untersuchung** (DRU). Diese sollte nach der Blutentnahme zur PSA-Testung erfolgen, um den Wert durch die Manipulation nicht künstlich zu erhöhen. Hierbei kann je nach Fingerlänge der untersuchenden Person nur der dorsale Bereich der Prostata abgetastet werden. Dies wiederum ermöglicht eine Detektion vor allem in höheren Stadien, ein frühes Prostatakarzinom kann aber leicht übersehen werden, vor allem, wenn es an anderer Stelle vorkommt. Die Sensitivität der DRU wird mit ca. 50-65%, die Spezifität mit 75-90% angegeben, je nach Quelle und auch Erfahrung des Untersuchenden deutlich schlechter (Koulikov et al., 2012). Dadurch ist sie als alleinige Maßnahme nicht ausreichend.

Sicherer, kostengünstig und schnell durchzuführen ist der **transrektale Ultraschall**, bei dem das gesamte Organ durchleuchtet werden und hinsichtlich Inhomogenitäten beurteilt werden kann. Dieser wird aber nicht regelhaft zur Früherkennung eingesetzt und hat ebenfalls seine Schwächen, da das Tumorgewebe oft isoechogen zur Prostata ist und somit nur schwierig detektiert werden kann. Hilfreich ist aber die Beurteilung hinsichtlich vermehrter Durchblutung und eines möglichen Kapseldurchbruchs, sowie

die mögliche Messung des Prostatavolumens (Aarnink et al., 1998, Smeenge et al., 2012).

Empfehlenswert ist die Durchführung einer **Magnetresonanztomographie (MRT)** des kleinen Beckens zur weiteren Beurteilung der Prostata. Hier können durch die Verwendung verschiedener Sequenzen neue Erkenntnisse über das Tumorausmaß und möglicherweise vorliegende Metastasen gewonnen werden. Des Weiteren können dadurch Stanzbiopsien aus gezielt ausgewählten Bereichen der Prostata erfolgen, was die Trefferquote von repräsentativen Tumorarealen deutlich steigert. Hierdurch können Patienten eher einer definitiven radikalen Therapie oder aber einem Active Surveillance Protokoll zugewiesen werden. In der Active Surveillance hat die MRT einen nur eher fraglichen Nutzen gegenüber der systematischen Stanzbiopsie (Lee et al., 2021, Sun et al., 2019b).

Die definitive Diagnosesicherung erfolgt beim Verdacht mittels **Stanzbiopsie**. Diese wird empfohlen bei Vorliegen von einem PSA-Wert  $\geq 4$  ng/ml unter Berücksichtigung der Einflussgrößen, bei einem karzinomverdächtigen Ergebnis bei der DRU, und bei einem auffälligen PSA-Anstieg im Serum. Hierbei werden aus zufällig oder MRT-gesteuert bewusst ausgewählten Bereichen der Prostata zehn bis 12 Gewebestanzungen entnommen und histologisch untersucht (Ismail and Gomella, 2013). Aktuelle Veröffentlichungen befürworten aus praktischer und mikrobieller Sicht den perinealen Zugang vor dem transanal (Chiu et al., 2022), zusätzlich sollte eher eine gesteuerte als eine systematische Stanzbiopsie erfolgen (Lv et al., 2023). Bei Nachweis von nur einer Prostatistischen Intraepithelialen Neoplasie (PIN) oder bei suspektem PSA-Verlauf sollte diese Biopsie nach Ablauf von sechs Monaten wiederholt werden, ebenso sollten im Rahmen der Active Surveillance wiederholt Stanzbiopsien erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019).

Sofern die Diagnose Prostatakarzinom gestellt werden konnte, erfolgt als nächstes das Staging mittels Abdomensonographie, Röntgen der Wirbelsäule, ggf. Ganzkörperzintigraphie bzw. besser Ganzkörper-MRT (Nakanishi et al., 2022) und ggf. die laparoskopische pelvine Lymphadenektomie.

## 1.2.4 Klassifikation

Am Ende der Diagnostik steht die Klassifikation des Prostatakarzinoms, anhand derer die Therapieentscheidung getroffen wird.

### 1.2.4.1 T-Stadium

Das T-Stadium beschreibt, wie groß der Primärtumor gewachsen ist und ob dieser die bestehenden Begrenzungen des Organs beachtet oder ob er über diese hinauswächst. Je größer und invasiver das Karzinom gewachsen ist, desto höher ist auch das T-Stadium. Eine erste Einschätzung des T-Stadiums kann bereits mittels der digital rektalen Untersuchung erfolgen – wenn sich zum Beispiel beide Prostatalappen verhärtet anfühlen, ist das ein Hinweis dafür, dass es sich mindestens um ein Stadium T2 handeln könnte. Sonographisch bzw. per MRT ließe sich dieser Verdacht bereits erhärten - ob tatsächlich noch keine einzelnen veränderten Zellen über die Organkapsel hinaus gewachsen sind, kann nur der Pathologe in seiner mikroskopischen Untersuchung sehen (B. Helpap, 1997).

T-Stadium	Beschreibung	T-Stadium	Beschreibung
pTX	Keine Beurteilbarkeit des Primärtumors	pT2b	> 50% eines Prostatalappens betroffen
pT0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor	pT2c	Beide Prostatalappen betroffen
pT1	Klinisch unauffälliger Tumor, nicht tastbar	pT3	Klinisch tastbarer Tumor mit invasivem Wachstum über die Organkapsel hinaus
pT1a	Akzidenteller Tumor, ≤ 5% des Gewebes betroffen	pT3a	Invasives Wachstum über die Organkapsel hinaus ohne Invasion der Samenblasen
pT1b	Akzidenteller Tumor, > 5 % des Gewebes betroffen	pT3b	Invasives Wachstum über die Organkapsel hinaus mit Invasion der Samenblasen
pT1c	Tumornachweis in Stanzbiopsie (bspw. bei erhöhtem PSA-Wert)	pT4	Invasives Wachstum in angrenzende Strukturen, ggf. Fixierung in der Umgebung.
pT2	Klinisch tastbarer Tumor, organbegrenzt	pT4a	Infiltration von Blasenhalshals / externem Sphinkter / Rektum
pT2a	≤ 50% eines Prostatalappens betroffen	pT4b	Infiltration von M. levator ani oder Fixation am Beckenrand

Tabelle 1: Klinische und histopathologische Ermittlung des T-Stadiums, modifiziert nach B. Helpap (1997).

### 1.2.4.2 Das N-Stadium und das M-Stadium

Das N-Stadium beschreibt den Befall der regionären Lymphknoten, wohingegen das M-Stadium Fernmetastasen beschreibt, welche sowohl andere Organe als auch weiter entfernte Lymphknoten betreffen können. Hierbei ist zu beachten, dass beispielsweise eine regionäre Lymphknoten-Metastase mit 1,5 cm Durchmesser und ein in maximaler Ausdehnung 3 cm messender Befall eines paraaortalen Lymphknotens nicht als Stadium N2 M0, sondern als N1 M1a beschrieben werden müsste. Um hier eine erste Idee vom Befallsmuster zu erhalten, wird mit den Kollegen der Radiologie zusammengearbeitet, die mittels Skelettszintigraphie leicht Skelettmetastasen erkennen können bzw. mittels Kontrastmittel-Computertomographie bereits Hinweise auf Fernmetastasen geben können (B. Helpap, 1997).

<b>N-Stadium</b>	Befall der regionären Lymphknoten?	<b>M-Stadium</b>	Befall anderer Organe?
<b>pNX</b>	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar	<b>pMX</b>	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
<b>pN0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	<b>pM0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>pN1</b>	Solitäre Lymphknotenmetastase, $\leq 2$ cm	<b>pM1</b>	Fernmetastasen vorhanden
<b>pN2</b>	Solitäre LK-Metastase $> 2$ cm und $\leq 5$ cm ODER multiple LK-Metastasen $\leq 5$ cm	<b>pM1a</b>	nicht regionäre LK
<b>pN3</b>	LK-Metastasen $> 5$ cm	<b>pM1b</b>	Skelettmetastasen
		<b>pM1c</b>	Metastasen in anderen Organen

Tabelle 2: Histopathologische bzw. radiologische Ermittlung des N-Stadiums und des M-Stadiums, modifiziert nach (B. Helpap, 1997).

### 1.2.4.3 Die UICC Stadieneinteilung

Anhand des TNM-Systems wird das Prostatakarzinom weiter nach UICC eingeteilt. Bis T2 N0 M0 gilt ein Prostatakarzinom als lokal begrenzt, bis T4 N0 M0 ist es lokal fortgeschritten. Ab N1 und/oder M1 ist ein Prostatakarzinom fortgeschritten bzw. metastasiert (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019)).

### 1.2.4.4 Gleason-Score

Die Einteilung nach dem Gleason-Score hat ebenfalls eine prognostische Bedeutung, da anhand dessen eine Einteilung in low-, mid-, oder high-risk Karzinome erfolgen kann. Hierzu wird jeweils das häufigste und das zweithäufigste Wachstumsmuster ermittelt.

Gleason 1 ist gut differenziert und es gibt nur kleine und gleichförmige Drüsen, dennoch ist eine gestörte Architektur vorhanden. Gleason 2 zeigt einen größeren Zwischenraum zwischen umschriebenen Herden von dichteren Drüsen, die in Form und Größe variabler sind. Bei Gleason 3 infiltrieren die Drüsenzellen an den Rändern, sind mittelgradig differenziert und stehen eher einzeln als gruppiert. In diesem Stadium ist auch ein papilläres oder cribriformes Wachstumsmuster möglich. Hier ist noch keine Nekrose vorhanden. Bei Gleason 4 imponieren unregelmäßige Zellmassen mit wenig Drüsenformationen. Es handelt sich um polymorphe Tumorzellen, teils mit klarem Zytoplasma. Häufig sind auch Mitosefiguren vorhanden. Bei Gleason 5 fehlen Drüsenkonfigurationen, es überwiegen papilläre, cribriforme oder solide Wachstumsmuster, entsprechend einem sehr schlecht differenzierten Karzinom. Es ist eine zentrale Nekrose möglich.

Klinische Relevanz hat vor allem der **kombinierte Gleason-Score**, bei dem die beiden häufigsten Wachstumsmuster addiert werden. Dabei ist es vor allem beim kombinierten Gleason-Score von 7 relevant, ob hauptsächlich ein Gleason 3 oder 4 vorlag. Daher benennt man die Gleason-Summe von 3+4 als 7a und die Gleason-Summe von 4+3 als 7b (Epstein et al., 2016).

### 1.2.4.5 Prognostic Grade Group

Die International Society of Urological Pathology (ISUP) schlägt statt der Gleason-Summe die Etablierung einer Prognostic Grade Group vor, deren Zusammensetzung folgender Tabelle entnommen werden kann.

Gleason-Summe	Prognostic Grade Group
3+3=6	PGG I
3+4=7a	PGG II
4+3 = 7b	PGG III
8	PGG IV
9-10	PGG V

Tabelle 3: Ermittlung der Prognostic Grade Group durch die Gleason-Summe, in Anlehnung an (Schlomm and Sauter, 2016).

Hierbei bliebe allerdings die Interobservervariabilität unbeachtet, da es oft Grenzfälle gebe, insbesondere zwischen Gleason 3 und 4. Es wird daher vorgeschlagen, neben den einzelnen Wachstumsmustern und der Summe ebenfalls ein Tertiärmuster mit anzugeben, das einen sehr geringen Anteil des Präparates ausmacht. Eine beispielhafte Aussage eines Pathologen solle also beispielsweise bei einem globalen Gleason von 3 mit sehr geringen Anteilen von Wachstumsmuster 4 statt 3+4=7a eher 3+3=6 (mit 5-10% Gleason 4) lauten, um dem behandelnden Urologen ein genaueres Bild des Tumors beschreiben zu können (Schlomm and Sauter, 2016).

### 1.2.5 Verlauf

Der Verlauf der Erkrankung bei jüngeren Patienten ist meist schlechter als bei Älteren. Dies ist damit zu erklären, dass bei betroffenen jüngeren Patienten oft ein aggressiveres Tumorwachstum zu beobachten ist als bei den Älteren, deren Tumoren oft langsamer wachsen und niedrigere Stadien aufweisen. Zusätzlich ist das karzinomspezifische Mortalitätsrisiko bei jüngeren Patienten höher (Abrahamsson, 1996). Eine weitere Einflussgröße könnte der Androgenspiegel sein, der nach dem 40. Lebensjahr langsam und kontinuierlich abfällt, bis er zum 70. Lebensjahr nur noch 2/3 des Ausgangswertes beträgt. Eine Abhängigkeit des Wachstums von den Androgenen wurde

schon erwähnt und lässt sich auch mit dem schlechteren Verlauf der jüngeren Patienten vereinbaren. Dennoch sei ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Prostatakarzinoms bei hypogonadalen Patienten und Androgensubstitution nicht zu beobachten (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019).

An Komplikationen sind Metastasierungen in pelvine Lymphknotenstationen und die Knochen – vor allem die lumbosakrale Wirbelsäule – zu nennen, wobei auch Filialisierungen der Leber häufiger vorkommen.

### 1.2.5.1 Therapie

Anhand des Stadiums und des Alters der Patienten können unterschiedliche Therapieoptionen angeboten werden. Die entsprechenden Therapieansätze sind in der *Interdisziplinären Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms* aufgeführt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019).

**Active Surveillance** ist sinnvoll im niedrigen Stadium. Das Konzept soll eine Übertherapie vermeiden und dennoch einen Progress frühzeitig erkennen, um eine kurative Therapie einleiten zu können. Hierfür sind regelmäßige Kontrolluntersuchungen notwendig. Es handelt sich hierbei um einen Therapieansatz mit kurativem Ziel.

Bei lokal begrenzten Tumoren ist auch eine **LDR-Brachytherapie** (Low Dose Rate) möglich, bei der der  $\gamma$ -Strahler Iod-125 in das Tumoreal eingebracht wird und über einen langen Zeitraum die erforderliche Strahlendosis appliziert.

Ist die Tumormasse größer, empfiehlt sich eine **radikale Prostatektomie**, bei Lymphknotenbefall ggf. mit Lymphadenektomie. Hier konnte durch die Verwendung der Laparoskopie und des DaVinci-Operations-Roboters das perioperative Risiko vermindert werden (Sridharan and Sivaramakrishnan, 2018). Zusätzlich ist das Outcome im Vergleich zur offenen bzw. rein laparoskopischen Operation hinsichtlich der Rate an postoperativer Inkontinenz und erektiler Dysfunktion verbessert worden (Gandaglia et al., 2015), wobei zur nervenschonenden Operation weitere Forschung notwendig sei (Stenzl, 2009). Einschränkend muss dennoch erwähnt werden, dass sich die Zeit bis zum Wiedereintritt ins tägliche Leben in Abhängigkeit von der Operationsmethode

nicht signifikant unterscheidet (Bier et al., 2016). Bei R1-Resektion oder Infiltration der Samenblasen kann zusätzlich eine Bestrahlung des Tumorbetts erforderlich sein.

Die **externe Bestrahlung** ist der radikalen Prostatektomie gleichberechtigt und ebenfalls ein kurativer Ansatz. Durch die IGRT (Image Guided Radiation Therapy) konnte die Lagerung des Patienten und damit die Konzentrierung der Strahlendosis verbessert werden. In höheren Stadien kann zusätzlich eine Hormontherapie notwendig sein.

Spätestens bei metastasierten Tumoren sollte eine **Hormontherapie** eingesetzt werden, welche eine Androgendeprivation an verschiedenen Stellen der Synthesekette bewirken soll. Verwendet werden GnRH-Analoga (Buserelin) und GnRH-Blocker (Abarelix), ggf. kombiniert mit Antiandrogenen (Flutamid), Androgenrezeptorenblocker (Enzalutamid), sowie weitere Chemotherapeutika wie Docetaxel. Eine operative Kastration mittels beidseitiger Orchiektomie kann alternativ erwogen werden (Gamat and McNeel, 2017).

Als letztes soll noch das **Watchful Waiting** als palliatives Therapiekonzept erwähnt werden, welches bei alten Patienten Anwendung findet, die meist weniger als 10 Jahre Restlebenserwartung und schwere Begleiterkrankungen haben und eher mit als an dem Prostatakarzinom versterben werden. Therapiert wird erst, wenn das Karzinom symptomatisch wird, wodurch Nebenwirkungen bei Übertherapie vermieden werden können.

## 1.2.6 Prognose

### 1.2.6.1 Überlebensraten

Bei stadiengerechter Behandlung haben Patienten bis T1 eine normale Lebenserwartung. T2-Patienten haben eine 5-Jahrenüberlebensrate (5-JÜR) von 80%, nach 10 Jahren (10-JÜR) leben noch 60%. Bei nicht metastasierten T3-Patienten beträgt die 5-JÜR 40%, die 10-JÜR nur noch 25%. Sobald ein Tumor das Stadium T4 oder M+ erreicht hat, ist die Lebenserwartung sehr unterschiedlich, meist beträgt sie nur einige Monate bis wenige Jahre (Gasser, 2019).

### 1.2.6.2 Klassifikation für Wachstum und Ausbreitung

Das National Comprehensive Cancer Network (NCCN) hat vier Risikogruppen etabliert, die die Wahrscheinlichkeiten von schnellem Wachstum und schneller Ausbreitung abbilden sollen. Diese basieren auf dem Tastbefund, der Prostatagröße, dem gemessenen PSA, den Ergebnissen der Stanzbiopsie, T-Stadium und Gleason-Score. Die jeweiligen Gruppen sind in der folgenden Tabelle 4 zu finden.

Risikogruppe nach NCCN	PSA [ng/ml]	T-Stadium	Gleason	Bemerkung
Very low risk	< 10	T1c	≤ 6	Tumor nicht tastbar und in der Bildgebung nicht sichtbar. Stanzbioptisch in < 3 Proben und ≤ 50% der Stanze Tumor nachgewiesen.
Low risk	< 10	T1a – T2a	< 6	
Intermediate risk	10 – 20	T2b oder T2c	7	2 Befunde reichen aus
High risk	> 20	T3a	8 – 10	2 Bedingungen müssen erfüllt sein
Very high risk		T3b oder T4	8 – 10	

Tabelle 4: Risikogruppen nach NCCN in Anlehnung an (Cancer.net, 2018).

Die Prostate Cancer Foundation (Foundation, 2019) fasst die Risikogruppen überscheidend nochmals zusammen in

- low risk mit PSA < 10 ng/ml und Gleason <6,
- intermediate risk mit PSA 10-20 ng/ml oder Gleason 7
- high risk mit PSA > 20 oder Gleason >8
- Very high risk mit ≥ T3b oder vielen positiven Stanzen

### 1.2.6.3 Klassifikation für Rezidive

In der aktuellen Leitlinie gibt es Risikogruppen für ein Rezidiv bei lokal begrenztem Prostatakarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019):

- Niedriges Risiko: PSA ≤ 10 ng/ml, Gleason-Score ≤ 6, T-Stadium ≤ T1c/T2a
- Mittleres Risiko: PSA > 10 ng/ml ≤ 20ng/ml ODER Gleason-Score 7 ODER T2b
- Hohes Risiko: PSA > 20ng/ml ODER Gleason-Score ≥ 8 ODER T-Stadium ≥ T2c

Die WHO teilt ebenfalls in prognostische Gruppen ein, allerdings basierend auf dem Gleason-Score:

Prognostische Gruppe	Gleason-Score	Biochemisch rezidivfreies 5-Jahres-Überleben	Behandlungsoptionen
1	3 + 3 = 6	97,5 %	Active surveillance
2	3 + 4 = 7	93,1 %	Radikale Prostatektomie bzw. Active surveillance bei ausgewählten Patienten
3	4 + 3 = 7	78,1 %	Radikale Prostatektomie oder Bestrahlung
4	4 + 4 = 8	63,6 %	Radikale Prostatektomie oder Bestrahlung, evtl. mit antiandrogener Therapie
5	9 und 10	48,9 %	

Tabelle 5: WHO-Einteilung in prognostische Gruppen nach dem Gleason-Score in Anlehnung an (Gasser, 2019).

#### 1.2.6.4 Histologische Marker

Zur Prognose stehen neben der TNM-Klassifikation, dem PSA-Wert und der reinen Histologie bzw. dem Gleason-Score nur wenig Parameter zur Verfügung. Nennenswert ist die Arbeit von Glen Kristiansen aus dem Jahr 2012, in der er solche immunhistochemische Marker beschreibt. Zur Diagnose verhelfen Basalzellmarker, gemeinsam mit dem infiltrativen Wachstum und der fehlenden Ausprägung der Basalzell-Zytokeratine.

In der Arbeit genannt werden das prostate cancer mucin-like antigen (PMA), die Alpha-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR), GOLM1, Fatty acid synthase (FASN) und die TMPRSS2-ERG-Genfusion als Nachweisparameter für Karzinome. Der prostatistische Ursprung könne mittels Prostate-specific antigen (PSA), Prostate-specific membrane antigen (PSMA), Androgen receptor (AR), Prostein (SLC45a3), ERG und NKX3.1 nachgewiesen werden.

Trotz all dieser Marker sei nach wie vor die konventionelle Morphologie der Zellen der Eckpfeiler der histologischen Diagnostik, da es immer auch Grenzfälle gebe, in denen diese typischen Marker vom Soll abweichen. Außerdem bestehe weiterhin das Problem, die Fälle mit einem insignifikanten Karzinom zu erkennen, also eben diese Patienten, bei denen ein Watchful Waiting einer chirurgischen Therapie vorzuziehen wäre. Es gebe zwar den Nachweis, dass auf Genebene eine vermehrte PITX2-Methylierung und eine PITX2-Runterregulierung mit einer schlechten Prognose einhergehen –

allerdings nur bei Patienten nach radikaler Prostatektomie und nicht im Biopsiestadium, wo eine solche Information sinnvoll wäre. Selbst die Ki-67-Färbung sei nicht als prognostischer Marker geeignet.

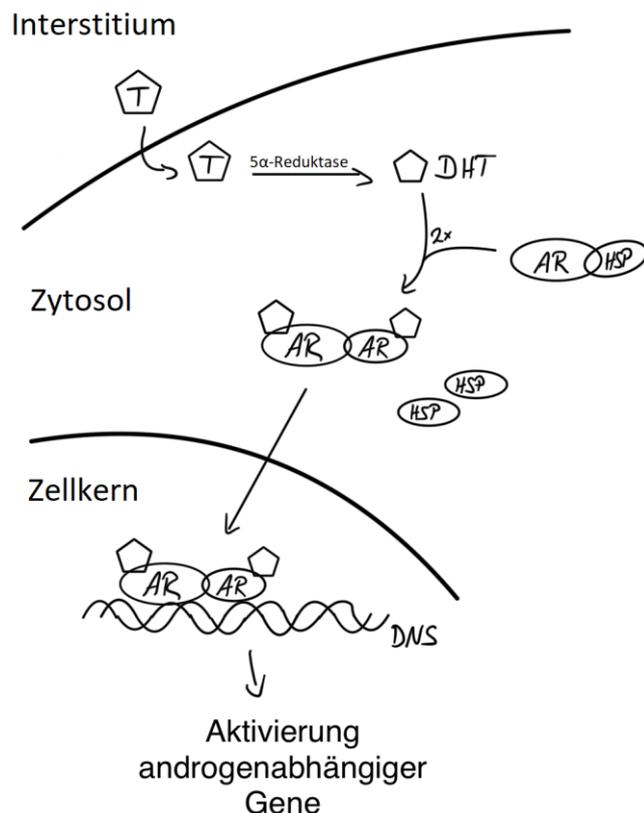
Es gibt also viele mögliche Marker, von denen aber bisher keiner einen wirklichen Aufschluss zur Prognose zum Zeitpunkt der Biopsie geben kann. Kristiansen behauptet sogar, dass es sinnvoller sein kann, bei niedrigem Gleason-Score auf solche Marker zu verzichten und sich eher nach der Histologie zu richten, während im Graubereich von Gleason 6-7 neue Biomarker zur Differenzierung wünschenswert wären (Kristiansen, 2012).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sehr viele Karzinome genau in diesen Graubereich fallen und eine Prognose für diese Patienten bisher sehr schwierig ist. Dies könnte durch das bessere Verständnis des zellulären Stoffwechsels in Zukunft deutlich vereinfacht werden.

## 1.3 Der Androgenrezeptor

### 1.3.1 Der Androgenrezeptor

Das AR-Gen kodiert für den Androgenrezeptor. Dieser ist in vielen Geweben vorhanden und ermöglicht die Wirkung der männlichen Geschlechtshormone auf die Zellen. Es handelt sich um einen nukleären Transkriptionsfaktor, der u.a. Proliferation, Apoptose, Migration, Invasion und Differenzierung reguliert (Culig and Santer, 2014). Er wird durch die Steroidhormone Testosteron und Dihydrotestosteron aktiviert. Bindet ein solches Androgen an den Androgenrezeptor, bewegt sich der Androgen-Rezeptor-Komplex in den Zellkern, wo er an die DNA bindet und dort androgenabhängige Gene reguliert (Medicine, 2019a). Klinische Relevanz hat der Androgenrezeptor vor allem bei der palliativen Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms mittels Androgenantagonisten. Nach zwei bis drei Jahren entwickelt sich das Karzinom meist zu einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom weiter, welches sich durch androgen-



unabhängiges Wachstum auszeichnet. Selbst beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom können Androgenrezeptorantagonisten verwendet werden, um das metastasenfreie Überleben um ca. zwei Jahre zu verlängern (Schwentner, 2019). Beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom wurde in 15-30% der Fälle eine Punktmutation im AR-Gen nachgewiesen und in 30-50% eine Genamplifikation (Fujita and Nonomura, 2019).

Abbildung 1: Der Androgenrezeptor als nukleärer Transkriptionsfaktor. Testosteron (T) gelangt in die Zelle und wird in Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Dieses bindet unter Abspaltung vom Hitzeschockprotein (HSP) an den Androgenrezeptor (AR). Zwei dieser Komplexe Dimerisieren und werden in den Zellkern transloziert, wo sie an ihre Zielgene der DNS binden und deren Expression regulieren. Modifiziert und vereinfacht nach (Lonergan and Tindall, 2011).

## 1.3.2 Gene mit Androgenabhängigkeit

### 1.3.2.1 KLK2 und PSA

Das KLK2-Gen kodiert für die Kallikrein related Peptidase 2 bzw. Kallikrein-2. Bei dem daraus gebildeten Protein handelt es sich um eine hochaktive Serin-Protease, die Pro-PSA zum biologisch aktiven PSA spaltet. Primär kommt es in Prostatagewebe vor (Medicine, 2019c). Es gibt bereits Hinweise auf ein vermehrtes Tumorstadium bei vermehrter Ausprägung in Prostata-Tumorzellen (Shang et al., 2014a). Ebenfalls gibt es Hinweise auf die vermehrte Bildung verschiedener anderer Subtypen je nach Androgenspiegel bzw. bei antiandrogener Therapie (Lai et al., 2014). KLK2 ist bereits 1997 mit hochgradigen Prostatakarzinomen in Verbindung gebracht worden (Darson et al., 1997). Der Marker wurde zeitnah zur Ermittlung der Prognose verwendet (Slawin et al., 2000) (Shariat et al., 2002) und später als mögliche Zielstruktur beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom genannt (Shang et al., 2014a). 2021 wurden andere KLK-Subtypen näher beleuchtet. Erwähnenswert sei hier eine erhöhte Ausprägung von KLK14 in der gemeinsamen Anzucht mit Osteoblasten. Über die gleichzeitige Aktivierung von KLK 2/3/14 und TGF $\beta$  werde symbiotisch das Wachstum der Osteoblasten und Prostatakarzinomzellen gefördert (Lovell et al., 2021). Diese erhöhte Ausprägung von KLK-Subtypen in Tumorgewebe könnte gegebenenfalls sogar chirurgisch durch Fluoreszenz nutzbar gemacht werden, um intraoperativ gesundes Gewebe von Tumorgewebe unterscheiden zu können (Lovell et al., 2021).

Das PSA ist ein in den *Ductuli prostatae* gebildetes Glykoprotein. Es wird in das Drüsenlumen abgegeben und trägt zur Verflüssigung des Ejakulates bei. Es spaltet auch das in der Samenblase gebildete Semenogelin, das die Spermien bewegungsunfähig macht und eine frühzeitige Kapazitation verhindert. Dadurch sind die Spermien nach der Durchmischung beider Sekrete voll beweglich. Ein kleiner Anteil des PSA gelangt physiologisch auch ins Blut, wo es als Marker für Prostatagewebe durch Radio- oder Enzymimmunoassays messbar ist (Wang et al., 2017).

### **1.3.2.2 TMPRSS2**

Das TMPRSS2-Gen kodiert für die Transmembrane Serine Protease 2. Es nimmt an vielen physiologischen und pathologischen Stoffwechselwegen teil. Die Protease kommt physiologisch am apikalen Teil des Prostataepithels vor. Von dem Gen ist bekannt, dass es durch Androgeneinfluss in Prostatakarzinomen vermehrt exprimiert wird und in Androgen-unabhängigen Prostatakarzinomen weniger stark exprimiert ist (GeneCards, 2019e). Durch den unphysiologischen Kontakt des Enzyms mit anderen Geweben im Rahmen der Tumorausbreitung und der damit ebenfalls einhergehenden Dislokation des Enzyms auf die gesamte Zellmembran wäre ebenfalls eine Rolle beim Tumorwachstum denkbar (Chen et al., 2010).

TMPRSS2 wurde beim Prostatakarzinom als hochreguliert erfasst, beim androgenunabhängig wachsenden Prostatakarzinom sei es aber herunterreguliert. Hierdurch könnte es als molekularer Marker für die Erkennung des Prostatakarzinoms hilfreich sein und bereits einen Hinweis auf eine bestehende Kastrationsresistenz geben. Dies sei auch prognostisch für das rezidivfreie Überleben nutzbar und war in der Arbeit spezifischer hierfür als der mikroskopisch bestimmte Nodalstatus (Lunger et al., 2021). Ko et al. haben herausgefunden, dass bei androgenabhängig erhöhter TMPRSS2-Aktivität die Matriptase aktiviert wird und durch Schädigung der Extrazellulärmatrix die Bildung von Metastasen, die lokale Invasivität und das Tumorwachstum fördert (Ko et al., 2015). Eine Aktivierung der Matriptase führte auch in Hautzellen zur Bildung von Karzinomen, während eine Inaktivierung der Matriptase zu weniger Tumorwachstum und weniger Metastasenbildung führte (Uhland, 2006).

### **1.3.3 Gene des Glukosestoffwechsels**

#### **1.3.3.1 SLC2A1**

SLC2A1 steht für Solute Carrier Family 2 Member 1 bzw. GLUT1. Es kodiert für den wichtigsten Glukosetransporter der Blut-Hirn-Schranke. Das Protein ist in der Zellmembran zu finden und transportiert Pentosen und Hexosen, wie Glukose, Gallensalze und organische Säuren. Das Protein ist für die basale Zuckeraufnahme zuständig. Dieser Zucker dient als Energiequelle und auch als Substrat der

Proteinbiosynthese und Lipidsynthese (GeneCards, 2019c). In Tumorzellen ist GLUT1 aufgrund des erhöhten Energiebedarfs vermehrt exprimiert, in experimentellen Studien wird nach einer Möglichkeit geforscht, diese Information therapeutisch nutzbar zu machen (Kapoor et al., 2016).

### **1.3.3.2 SLC16A3**

SLC16A3 steht für Solute Carrier Family 16 Member 3 und kodiert für den Monocarboxylic Acid Transporter 4 (MCT4). Dabei handelt es sich um einen protonabhängigen Transporter, der kurzkettige Monocarboxylate wie Laktat, Ketonkörper und Pyruvat in beide Richtungen durch die Zellmembran schleust. Hinzu kommt noch der Transport von Glukose, Gallensalzen und organischen Säuren, Metallionen und Aminosäurebestandteilen. Damit hat auch dieses Gen Funktionen der Energieversorgung und der Substratbereitstellung für die Proteinbiosynthese. Assoziiert mit dem Gen sind beispielsweise verschiedene Formen des Mammakarzinoms (GeneCards, 2019d). Wichtig ist dieser Transporter für Tumorzellen vor allem bei hypoxischem Stoffwechsel, um den zellinternen sauren pH-Wert ausgleichen zu können. Durch das Ausscheiden der sauren Stoffe in Verbindung mit den Protonen wird ebenfalls die Umgebung der Tumorzellen saurer und damit lebensunfreundlicher für die Nachbarzellen gestaltet (Hiremath et al., 2018). Ebenfalls gibt es neue Hinweise, dass eine verstärkte Ausprägung von SLC16A3 der Bildung einer pro-Tumor Immun-Mikroumgebung förderlich sein könnte (Xie et al., 2021).

### **1.3.3.3 LDHA**

Das Gen LDHA kodiert für die Lactate Dehydrogenase A. Diese katalysiert die Reaktion von Laktat und NAD zu Pyruvat und NADH, welches den letzten Schritt der anaeroben Glykolyse und einen Teil des Citratzyklus darstellt. Die alternative Glykolyse ist eine wichtige Funktion von Tumorzellen, die auf diese Weise ihren hohen Energiebedarf decken und gleichzeitig Biomasse aufbauen können (GeneCards, 2019b).

## 1.4 Relevante Energiestoffwechselprozesse bei Karzinomzellen

### 1.4.1 Warburg – Effekt

Im erstmals von Warburg veröffentlichten Paper wird beschrieben, dass Karzinomzellen primär einen anaeroben Stoffwechsel haben. Das in der Glykolyse entstehende Pyruvat wird demnach nicht in den Citratzyklus überführt, sondern zu Laktat verstoffwechselt. Hieraus ergeben sich für die Karzinomzellen mehrere Vorteile, da das entstehende Laktat als Radikalfänger diene und sich dadurch eine gewisse Resistenz gegenüber ionisierenden Strahlungen und Chemotherapeutika ergibt, welche über die Bildung von Radikalen ihre Wirkung zeigen. Die weiteren Metabolite können als Baustoff für eine schnelle Zellteilung verwendet werden. Nachteilig sei der bis zu 10-fach erhöhte Glukosebedarf der Karzinomzellen (Warburg et al., 1958).

Eidelman et al. schreiben, dass der Warburg-Effekt mit hohem Glukoseverbrauch erst bei späten und stark mutierten Prostatakarzinomzellen relevant werde und zuvor vor allem der Citratzyklus der Energiegewinnung diene, der in gesundem Prostatagewebe zur Citratproduktion blockiert sei (Eidelman et al., 2017).

### 1.4.2 Reverser Warburg – Effekt und Laktat – Shuttle

Cardoso et al. beschreiben ein Zusammenspiel von MCT4 und MCT1. MCT4 kommt in Prostatakarzinomzellen vor, wo es Apoptose inhibiert und Zellproliferation und -invasion beschleunigt. Zusätzlich sei MCT4 ebenfalls in den Fibroblasten des Stromas vorhanden, von denen so Laktat in die Umgebung der Tumorzellen exportiert werden könne. Dieses Laktat sorgt zum einen für einen sauren pH-Wert in der Tumorumgebung und könne zum anderen durch die MCT1 wieder in Tumorzellen importiert werden, wo es zu Pyruvat umgewandelt und schließlich dem Citratzyklus innerhalb der Mitochondrien als Substrat dienen könne. Hierdurch kann die Tumorzelle Energie in Form von NADH generieren (Cardoso et al., 2021, Bok et al., 2019).

Dieses Phänomen der Umprogrammierung der umgebenden Zellen ist bereits bei vielen Karzinomen bekannt und wird als **Reverser Warburg-Effekt** bezeichnet. Epitheliale Tumorzellen induzieren im normalen Stromagewebe die Produktion von energiereichen Metaboliten, indem diese eine Art Wundheilungsgewebe bilden, was wiederum der Angiogenese und dem Tumorwachstum förderlich sei. Dies gilt insgesamt

bei vielen Karzinomen bereits als schlechter Prädiktor (Pavlides et al., 2009, Pinheiro et al., 2012, Martinez-Outschoorn et al., 2014).

## 1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, aufgrund eines ausgewählten Kollektivs von Patienten mit Prostatakarzinom zu untersuchen, inwiefern bei Prostatakarzinomzellen in Abhängigkeit der Androgenrezeptor-Aktivität Veränderungen des Glukosestoffwechsels vorhanden sind und ob diese mit Downstream-Genen und klinischen Daten korrelieren. Um diese funktionellen Veränderungen des Glukosestoffwechsels in Prostatakarzinomen auf Genebene zu untersuchen, sollen die unten genannten Metabolismus-assoziierten Gene mittels qPCR auf ihre Expression hin geprüft werden und mit der Expression des AR und AR-Zielgenen verglichen werden. Es sollen sowohl die Expressionen der Parameter in Prostatakarzinom-Geweben als auch deren Interaktionen untereinander untersucht und mit den klinischen Daten der Patienten korreliert werden.

Die Androgenrezeptor-Aktivität soll über die Messung der Gene AR, KLK2 und TMPRSS2 dargestellt werden. AR ist das Gen für den Androgenrezeptor, der nach Aktivierung durch Androgene als Transkriptionsfaktor Wirkung zeigt. Hierdurch nimmt er beim Prostatakarzinom direkt oder über nachgeschaltete Gene Einfluss auf den Energiestoffwechsel und das Tumorwachstum. Nachgeschaltete Gene sind u.a. KLK2 und TMPRSS2. KLK2 ist neben der Bildung von PSA mitverantwortlich für die Regulation von IGF-Transport und -Aufnahme, es ist mit dem Prostatakarzinom assoziiert. Eine vermehrte Ausprägung von TMPRSS2 geht mit aggressiveren und früher metastasierenden Tumoren einher.

Für einen Rückschluss auf den Glukosestoffwechsel sollen die Gene SLC2A1, SLC16A3 und LDHA bestimmt werden. SLC2A1 kodiert mit GLUT1 für ein wichtiges Glukosetransportprotein. LDHA katalysiert die Bildung von Pyruvat zu Laktat unter anaeroben Bedingungen. SLC16A3 kodiert für den Laktattransporter MCT4.

Eine potenzielle Korrelation des AR mit Metabolismus-assoziierten Genen könnte wichtige Implikationen für die Behandlung von fortgeschrittenen Tumoren haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

In die Studie eingeschlossen wurden diejenigen Patienten, die sich aufgrund eines diagnostizierten Prostatakarzinoms an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen vorstellten und dort einer Prostatektomie unterzogen worden sind. Ebenfalls musste zwingend durch den Patienten eine Einverständniserklärung zur Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken unterschrieben worden sein.

Um für eine zukünftige Follow-Up-Studie nicht zu lange warten zu müssen, wurde willkürlich der 01.03.2012 als Stichtag bestimmt, vor dem die Operation stattgefunden haben musste. Von diesem Datum aus wurden in Richtung Vergangenheit alle an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen operierten Patienten hinsichtlich des Zutreffens der Einschlusskriterien evaluiert.

Für die vorliegende Arbeit wurde zunächst ein Ausgangskollektiv erstellt. Dieses beinhaltete nur prostatektomierte Patienten mit OP-Datum zwischen dem 01.01.2003 und dem 01.03.2012.

Von diesen Patienten wurde das Vorliegen einer in Paraffin gegossenen Frischgewebeprobe überprüft und von diesen ein Schnittbild erstellt. Diese H.E.-gefärbten Schnitte wurden durch Dr. Marcus Scharpf (Institut für Pathologie, Uniklinik Tübingen) hinsichtlich des Tumoranteils in der analysierten Ebene befundet. Die pathologische Untersuchung zur Histologie am Ort musste einen Tumoranteil von > 40% Tumorgewebe in dem asservierten Frischgewebe nachweisen, da hauptsächlich Tumorgewebe analysiert werden sollte. Von den übrig gebliebenen 132 Patienten wurden diejenigen nicht einbezogen, die entweder eine seltene Tumorkonstellation oder einen Sekundärtumor vorzuweisen hatten oder zu wenig klinische Daten in der Akte zu finden waren. Die vorgefundenen klinischen Daten wurden auf einem nicht mit dem Internet verbundenen Computer der Klinik in einer passwortgeschützten Datenbank gespeichert. Zu den gespeicherten Daten zählen zum Beispiel der vor OP gemessene PSA-Wert und die pathologisch ermittelten Gleason-Werte.

Nach Inventur des -80°C-Kühlschranks wurden wiederum alle Patienten aus der Studiendatenbank entfernt, bei denen trotz Eintrag in der Kühlschrank-Datenbank kein Frischgewebe vorlag.

Übrig blieben 102 Patienten, von denen folgende Daten vorliegen: der vor OP gemessene fPSA-Wert, das im TRUS gemessene Prostatavolumen, das Gewicht und die Größe des Patienten, das OP-Datum, die entsprechende Probennummer aus dem Labor der Klinik für Urologie, der Tumoranteil der Histologie am Ort, das in der Pathologie bestimmte Volumen und das Gewicht der entnommenen Prostata, die TNM-Klassifikation und der Gleason-Score. Bei drei Patienten ist teils der Pathologiebericht unvollständig und teils die sonstige Dokumentation der Patientendaten lückenhaft. Diese Patienten werden bei der Analyse der entsprechenden klinischen Daten gesondert als fehlend aufgeführt. Ein Ausschluss erfolgte nicht, da das Probenmaterial von sehr guter Qualität war und die vorhandenen Daten zur statistischen Auswertung ausreichend waren.

### **2.1.1 Einschlusskriterien**

- Primärtumor der Prostata
- Vorstellung des Patienten in der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen
- Prostatektomie vor dem 01.03.2012
- Unterschriebene Einverständniserklärung zur Gewebeasservierung für Forschungszwecke
- Vorliegen von asserviertem Kryo-Frischgewebe
- Histopathologischer Nachweis von > 40 % Tumoranteil im Frischgewebe
- Vorliegen eines Paraffin-Blocks mit asserviertem Frischgewebe aus dem Tumorgebiet in ausreichender Menge für alle Untersuchungen, auch für Folgearbeiten mit Micro Arrays zur Beurteilung der Proteinebene.
- Möglichst vollständiger histologischer Pathologiebefund mit TNM-Klassifikation, Gleason-Score, Resektionsstatus, Prostatagewicht und -volumen

### **2.1.2 Ausschlusskriterien**

- Sekundärer Tumor der Prostata laut Pathologiebefund.
- Histologie am Ort mit < 40 % Tumorgewebe.
- Zu wenig asserviertes Gewebe für alle Untersuchungen.
- Seltenerer Patienten- bzw. Tumorkonstellationen, die für andere Studien geblockt sind.

## 2.2 Gewinnung, Aufbereitung und Analyse der Gewebeproben

### 2.2.1 Verwendete Arbeitsmaterialien

#### 2.2.1.1 Verwendete Geräte

Cooling Plate COP 30	Medite GmbH (Burgdorf, D)
Eppendorf Multipette M4	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Reference 2 100-1000µl blau	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Reference 2 20-200µl gelb	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Reference 2 2-20µl gelb	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf Reference 2 0,1-2,5 µl grau	Eppendorf (Hamburg, D)
Mikroskop Zeiss Olympus	Carl Zeiss AG (Jena, D)
Mikrotom, Leica RM2125RT	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Mikro 200, Mikroliterzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG (Tuttlingen, D)
Präzisionswaage Kern EG620-3NM	Kern & Sohn GmbH (Balingen, D)
Spectrophotometer ND 1000	Nanodrop (Wilmington, USA)
Step One Plus, Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Tissue Flotation Bath TFB 45	Medite GmbH (Burgdorf, D)
TissueRuptor	Qiagen (Hilden, D)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, USA)

#### 2.2.1.2 Verwendete Chemikalien und Substanzen

Eosin	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Ethanol 99%, vergällt	SAV LP GmbH (Flintsbach, D)
Formaldehyd 37%	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hämatoxylin	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Leitungswasser	Stadtwerke Tübingen (Tübingen, D)

β-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Paraffin	McCormick Scientific (St. Louis, USA)
RNase away	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNase free Water	Qiagen (Hilden, D)
VectaMount H5000 permanent mounting medium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Xylol (Normapur)	VWR International GmbH (Fontenay-Sous-Bois, Fr)

### 2.2.1.3 Verwendete Kits

QIAquick Purification Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAshredder	Qiagen (Hilden, D)
Omniscript® Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden, D)
Reverse Transcription System A3500	Promega Corporation (Madison, USA)
RNase free DNase Set	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
TaqMan® Gene Expression Assay SM	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Assays MTO Hs00171172_m1 (AR)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Assays MTO Hs02800695_m1 (HPRT1)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Assays MTO Hs00428384_g1 (KLK2)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Assays MTO Hs01378790_g1 (LDHA)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Assays MTO Hs00892681_m1 (SLC2A1)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Assays MTO Hs00358829_m1 (SLC16A3)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

TaqMan® Gene Expression Assays MTO Hs01122322_m1 (TMPRSS2)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® Gene Expression Assays MTO Hs01044475_m1 (UCHL5)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

#### 2.2.1.4 Sonstige verwendete Materialien

Biosphere Filter Tips 0,1-2,5 µl	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Deckgläser 24x60 mm	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MicroAmp™ 96-Well Support Base	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Objektträger 25x75x1,0 mm	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 0,1-10µl (grau)	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 2-20µl (gelb)	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 20-200µl (gelb)	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 50-1000µl (blau)	Eppendorf (Hamburg, D)
TissueRuptor Disposable Probes	Qiagen (Hilden, D)

### 2.2.1.5 Verwendete Software

cBioPortal for Cancer Genomics	Memorial Sloan Kettering Cancer Center (New York, USA)
Endnote X8	Clarivate Analytics (Philadelphia, USA)
IBM SPSS Statistics 25 für PC	IBM Deutschland GmbH (Ehningen, Deutschland)
Microsoft Excel 365	Microsoft Corporation (Redmont, USA)
Microsoft Word 365	Microsoft Corporation (Redmont, USA)
Mozilla Firefox	Mozilla Corporation (Mountain View, USA)
StepOnePlus Software v2.3	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

### 2.2.2 Gewebegewinnung

Analog zum Vorgehen von Lutz et al. 2018 wurde unmittelbar nach der OP eine Gewebeprobe direkt aus dem vermuteten Tumorareal entnommen. Hierzu wurden Informationen wie die präoperative Bildgebung, die Lage der positiven Stanzbiopsien, sowie die taktile und visuelle (Schnittfläche) Untersuchung des Prostataktomiepräparates zusammengeführt und aus dem tumorverdächtigsten Areal eine kleine längliche Gewebeprobe von ungefähr 5 x 5 x 3 mm entnommen und gesondert von dem Restpräparat aufgearbeitet. Die entnommene Probe wurde in drei gleichgroße Teile zerschnitten. Die beiden äußeren Drittel wurden zur bestmöglichen Erhaltung der mRNA sofort mittels Flüssigstickstoff gekühlt, in bereits vorher beschriftete Gewebeprobentrichterchen überführt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Das mittlere Drittel wurde in Formalin eingelegt, anschließend entwässert und durch die Pathologie in einen Paraffinblock verarbeitet, der die histologische Beurteilung der entnommenen Probe erlaubte (Lutz et al., 2018a).

### **2.2.3 Herstellung der Schnittpräparate**

Aus jedem Paraffin-Block musste nun ein Schnittbild gefertigt werden, um die Histologie am Ort bestimmen zu können. Der durch die Abteilung für Pathologie hergestellte Paraffin-Block wurde mit Hilfe der Kühlplatte auf  $-5^{\circ}\text{C}$  gekühlt, um den Block besser schneiden zu können und das Schnittergebnis zu verbessern. Im Anschluss daran wurde der Block in das Mikrotom gespannt und darauf geachtet, dass die Blöcke immer in der gleichen Ausrichtung fixiert wurde. Dadurch war das Risiko übermäßigen Gewebeverlusts im Falle eines erneuten Schneidens vermindert. Das Anschneiden eines Paraffin-Blocks wurde mit Schnitten mit  $20\ \mu\text{m}$  Dicke durchgeführt, bis das fixierte Gewebe vollständig in einem repräsentativen Abschnitt zur Darstellung kam. Aus diesem Gebiet wurden nun zwei bis vier Schnitte mit  $5\ \mu\text{m}$  Dicke erstellt, die unter Zuhilfenahme eines Pinsels und eines Skalpells in ein Wasser-Ethanol-Bad mit Raumtemperatur überführt wurden. Dieses enthielt ca. 5 ml Ethanol auf 500 ml demineralisiertes Wasser, was das Aufspreiten der Schnitte begünstigte. Hier wurden auch mit dem Skalpell überflüssige Paraffinränder entfernt, die den kommenden Arbeitsschritt behindern könnten. Die so bearbeiteten Schnitte wurden mit einem Objektträger in das warme Wasserbad gebracht. Dieses enthielt reines demineralisiertes Wasser und war ca.  $55^{\circ}\text{C}$  warm. Bei dieser Temperatur wurde die Glättung des Paraffins noch weiter verbessert. Die so ganz glatten Schnitte wurden auf den bereits mit der zugehörigen Nummer beschrifteten Objektträger übernommen, sodass möglichst wenig Wasser unter der Paraffinschicht blieb. Der Objektträger wurde kurz so getrocknet, dass überschüssiges Wasser von unterliegendem Zellstoff aufgenommen werden konnte. Die bis hier intakte Paraffinschicht wurde nun mit dem Skalpell zerstört, ohne das Gewebe zu verletzen oder zu verschieben. Dieser Vorgang förderte den Trocknungsprozess und erleichterte den Schmelzvorgang vor der HE-Färbung. Der Objektträger wurde für ca. 15 Minuten auf den Rand des Gewebewasserbads gelegt und anschließend in eine offene Münchner-Mappe einsortiert. In dieser trockneten die Schnitte für mindestens 24 Stunden, bevor die HE-Färbung durchgeführt werden konnte, ohne dass sich die Gewebeschnitte vom Objektträger lösen.

## 2.2.4 Hämatoxilin-Eosin (H.E.) Färbung

Nach der beschriebenen Trocknung wurden die Objektträger im Trockenschrank bei 60°C für 30 Minuten aufgewärmt. Dadurch verflüssigte sich das Paraffin und konnte auf untergelegte Zellstofftücher abtropfen. Anschließend wurden die noch warmen Schnitte nach dem in der Tabelle 6 genannten Schema und den angegebenen Zeiten in der richtigen Reihenfolge in Bäder der genannten Medien gestellt, sodass die Objektträger vollständig von der jeweiligen Flüssigkeit bedeckt waren:

Station	Zeit	Medium	Besonderheit
1	10 Min.	Xylol	
2	10 Min.	Xylol	
3	10 Min.	Xylol	
4	5 Min.	Ethanol 100%	
5	5 Min.	Ethanol 100%	
6	5 Min.	Ethanol 96%	
7	5 Min.	Ethanol 96%	
8	5 Min.	Ethanol 70%	Lagerung $\geq$ 5 Minuten möglich
9	5 Min.	Hämatoxylin-Lösung	
10	15 Min.	Fließendes Leitungswasser	Alkalischer pH zum Färben des Hämatoxylins
11	2 Min.	Eosinlösung	
12	20 Sek.	Ethanol 96%	
13	20 Sek.	Ethanol 96%	
14	3 Min.	Ethanol 100%	
15	5 Min.	Ethanol 100%	
16	5 Min.	Xylol	
17	5 Min.	Xylol	Längere Aufbewahrung möglich
18	5 Min.	Xylol	Längere Aufbewahrung möglich

Tabelle 6: Ablaufplan der HE-Färbung

Es musste unter dem Abzug gearbeitet werden, da Xylol und Ethanol leicht flüchtige und gesundheitsschädliche Substanzen sind.

Nach Station 18 wurden die Schnitte jeweils zuerst mit Hilfe von Zellstofftüchern auflegend getrocknet und danach mit einem Plastikstab mit VectaMount (Vecta Laboratories, Burlingame, California, USA) betropft und mit einem Deckgläschen 24 x 60 mm

abgedeckt. Die Schnitte mussten nun erneut für 24 Stunden trocknen, damit die Fixierlösung erhärten konnte.

Als Ergebnis der Färbung waren die Zellkerne hell- bis kräftig blau gefärbt und ließen sich gut von dem nun rot bis rosa gefärbten Zytoplasma, Bindegewebe und der Muskulatur differenzieren.

Im Anschluss an diese Trocknung wurden die Schnitte dem Pathologen mit einer Übersichtstabelle zur Befundung und Bestimmung des Tumorgehalts am Ort übergeben.

### **2.2.5 Histologische Begutachtung**

Die histopathologische Untersuchung der asservierten Gewebeproben erfolgte unabhängig von der Untersuchung der gesamten Prostata im Rahmen der Behandlung des Patienten, da letztere therapierelevant war und zum Zeitpunkt der Studie bereits durchgeführt worden war. Die Untersuchung der Asservate ist entweder bereits im Rahmen vorhergehender Studien erfolgt oder bei der Zusammenstellung des Kollektivs dieser Arbeit durchgeführt worden. Hierzu wurde, wie beschrieben, von jedem ausgewählten Asservat ein Schnitt in H.E.-Färbung erstellt.

Die Begutachtung zur Ermittlung der Histologie am Ort wurde durch Dr. Marcus Scharpf (Universitätsklinik Tübingen, Institut für Pathologie) durchgeführt, da er in Tübingen einer der auf Prostatakarzinome spezialisierten Pathologen ist. Er ermittelte, wie viel Prozent des jeweiligen Präparates der Tumor ausmachte. Hierzu wurde vom histologischen Schnitt das Stroma herausgerechnet und der Rest als 100% definiert. Dieser Rest enthält nun normale Drüsenstrukturen neben Tumorarealen. Das mir mitgeteilte Ergebnis der „Histologie am Ort“ entspricht dem durch den Pathologen abgeschätzten Tumoranteil in Prozent von den vorher definierten 100%. Dieser Anteil wurde auf die direkt daneben liegenden, initial in Flüssigstickstoff asservierten Lamellen extrapoliert, sodass dort auch von einem ähnlichen Tumoranteil ausgegangen werden konnte, wie es ebenfalls bei der Arbeit von Lutz et al. 2018 geschehen ist (Lutz et al., 2018a). Für die Verwendung einer Probe in dieser Arbeit wurde gefordert, dass der Tumoranteil mindestens 40% des repräsentativen Schnittes entspricht und dass tatsächlich ein Prostatakarzinom vorlag. In diesem Schritt erfasste Blasenkarzinome oder Sarkome wurden aussortiert und der gesamte Patient aus der Studie eliminiert.

Eine erneute Auswertung hinsichtlich T-Stadium, N-Stadium und Gleason-Score erfolgte nicht, da hierzu die Gesamtheit der Prostata gemeinsam mit weiteren Daten betrachtet werden muss und diese Begutachtung bereits direkt nach der Operation erfolgt war. Diese Daten wurden aus dem histopathologischen Bericht des gesamten Prostatektomiepräparates entnommen. Eine Erläuterung zu T- und N-Stadium, sowie dem Gleason-Score findet sich in den Kapiteln 1.2.4, 1.2.4.2 und 0.

### **2.2.6 Ermittlung der klinischen Daten**

Zur Feststellung, inwiefern die rekrutierten Patienten der Grundgesamtheit ähnlich sind, und zur weiterführenden Auswertung und Korrelation der analysierten Gene mit klinischen Daten mussten neben den experimentell bestimmten Daten eben diese klinischen Daten ermittelt werden. Hierzu wurde auf die elektronische klinische Akte des Falls zugegriffen und die entsprechenden Daten in anonymisierter Form in eine Datenbank übertragen.

Aus dem Protokoll der Anästhesieaufklärung konnten Körpergröße und -gewicht ermittelt werden.

Im histopathologischen Bericht fanden sich Daten zu T-Stadium, N-Stadium, Gleason-Score, Resektionsstatus und Prostatagewicht. Die Stadien und Scores konnten jeweils mit den Daten aus dem Entlassbrief abgeglichen werden.

Im Entlassbrief war meist der präoperativ ermittelte PSA-Wert im Blut und das im TRUS ermittelte Prostatavolumen aufgeführt. Aus Geburtsdatum und OP-Datum lässt sich das Alter bei der OP berechnen. Hierzu wurden beide Daten in eine dafür angelegte Exceltabelle eingetragen, welche automatisch das Alter bei der OP berechnete. Anschließend wurde in der Arbeitsdatenbank eine laufende Nummer vergeben und dort nur das Alter bei OP eingetragen, sodass von dort aus kein Rückschluss mehr auf einzelne Patienten möglich ist.

Dieser Schritt erfolgte vor der weiteren Arbeit mit den Gewebeproben, um die Patienten zusätzlich dahingehend durchleuchten zu können, ob beispielsweise ein sekundäres Karzinom vorlag. Diese Patienten mit Sekundärkarzinom, bspw. Sarkom oder Blasenkarzinom, wurden eliminiert, selbst wenn in der Histologie am Ort davon nichts zu

erkennen war. Sofern in der Krankengeschichte nichts Auffälliges zu finden war, erfolgte das Heraussuchen der Kryogewebeprobe und die weitere Arbeit im Labor.

### **2.2.7 RNA-Isolierung aus tiefgefrorenem Frischgewebe**

#### **2.2.7.1 Prinzip**

Im verwendeten Kryogewebe ist die mRNA nicht frei, sondern in den Gewebe- bzw. Zellverbänden fixiert. Zur Darstellung der mRNA-Expression musste die mRNA also zuerst aus dem Gewebe freigesetzt und isoliert werden. Hierbei galt zu beachten, dass ubiquitär RNasen vorkommen, die freie RNA abbauen. Ebenfalls waren in den Proben DNasen vorhanden, die das spätere Umschreiben und Lagern der RNA in DNA verhindern würden.

Da im Labor der Universitätsklinik für Urologie Tübingen bisher kein Protokoll für die RNA-Isolierung vorhanden war, musste eines erstellt werden. Hierzu wurde auf bestehende Protokolle und Erfahrungen aus dem Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen zurückgegriffen und ebenfalls eigene Testreihen mit überschüssigem Gewebe durchgeführt.

Der Ausdruck der selbst erarbeiteten Anleitung zur RNA-Isolierung mittels RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und zum DNase-Verdau mittels RNase free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) für den Laborarbeitsplatz befindet sich als Abbildung 2 und Abbildung 3 auf den nächsten Seiten.

## RNA-Extraktion mittels RNeasy mini kit

### Vorbereitung:

1. 10µl β-Mercaptoethanol (β-ME) pro 1 ml Puffer-RLT zufügen.  
Lagerung bis 1 Monat bei 15-25°C.
2. Puffer-RPE-Konzentrat mit 96-100% Ethanol verdünnen. Menge siehe Etikett (260 ml)

### Durchführung:

1. **20 - 30 mg Gewebe** auf Trockeneis abwiegen. (Richtlinie: Würfel mit 3mm Kantenlänge entspricht 30-35 mg)
2. Gewebezerkleinerung und Homogenisierung in **200 µl RLT** (unter Abzug pipettieren wegen β-ME, siehe Vorbereitung!). Die Homogenisierung muss möglichst gut gemacht werden, sonst klumpt es später und die Membran der Säule bzw. die Pipette verstopft. TissueRuptor für 20 Sekunden bei voll-speed, dabei auf und ab bewegen. Wenn noch Gewebereste zu erkennen sind, den Vorgang wiederholen. Dabei auf (Zwischen-) Kühlung achten.
3. **400 µl RLT** zugeben und mit der Pipette mischen. Die Mischung auf die **QiaShredder column** geben und bei voll-speed zentrifugieren.
4. Lysat abpipettieren, ohne das Pellet (gallertartige Masse) zu berühren, und in ein neues Mikrozentrifugengefäß füllen.
5. (entsprechend der vorherigen Menge an RLT) **600 µl Ethanol 70%** einfüllen und mit der Pipette mischen, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind.
6. 600 µl der Probe auf die **RNeasy spin column** in einem collection tube (2ml) geben und für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugieren. Durchfluss verwerfen (enthält RLT-Puffer → Giftmüll). Vorgang mit den verbleibenden 600 µl der Probe wiederholen, Durchfluss verwerfen.
7. **350 µl RW1-Puffer** auf RNeasy spin column geben und für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.

### 8. **DNase-Verdau mittels RNase-free DNase Set.**

#### Vorbereitung:

**DNase I Stammlösung:** 1.500 Kunitz units in 550 µl RNase-freiem Wasser mit RNase-freier Nadel und RNase-freier Spritze lösen. Nicht vortexen, da die DNase I sehr schnell physikalisch denaturiert.

Lagerung in Einzeldosen (single-use) bei -20°C für 9 Monate oder bei 2-8°C für 6 Wochen. Kein Wiedereinfrieren.

#### Durchführung:

Es werden vermisch 7 Teile RDD und 1 Teil DNase-I-Stammlösung (angewärmt auf Raumtemperatur) zu 80 µl pro Probe. Diese 80 µl werden direkt auf die Membran der RNeasy spin column pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Abbildung 2: Selbsterarbeitete Anleitung zur RNA-Extraktion mittels RNeasy mini kit inklusive DNase-Verdau bis zum Einfrieren der RNA-Lösung, Seite 1

9. Anschließend werden **350 µl RW1-Puffer** zugefügt und alles für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen.
10. Wechsel des collection tube (2ml).  
**500 µl RPE-Puffer** werden auf die RNeasy spin column pipettiert, für 1 Minute auf der Säule belassen und ohne collection tube 1-2 x geschwenkt, um auch die Salze im Deckel zu erreichen.  
Zentrifugieren für 1 Minute bei 10.000 rpm. Durchfluss verwerfen.
11. **500 µl RPE-Puffer** werden auf die RNeasy spin column pipettiert, für 1 Minute auf der Säule belassen und ohne collection tube 1-2 x geschwenkt.  
Zentrifugieren für 1 Minute bei 10.000 rpm. Durchfluss verwerfen.
12. **500 µl Ethanol 80%** werden auf die RNeasy spin column pipettiert, für 1 Minute auf der Säule belassen und ohne collection tube 1-2 x geschwenkt.  
Zentrifugieren für 1 Minute bei 10.000 rpm, der Durchfluss wird verworfen.
13. Wechsel des collection tube (2ml) und erneutes Zentrifugieren für 1 Minute bei full-speed, um auch die letzten Reste der Flüssigkeiten zu entfernen.
14. RNeasy spin column in neues 1,5 ml collection tube stecken.  
Eluieren mit **32 µl RNase/DNase-freiem Wasser**, hierbei pro Probe jeweils eine neue Pipettenspitze verwenden. 1 Minute stehenlassen.  
Zentrifugieren für 1 Minute bei 10.000 rpm.
15. Reeluieren desselben RNase/DNase-freien Wassers (~30µl Durchfluss), 1 Min stehenlassen.  
Zentrifugieren für 1 Minute bei 10.000 rpm.
16. Sofortige Kühlung mit Trockeneis.
17. Qualitätskontrolle mittels **Nanodrop**: 1,3 µl RNA-freies H<sub>2</sub>O als Nullwert; RNA-40;  
  
Sollwerte:  
Konzentration ≥ 150 ng/µl      Ratio 260/280: 1,8-2,2      Ratio 260/230: 1,7-2,2
18. Einfrieren

Abbildung 3: Selbsterarbeitete Anleitung zur RNA-Extraktion mittels RNeasy mini kit inklusive DNase-Verdau bis zum Einfrieren der RNA-Lösung, Seite 2

### **2.2.7.2 Vorbereitung des Arbeitsplatzes**

Der gesamte Arbeitsplatz wurde gereinigt und mit RNase away (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) benetzt, um eine Verschmutzung der Proben zu verhindern.

Zur Vorbereitung der Reagenzien wurden 10µl β-Mercaptoethanol (β-ME, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pro 1 ml Puffer-RLT zugefügt. Dabei wurde wegen des β-ME unter dem Abzug gearbeitet. Dieses Gemisch war bei Raumtemperatur bis 1 Monat lagerbar. Ebenfalls wurde das Puffer-RPE-Konzentrat mit 260ml 96-100% Ethanol verdünnt, wie auf dem Etikett beschrieben.

### **2.2.7.3 Abwiegen und Gewebezerkleinerung**

Nach den Verdünnungen wurde 20-30 mg Gewebe auf Trockeneis abgewogen. Zur groben Zerteilung in kleinere Gewebestücke hat sich die Verwendung eines Mörsers in Verbindung mit Flüssigstickstoff bewährt. Die Gewebestücke wurden dann mit einer gekühlten Pinzette auf die mittels Trockeneis gekühlte Waagschale überführt. Erfahrungsgemäß wiegt ein Würfel Prostatagewebe mit der Kantenlänge 3 mm in etwa 30-35 mg. Ist zu viel RNA enthalten, funktioniert der Extraktionsprozess durch Überladung der Säulen nicht richtig. Im Zweifel oder bei zu geringer Ausbeute sollte daher lieber etwas weniger Gewebe verwendet werden, um höhere RNA-Konzentrationen in der Endlösung zu erhalten. Die abgewogene Gewebemasse wurde dokumentiert, um bei späteren Fragen auf diese Information zurückgreifen zu können. Meist wurden ca. 22 mg abgewogen, da bei dieser Masse die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, vgl. dazu auch Kapitel 2.2.7.8.

Zur Gewebezerkleinerung wurden die Gewebestücke unter dem Abzug mit 200 µl RLT mit Temperaturen von 2-8°C in ein beschriftetes Mikrozentrifugengefäß überführt. Der TissueRuptor wurde für 20 Sekunden bei Full-Speed in die Lösung gehalten und dabei leicht auf und ab bewegt. Sollten noch Gewebereste zu erkennen gewesen sein, so wurde der Vorgang wiederholt, bis die Lösung relativ homogen aussah. Dabei wurde zwingend auf ausreichende Kühlung und Zwischenkühlung geachtet, da bei der Zerkleinerung gerätebedingt Wärme entsteht. Bei höheren Temperaturen denaturiert die RNA und ist danach für die kommenden Analyseschritte unbrauchbar. Daher wurde bis zu diesem Schritt penibel auf eine ununterbrochene Kühlung geachtet.

Es wurden 400 µl RLT zugegeben und mittels Pipette vermischt, sodass insgesamt 600 µl RLT und das homogenisierte Gewebe enthalten waren. Diese Mischung wurde auf die Qia-Shredder column in einem neuen beschrifteten Mikrozentrifugengefäß gegeben und kurz bei Full-Speed zentrifugiert. Dabei war es hilfreich, die Position des Säulendeckelgelenks stets nach innen zu rotieren. So war gewährleistet, dass sich alle Zellreste am gegenüberliegenden Boden sammeln und der nächste Schritt schneller bearbeitet werden konnte.

Das Lysat wurde abpipettiert und in ein neues beschriftetes Mikrozentrifugengefäß gefüllt, ohne das Pellet bzw. die gallertartige Masse zu berühren. Diese war stets gegenüber des Deckelgelenks zu finden.

### **2.2.7.4 Aufreinigung der RNA-Lösung**

Entsprechend der vorherigen Gesamtmenge an RLT wurden nun 600 µl Ethanol 70% eingefüllt und mit der Pipette gemischt, bis keine Schlieren mehr sichtbar sind. Somit waren nun ca. 1200 µl Lösung in dem Zentrifugengefäß enthalten.

600 µl der Probe wurden auf eine beschriftete RNeasy spin column pipettiert, die in einem collection tube (Volumen 2 ml) steckte. Dabei wurde beim Einfüllen beachtet, den Boden der Säule nicht zu berühren, um die dortige Membran nicht zu beschädigen. Anschließend wurde für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Hierbei war es essentiell wichtig, erneut auf die Ausrichtung der Deckelgelenke zur Mitte der Zentrifuge zu achten. Die RNA haftete am Säulengewebe fest und wurde dort konzentriert, wo am meisten Durchfluss entstand. Dies war genau an der Stelle der Fall, wo die Zentrifugalkraft am größten war, also in diesem Fall gegenüber des Deckelgelenks. Eben an dieser Stelle ist auch in den folgenden Schritten die größte Menge an Aufreinigungslösungen durchgeflossen. Der Durchfluss wurde in den Giftmüll (β-ME) verworfen. Dieser Vorgang wurde mit den verbleibenden ca. 600 µl Gemisch wiederholt, der Durchfluss wurde erneut verworfen.

Auf die RNeasy spin column wurden 350 µl RW1-Puffer gegeben und diese für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

### **2.2.7.5 DNase-Verdau**

Auf der Membran der Säule hafteten nun unter anderem die enthaltenen DNA- und RNA-Stränge. Für die weitere Analyse sollten die RNA-Fragmente verwendet werden, sodass zunächst noch die DNA-Stränge entfernt werden mussten. Es erfolgte der DNase-Verdau mittels RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die DNase I Stammlösung wurde hergestellt, indem dem Pulver 550 µl RNase-freies Wasser mittels RNase-freier Nadel und Spritze zugefügt wurde. Zum Auflösen wurde nicht gevortext, da das enthaltene Enzym physikalisch sehr leicht denaturiert wird. Die Lagerung der DNase I erfolgte in Einzeldosen, da ein Wiedereinfrieren nicht empfohlen ist. Die Haltbarkeit beträgt bei -20°C neun Monate bzw. bei 2-8°C sechs Wochen.

Für den DNase-Verdau wurden 7 Teile RDD-Puffer und 1 Teil DNase-I-Stammlösung auf Raumtemperatur aufgewärmt, zu insgesamt 80 µl pro Probe zusammengefügt und direkt auf die Membran der RNeasy spin column pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Direkt im Anschluss wurden 350 µl RW1-Puffer dazugegeben und wieder für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde zusammen mit dem collection tube verworfen und ein neues collection tube wurde ab nun verwendet.

### **2.2.7.6 Weitere Aufreinigung der RNA-Lösung**

Um enthaltene Salze zu entfernen, wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert. Diese wurde innerhalb einer Minute zweimalig geschwenkt, um auch die im Deckel haftenden Salze zu erreichen. Beim Schwenken der Säule war zu beachten, dass diese grundsätzlich ohne collection tube zu erfolgen hatte, da darin eventuell enthaltene Flüssigkeitsreste zu einer Verunreinigung führen konnten. Nach der Einwirkzeit erfolgte erneut die Zentrifugierung für 1 Minute bei 10.000 rpm mit anschließender Verwerfung des Durchflusses. Dieser Vorgang wurde mit weiteren 500 µl RPE-Puffer wiederholt.

Abweichend von der Betriebsanleitung wurde nun einmalig 500 µl Ethanol 80% auf die RNeasy spin column pipettiert, für 1 Minute unter zweimaligem Schwenken auf der Säule belassen und im Anschluss für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Lösung ist zu etwa 80% mit der verwendeten RPE-Puffer-

Lösung identisch, siehe Vorbereitung zu Beginn in Kapitel 2.2.7.2.. Dieses Vorgehen erfolgte aufgrund von Empfehlungen aus dem Zentrallabor der Uniklinik Tübingen, wo dieser zusätzliche Schritt regelmäßig Verwendung findet und dadurch eine deutlich bessere Reinheit der RNA-Lösungen erhalten wird.

Das collection tube wurde erneut gewechselt und die Säule für eine Minute bei Full-Speed trocken zentrifugiert, um auch die letzten Flüssigkeitsreste von der Membran zu entfernen.

### **2.2.7.7 Asservierung der RNA-Lösung und Qualitätskontrolle**

Um die RNA-Fragmente von der Säulenmembran zu lösen, wurde die Säule auf ein neues beschriftetes, 1,5 ml fassendes collection tube gesteckt und 32  $\mu$ l RNase/DNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach einer Minute wurde für 60 Sekunden mit 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss umfasste ca. 30  $\mu$ l. Dieser wurde erneut auf die Membran pipettiert und nach einer Minute Wartezeit für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Nach dem letzten Zentrifugieren wurden die Säulen verworfen und die collection tubes verschlossen in den  $-20^{\circ}\text{C}$ -Cooler gesteckt.

Es folgte die Qualitätskontrolle mittels Nanodrop. Hierzu wurden 1,3  $\mu$ l RNA-freies Wasser als Nullwert verwendet. Im Computer-Bildschirm wählte ich RNA-40 als Modus aus.

Die Soll-Werte waren wie folgt festgelegt:

- RNA-Konzentration  $\geq 150$  ng/ $\mu$ l
- Ratio 260/280: 1,8-2,2
- Ratio 260/230: 1,7-2,2

Als letzter Schritt der RNA-Extraktion erfolgte das zwischenzeitliche Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für wenige Tage bzw.  $-80^{\circ}\text{C}$  für eine Lagerung über mehr als fünf Tage.

### 2.2.7.8 Vortest zur Bestimmung der optimalen Menge an Frischgewebe für die RNA-Isolierung

Dieses Unterkapitel beschäftigt sich mit der optimalen Einwaage des Frischgewebes. Da es sich hierbei nur um einen Vortest handelt, dessen Konsequenz bereits beschrieben worden ist, soll der Übersicht wegen ausnahmsweise auf die strenge Trennung zwischen Material und Methoden, Ergebnissen und Diskussion verzichtet werden.

Es sollte nach der Erarbeitung des korrekten Arbeitsablaufs und der Erstellung einer vorläufigen Arbeitsanweisung zuerst die optimale Menge an Frischgewebe ermittelt werden, mit der die beste Ausbeute an RNA-Lösung erzielt werden kann. Dabei war das Ziel eine möglichst gute RNA-Lösung, die als Substrat für die weiteren Schritte dienen sollte. Die bewerteten Parameter waren in diesem Fall der Gehalt der Lösung an RNA, sowie die 260/280- und die 260/230-Ratio als Angaben zur Reinheit. Hierzu wurde von derselben Probe Frischgewebe abgewogen, zerkleinert, aufgereinigt und schließlich mittels Nanodrop analysiert. Die Ergebnisse werden in der folgenden Tabelle 7 dargestellt.

Einwaage [mg] Frischgewebe	Menge extrahierter RNA [ng/μl]	260/280-Ratio	260/230-Ratio
Leerwert	0,83	0,36	1,58
15	13,89	1,56	0,99
19	406,30	2,01	2,09
20*	147,81	2,04	1,97
24	126,4	2,00	1,44

Tabelle 7: Ergebnis des Vortests zur Ermittlung der optimalen Menge Frischgewebe zur RNA-Extraktion. Die Probe 20\* ist kurzfristig aufgetaut, die Kühlkette ist also unterbrochen worden. Mit dieser Probe ist nur für diesen Test weitergearbeitet worden.

Es wurden alle Proben nach Protokoll und in gleicher Weise bearbeitet, mit Ausnahme der Kühlkette bei der Probe 20\*. Diese ist beim Zerkleinerungsprozess mittels TissueRuptor nicht durchgehend gekühlt worden, sondern hat sich leicht erwärmt. Dies war daran zu erkennen, dass das Gewebestück verformbar war und an der Spitze des TissueRuptors geklebt hat. Nach der Verfahrensanweisung wäre diese Probe für die

richtige Arbeit sofort verworfen worden, zu Testzwecken der Relevanz durchgehender Kühlung ist jedoch der Durchlauf einmalig auch mit einer kurzzeitig aufgetauten Probe vollendet worden. In der Folge hat das zu einem schlechteren Zerkleinerungsergebnis geführt und auch zu einem geringeren Gehalt an RNA in der Ziellösung. Die RNA-Lösung ist selbstverständlich verworfen worden.

Für das schlechte Ergebnis bei Probe 15 mg ist bisher keine sinnvolle Erklärung gefunden worden, ggf. könnte eine unvorteilhafte Stelle beim Frischgewebe erwischt worden sein, die wenig RNA enthält – z.B. Blutbestandteile eines Gefäßes.

Es zeigte sich, dass insbesondere eine zu hohe Einwaage schlechte Ergebnisse bringt, da laut Aussage des Instituts für klinische Chemie und Pathobiochemie der Universitätsklinik Tübingen die Säulen dann überladen würden und sie im ersten Schritt die noch verunreinigte RNA nicht ausreichend an sich binden könnten. Diese unzureichend gebundene RNA werde dann bei den folgenden Waschschritten in großen Mengen abgespült, sodass in der Ziellösung entsprechend weniger RNA enthalten sei.

Ebenfalls kann man anhand der Proben 19 mg und 20\* mg darauf schließen, dass das Einhalten der Kühlkette von starker Bedeutung ist. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die RNA bei wärmeren Temperaturen und lytischen Zellen eher abgebaut wird.

Beim Kollektiv wurde für die Einwaage ein Zielkorridor von 17 – 23 mg Frischgewebe festgelegt, wie oben bereits beschrieben. Diese wurde für jede Probe dokumentiert, sodass bei schlechter RNA-Ausbeute oder mangelnder Reinheit der Lösung bei zunächst höherer Einwaage im Folgeversuch eine entsprechend niedrigere Menge Frischgewebe verwendet werden konnte.

## **2.2.8 Umschreiben in cDNA**

### **2.2.8.1 Prinzip**

Die PCR soll mit einer DNA als Ursprungsstrang durchgeführt werden. Somit müssen aus den vorliegenden RNA-Strängen komplementäre DNA (cDNA) – Stränge synthetisiert werden. Diese haben den Vorteil, dass die Haltbarkeit bzw. Stabilität einer DNA der einer RNA deutlich überlegen ist. Dadurch ist eine längere Lagerung und ggf. Wiederholung zum Vergleich meiner Ergebnisse mit anderen Arbeiten möglich. Denkbar wäre auch eine modulare Erweiterbarkeit der Arbeit um einige Gene. Außerdem lässt sich eine DNA deutlich besser vervielfältigen und ist daher für die geplante Analyse besser geeignet.

Zum Umschreiben der RNA in eine cDNA wird das Omniscript Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Dieses wird bei -20°C gelagert.

### **2.2.8.2 Vorbereitende Anmerkungen zum Kit und zur Primerauswahl**

Das Protokoll vom Kit ist auf die Umschreibung von Mengen zwischen 50 ng bis 2.000 ng RNA ausgelegt. Für diese Arbeit wurden bei allen Proben in etwa 1.000 ng RNA abgeschätzt, damit die Ergebnisse nicht zu stark durch Berechnungen verzerrt werden würden.

Bei der Auswahl der Primer sollte im Falle eines Oligo-dT-Primers eine Mindestnukleotidlänge von 12 eingehalten werden. Für diese Arbeit wurde ein Random-Hexamer-Primer verwendet und es konnten damit sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Dieser Primer besteht aus zufällig zusammengesetzten Nukleotiden und ist sechs Basen lang. Durch die hohe Diversität kann diese Art Primer an vielen Stellen an die RNA binden, wodurch möglichst viele RNA-Fragmente übersetzt werden können.

### **2.2.8.3 Vorbereitung der Reagenzien**

Als erster Schritt mussten alle benötigten Reagenzien aufgetaut werden. Die umzuschreibenden RNA-Lösungen wurde auf Eis aufgetaut. Die Primer-Lösungen, Buffer-RT, dNTP-Mix und RNase-freies Wasser wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und direkt danach auf Eis bis zur Verwendung gelagert. Alle Lösungen wurden kurz

gevortext und anschließend kurz zentrifugiert, um Lösungstropfen aus dem Deckel und von den Seitenwänden mit erfassen zu können.

Der RNase-Inhibitor wurde durch Zugabe von 1:1 RNase-/DNase-freiem Wasser auf 10 units/ $\mu\text{l}$  verdünnt. Der 10x Buffer-RT-Aliquot wurde 1:9 mit Wasser verdünnt, sodass die Konzentration nur noch 1x beträgt. Es wurde nun 1:1 die verdünnte RNase-Inhibitor-Lösung mit dem 1x Buffer-RT-Aliquot vermischt, maximal 5 Sekunden gevortext und anschließend kurz abzentrifugiert. Die entstandene Lösung hieß ab diesem Zeitpunkt RNase-Inhibitor-Lösung (10 u/ $\mu\text{l}$ ). Die Verdünnung war notwendig, um in den späteren Schritten entsprechend kleine Mengen pipettieren zu können. Eine Lagerung dieser verdünnten Lösung ist nicht empfohlen, daher wurde sie für jede Charge frisch hergestellt und direkt verwendet.

Die Herstellung des Mastermix wurde auf folgende Weise durchgeführt: Es wurden auf Eis pro Probe 2  $\mu\text{l}$  10x Buffer-RT, 2 $\mu\text{l}$  dNTP-Mix, 1 $\mu\text{l}$  Omniscript, 2 $\mu\text{l}$  Oligo-dT-Primer (10 u/ $\mu\text{l}$ ) und 1 $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor-Lösung (10 u/ $\mu\text{l}$ ) mit der Pipette vermischt, maximal 5 Sekunden gevortext und kurz abzentrifugiert. Für größere Chargen wurde der Ansatz mit ca. 10% Überschuss berechnet.

### **2.2.8.4 Berechnung der benötigten Menge RNA-Lösung**

Die benötigte Menge an RNA-Lösung richtete sich nach der mittels Nanodrop gemessenen RNA-Konzentration. Es wurde festgelegt, dass in etwa 1.000 ng RNA in DNA umgeschrieben werden sollte. Die Pipettiergenauigkeit wurde auf 0,5  $\mu\text{l}$  festgelegt, mindestens sollte ein Volumen von 1  $\mu\text{l}$  pipettiert werden. Die möglichen Volumina waren also 1  $\mu\text{l}$ , 1,5  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$  usw.. Verwendet wurde diejenige Menge Lösung, die am ehesten 1.000 ng RNA entsprach. Ich führe nun einige Beispiele der durchgeführten Berechnung auf:

Probe	RNA [ng/μl]	Verwendete μl	Errechnete RNA-Menge [ng]
08-119	969,5	1	969,5
12-008	436,9	2,5	1092,25
10-362	735,7	1,5	1103,55
08-033	1201,5	1	1201,5
08-041	816,6	1	816,6
10-099	295,7	3,5	1034,95

Tabelle 8: Beispielhafte Berechnungen der benötigten Menge an RNA-Lösung

### 2.2.8.5 Durchführung der cDNA-Synthese

Es wurden in ein beschriftetes Eppendorf-Cup 8 μl des Mastermix gegeben. Hinzu kam die ermittelte Menge an RNA-Lösung. Die Reaktionslösung wurde mit RNase-/DNase-freiem Wasser auf 20 μl aufgefüllt, mit der Pipette vermischt, kurz gevortext, anzentrifugiert und anschließend für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die gleichmäßige und gleichbleibende Temperatur wurde durch Verwendung des Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, D) garantiert, der auf den Modus ohne Mischen bei konstanter Temperatur eingestellt war.

Die erhaltene cDNA-Lösung wurde in 4 Aliquots à 5 μl aufgeteilt und bei -20°C eingefroren. Für die längerfristige Lagerung ab vier Tagen wurde eine Temperatur von -80°C verwendet.

Eine Messung der tatsächlich enthaltenen cDNA erfolgte nicht, da die verwendeten Qiagen-Kits etabliert sind und ihre Wirksamkeit erwiesen ist. Durch die Verwendung von mehreren Housekeeping-Genen ist die Vergleichbarkeit der in der PCR gemessenen Daten trotz nicht 100%iger Übereinstimmung der eingegebenen cDNA-Menge gegeben, siehe dazu auch Kapitel 2.2.9.3 auf Seite 63.

Sollte bei der folgenden PCR auffallen, dass das Umschreiben bei einer Probe wider Erwarten nicht funktioniert hat, so könnte man die RNA vor dem Umschreiben zur cDNA manuell denaturieren. Hierzu müsste zuerst erneut die RNA aus Kryogewebe extrahiert werden, um Fehler und RNA-Abbau beim vorherigen Auftauen zu eliminieren. Nach der Lagerung bei -80°C und dem Auftauen auf Eis würde die RNA-Lösung für 5 Minuten auf 65°C erwärmt und anschließend direkt auf Trockeneis gekühlt. Anschließend würde die Reaktionsmischung zugegeben und die Synthese begonnen

werden, wie oben beschrieben. Dieses Vorgehen war für die vorliegende Arbeit nicht nötig, ist aber wissenswert für nachfolgende Arbeiten.

### **2.2.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

#### **2.2.9.1 Der Gen-Strang**

Man kann zwischen RNA- und DNA-Strängen unterscheiden. Der Hauptunterschied besteht im Grundgerüst, das bei der RNA aus Phosphat und Ribose und bei der DNA aus Phosphat-Desoxyribose besteht. Die DNA ist deutlich stabiler als die RNA, kann aber dadurch nicht so leicht abgelesen werden. Folglich ist die DNA eher eine Lagerungsform des Erbguts, wohingegen die RNA sich gut als Arbeitsform eignet. Ein weiterer Unterschied besteht in den Basenpaarungen. Bei der DNA bindet Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin. Die RNA kennt kein Thymin und hat stattdessen Uracil als Bindungspartner für das Adenin. Durch die molekulare Beschaffenheit entstehen bei der Anlagerung von Guanin und Cytosin (G-C) drei Wasserstoffbrückenbindungen und bei Adenin und Thymin (A-T) bzw. Adenin und Uracil (A-U) zwei Wasserstoffbrücken, die für eine optimale Haftung von zwei komplementären Strängen bzw. auch strangeigenen komplementären Abschnitten sorgen.

Im Zellkern tierischer Zellen liegt die DNA als komplementärer Doppelstrang vor, es passen also in der richtigen Reihenfolge immer zwei Basenpaare der Stränge zueinander. Die beiden Stränge sind umeinander verschlungen und bilden eine Doppelhelix.

Die Stränge haben eine gegenläufige Ausrichtung, wobei durch Zählung der Kohlenstoffatome der 2'-Desoxyribose das eine Ende des Strangs als 3' und das andere Ende als 5' deklariert wurde. Die Ablesung erfolgt in 3'-5'-Richtung, während die Synthese biochemisch bedingt in 5'-3'-Richtung ablaufen muss. Da in dieser wissenschaftlichen Arbeit Einzelstrang-RNA amplifiziert werden soll und später bei der PCR beide Stränge in 3'-5'-Richtung abgelesen werden können, wird an dieser Stelle auf die Erklärung der Besonderheiten bei der Replikation tierischer Zell-DNA nicht näher eingegangen.

### 2.2.9.2 Funktionsprinzip der PCR / qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren, das physiologisch in jeder Zelle mit Zellkern (in vivo) vorkommt. Es dient der Vervielfältigung der DNA und auch dem Umschreiben von DNA in RNA. Dabei handelt es sich um einen beispielsweise für die Zellteilung und die Proteinbiosynthese nötigen Prozess. Die Reaktion kann zur Vervielfältigung bzw. – wie hier – für Analysezwecke im Labor (in vitro) künstlich nachgeahmt werden. Im Folgenden wird schwerpunktmäßig auf die Durchführung der PCR im Labor eingegangen.

Für die Durchführung ist es wichtig, zumindest einen kleinen Teil vom Anfang der Sequenz zu kennen. Bei einem einzelnen Strang reicht ein Primer vor der Sequenz, bei einem Doppelstrang braucht man zwei Primer, die jeweils gegenläufig auf den Strängen vor der gewünschten Sequenz binden können. Ebenfalls werden aktivierte Nucleotid-Moleküle in Form von Nucleosid-Triphosphat-Molekülen in ausreichender Menge und eine hitzestabile Polymerase benötigt. Am häufigsten wird das Enzym aus dem in Warmwasserquellen zu findenden Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet (Taq-Polymerase), welches ein Temperaturoptimum von ca. 75°C hat. Die Reaktion selbst wird in wiederholten Schritten durchgeführt, bis die gewünschte Menge an Genprodukten synthetisiert wurde.

In einem ersten Schritt müssen eventuell vorhandene Doppelstränge voneinander getrennt werden, d.h. die RNA/DNA muss denaturiert werden. Biochemisch werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren Adenin und Thymin (A-T) der DNA bzw. Adenin und Uracil (A-U) im Falle der RNA, sowie zwischen Guanin und Cytosin (G-C) bei DNA und RNA gespalten. Dies erfolgt durch das Erhitzen auf 95°C.

Der zweite Schritt umfasst die Bindung der Primer an die vorgesehenen komplementären RNA- bzw. DNA-Abschnitte. Ein Primer ist ein Starter, der später dem ersten Teil des neuen DNA- bzw. RNA-Strangs entspricht. Primer werden benötigt, damit das Enzym, das später den komplementären Strang synthetisieren soll, überhaupt an den schon vorhandenen Strang binden und von dort aus seine Arbeit aufnehmen kann. Dafür ist es wichtig, dass die Bindung an dem 3'-Ende des Strangs stattfindet, da die Synthese des komplementären Strangs stets von 5' nach 3' geschieht und dazu der zu kopierende Strang von 3' nach 5' abgelesen werden muss. Die optimale

Temperatur liegt zwischen 55 – 65°C. Für diese Arbeit wurde das Abkühlen der Temperatur auf 60°C festgelegt.

Durch Erwärmung auf ca. 72°C wird das Enzym, die Taq-Polymerase, aktiv, fährt über den Strang und bildet durch Verknüpfung der passenden Basen einen komplementären DNA-Strang bis zum Abbruch der Reaktion. Das Ergebnis sind zwei angelagerte Stränge, die durch erneute Erwärmung auf 95°C denaturiert werden. Der nächste Reaktionszyklus kann beginnen.

Für die vorliegende Arbeit wurde die quick PCR verwendet, die sich durch schnellere Reaktionszeiten und somit eine kürzere Gesamtdauer auszeichnet. Die zyklische Wiederholung konnte durch ein Real-Time PCR System (Step One Plus, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) einfach bewerkstelligt werden. Die Synthese wurde eingeleitet durch 2 Minuten bei 50°C und 2 Minuten bei 95°C. Die anschließenden 40 Zyklen beinhalteten 1 Sekunde bei 95°C und 20 Sekunden bei 60°C mit kurzen Erhitzungs- bzw. Erkaltungsphasen dazwischen.

### **2.2.9.3 Die Rolle des Housekeeping-Gens**

Man kann nicht garantieren, dass von jeder Probe genau die gleiche Menge Frischgewebe die gleiche Menge Gen-Material enthält und dass nach dem Umschreiben in cDNA genau die gleiche Menge in der gleichen Konzentration pro Probe enthalten ist. Die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Probenkonstellationen ist nur durch Verwendung eines oder besser mehrerer Housekeeping-Gene gegeben. Housekeeping-Gene sind Gene, die in allen Zellen ubiquitär in annähernd gleicher Menge vorkommen. Zellen mit vergleichsweise wenig Genmaterial haben auch wenig Housekeeping-Gene ausgeprägt; Zellen mit viel Genmaterial haben eine größere Housekeeping-Genmenge. Zur Angleichung der verschiedenen Gen-Mengen wurde von den im Labor bestimmten Ergebnissen je Gen das Ergebnis des Housekeeping-Gens abgezogen und damit der Überschuss des getesteten Gens ermittelt. Hierdurch war die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Proben gegeben.

Das erste Housekeeping-Gen dieser Arbeit ist HPRT1 und kodiert für die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1. Dieses Enzym ist Teil des Purinstoffwechsels und katalysiert den Nukleotidaufbau aus Adenin, Hypoxanthin, Xanthin und Guanin. Durch

diesen sogenannten Salvage-Pathway wird nicht nur ATP eingespart, sondern auch die Harnsäurebildung reduziert. Es wird also in der Zelle auf effiziente Weise Energie eingespart und es können genügend Nukleotide für die DNA- und RNA-Synthese bereitgestellt werden (Medicine, 2019b) (al., 2005) (GeneCards).

Als zweites Housekeeping-Gen hat UCHL5 Anwendung gefunden, das für die Ubiquitin Carboxyl-Terminale Hydrolase L5 kodiert. Dieses Enzym ist spezifisch für die Deubiquitinierung von Lys-48-gebundenen Polyubiquitin-Ketten zuständig, die in der 19S Untereinheit der 26S Proteasomen-Einheit vorkommen. Es ist beteiligt an DNA-Rekombination, DNA-Reparatur und der Deubiquitinierung von Proteinen bzw. post-translationalen Proteinmodifikation. Ebenfalls beteiligt ist es an der Herunterregulation des TGF- $\beta$ -Rezeptor-Signalwegs (Consortium, 2019) (UniProt, GeneCards).

Für diese Arbeit wurde entschieden, zwei Housekeeping-Gene zu verwenden. Diese Verwendung unterschiedlicher Referenzgene ist in der Literatur bereits mehrfach positiv erwähnt und hat den Vorteil, dass eventuell unberücksichtigte oder unbekannte Einflussfaktoren weniger ins Gewicht fallen (Tsaur et al., 2013) (Zhao et al., 2018).

### **2.2.9.4 Durchführung der qPCR**

Vorbereitend wurden am Computer die benötigten Einstellungen vorgenommen, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch unkontrollierte Reaktionen während der Eingaben verhindern zu können. Das Eingeben der Probennummern und der Belegung der Reaktionsplatte nahm recht viel Zeit in Anspruch, sodass dies vor Ansetzen der Reaktionsmischung durchgeführt wurde.

Als Ablauf bei der Analyse wurden folgende Zeiten und Temperaturen festgelegt: 2 Minuten 50°C, 2 Minuten 95°C, anschließend 40 x 1 Sekunde bei 95°C und 40 x 20 Sekunden bei 60°C im Wechsel.

Zur Durchführung der PCR wurden folgende Reagenzien benötigt: 5,0  $\mu$ l Mastermix, 0,5 $\mu$ l TaqMan Assay, 3,5 $\mu$ l Nuclease-freies Wasser, 1,0 $\mu$ l Probe. Diese Reagenzien wurden in die Vertiefungen einer Probenplatte (MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gegeben. Im Verlauf zeigte sich, dass zum sparsameren Umgang mit Reagenzien und Probenmaterial die Reaktionsmenge halbiert werden konnte, sodass nur noch

insgesamt 5 µl Reaktionsvolumen in das Reaktionsgefäß gegeben werden musste. Damit man nicht so sehr geringe Mengen pipettieren musste, war es sehr sinnvoll, erst einen Ansatz der Reaktionsmischung zu erstellen, von diesem 4,5 µl in die Vertiefungen zu pipettieren und anschließend die 0,5 µl Probenmaterial mit der Pipette einzumischen.

### *Exkurs:*

*Das Vorlegen des Probenmaterials hat sich als nicht sinnvoll erwiesen, da diese geringe Menge nicht sicher am Boden des Gefäßes haften blieb. Eventuell in der Pipettenspitze enthaltene Reste konnten so ebenfalls nicht erfasst werden. Am besten funktionierte das Auswaschen des Probenmaterials mittels Reaktionslösung beim Durchmischen der Reagenzien während des Einfüllens. Dies brachte im Test auch die besten Ergebnisse mit der geringsten Abweichung zwischen den technischen Duplikaten.*

*Für diesen Vortest wurden von einer einzelnen Probe Analysen erstellt, bei denen lediglich die Reihenfolge des Einfüllens unterschiedlich war. Zur Bestimmung der Abweichung wurden je technische Duplikate verwendet. Auf dem Strip (MicroAmp™ Fast 8-Tube Strip, 0.1 mL, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) waren zwei Negativproben, zwei mit vorgelegtem Assay und zwei mit vorgelegtem Mastermix.*

Die Platte wurde mittels Folie (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) abgedeckt. Sollten an den Gefäßwandungen noch einzelne große Tropfen vorhanden gewesen sein, so konnten diese mit einer schwungvollen Armbewegung und raschem Abbremsen durch die eigene Trägheit nach unten gedrückt werden. War dies zufriedenstellend gelungen, wurde die Reaktionsplatte in das Gerät eingelegt und der Prozess am Computer gestartet. Bei den richtigen Einstellungen erfolgte die Datenübertragung an das Gerät automatisch, ebenso die gesamte Analyse.

### 2.2.9.5 Ermittlung der Rohdaten

Im Gerät wurde nach jeder Wiederholung die Extinktion gemessen. An den Primern, die oben als Assays bezeichnet wurden, befanden sich Farbstoffe, die durch die bei der Replikation stattfindende Reaktion aktiviert wurden. Dieser Farbumschlag der Lösung von farblos zur entsprechenden Farbstofffärbung konnte mittels Lichtdurchlässigkeitsprüfung, genannt Extinktionsmessung, nachvollzogen werden. Anhand des steigenden Färbungsgrades konnte die Steigerung der Genstranganzahl gemessen werden. Diese Messungen führt das Gerät automatisch durch und zeigt die Ergebnisse nach jedem Durchlauf direkt auf dem Computerbildschirm an.

Am Ende der Analyse lieferte das System Rohdaten, die einerseits als Graph und andererseits als rudimentäre Tabelle angezeigt wurden. Abbildung 4 und Abbildung 5 stellen beispielhaft einen Ausschnitt eines Datensatzes eines Analysendurchlaufs graphisch dar. Das Ergebnis, das vom Gerät ermittelt wurde, entspricht der Anzahl an Circles, nach denen sich ein steady-state einstellte, angegeben ist also die Anzahl an Reaktionsdurchläufen, nach denen stabil stets die Verdopplung an Signal gemessen werden konnte.

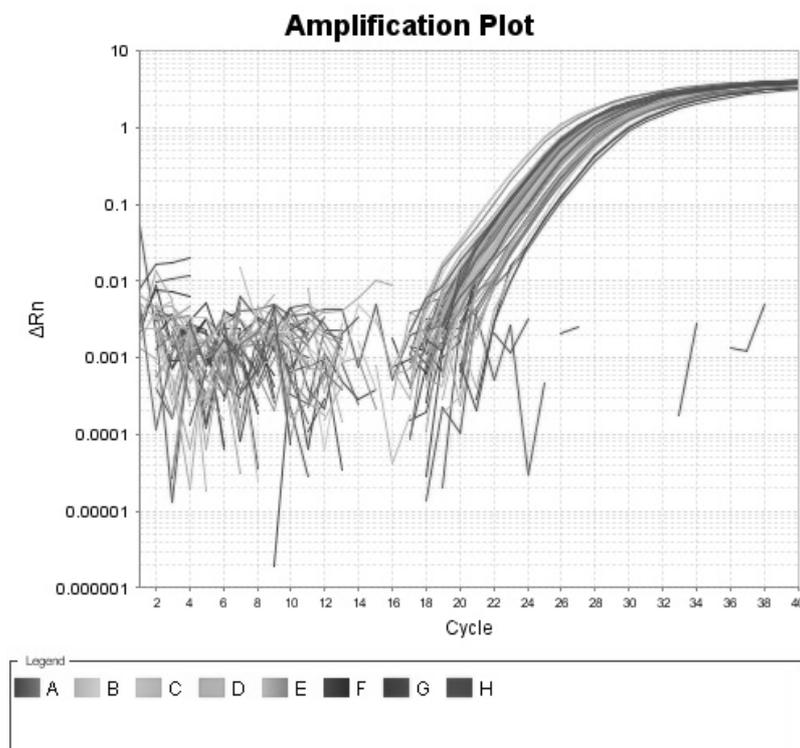


Abbildung 4: Beispielhafte Gesamtergebnisanzeige der Rohdaten eines Durchlaufs von UCHL-5 als Graph (am Computer in Farbe, hier in Graustufen). Die x-Achse zeigt die Anzahl an Cycles, die Y-Achse zeigt logarithmisch aufgetragen

die Änderung der Extinktion. Nach anfänglichen nicht verwertbaren Messungen beginnen ab ca. Circle 16 sich die ersten verwertbaren Kurven zu bilden. Die kleineren Striche bei Circle 33-34 und 36-38 entsprechen der Negativprobe und zeigen an, dass dort – wie erwartet – keine Reaktion stattgefunden hat.

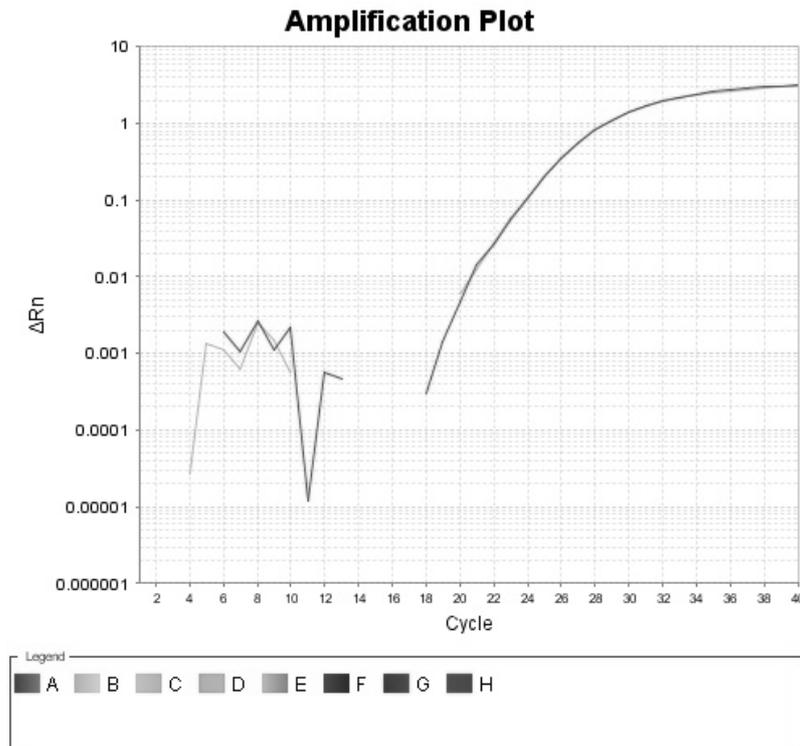


Abbildung 5: Beispielhafte Ergebnisanzeige der Rohdaten der Duplikate der Probe 10-429 mit dem Gen SLC16A3 als Graph (am Computer in Farbe, hier in Graustufen). Die x-Achse zeigt die Anzahl an Circles, die Y-Achse zeigt logarithmisch aufgetragen die Änderung der Extinktion. Man sieht, dass nach anfänglich nicht auswertbaren Messungen sich zwei ordentliche Kurven gebildet haben, die direkt übereinander liegen und fast nicht voneinander zu unterscheiden sind. Dies zeigt an, dass die Reaktion gut funktioniert hat und gibt einen ersten Hinweis auf die gute Verwertbarkeit der Ergebnisse. Genauer beweist man dies jedoch durch Verwendung der direkten Zahlenergebnisse.

Diese Rohdaten ließen sich in eine Excel-Tabelle exportieren, und lagen dort in der Form vor, dass unten in der Mappe „Results“ in Spalte A die zugewiesene Position auf der Platte aufgeführt war, in Spalte B die zugewiesene Probe, in Spalte C das zugewiesene Gen, in Spalte E die Art des Farbstoffs und in Spalte J der ermittelte Ct-Wert. Die anderen Mappen der Rohdatei enthalten weitere Informationen zu Einstellungen

und tatsächlichen Messergebnissen, die aber für die Auswertung der Daten nicht weiter wichtig sind. Im Falle von Fehlmessungen können diese Informationen weitere Rückschlüsse auf die Fehlerquelle zulassen. Abbildung 6 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt aus der exportierten Tabelle.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	Block Typ	96well																
2	Chemistry	TAQMAN																
3	Experiment	D:\Applied Biosystems\StepOne Software v2.3\experiments\Buehrmann\20180128_3_TMPRSS2x31_2.eds																
4	Experiment	2018-01-28 16:23:27 PM CET																
5	Instrument	steponeplus																
6	Passive Reference	ROX																
7																		
8	Well	Sample No	Target Name	Task	Reporter	Quencher	RQ	RQ Min	RQ Max	Cr	Cr Mean	Cr SD	ΔCr	ΔCr Mean	ΔCr SE	HK Control	HK Control	ΔΔCr
9	A1	08-051	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					23.7626	23.45671	0.296902						
10	A2	10-124	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					23.44058	23.14528	0.258766						
11	A3	03-189	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.73119	22.61112	0.129353						
12	A4	03-229	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.87849	22.65556	0.456941						
13	A5	03-238	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.88022	21.96301	0.087875						
14	A6	03-254	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.2767	20.94196	0.300475						
15	A7	03-302	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.8672	21.74673	0.177485						
16	A8	04-345	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					25.39496	25.28859	0.094191						
17	A9	04-391	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.38129	21.07184	0.27171						
18	A10	04-516	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.26225	21.93865	0.282						
19	A11	04-494	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.96361	23.16444	0.183071						
20	A12	06-085	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.0315	21.94266	0.118875						
21	B1	08-051	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					23.43783	23.45671	0.296902						
22	B2	10-124	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					23.03711	23.14528	0.258766						
23	B3	03-189	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.62804	22.61112	0.129353						
24	B4	03-229	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.12994	22.65556	0.456941						
25	B5	03-238	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.05521	21.96301	0.087875						
26	B6	03-254	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					20.85359	20.94196	0.300475						
27	B7	03-302	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.54292	21.74673	0.177485						
28	B8	04-345	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					25.25506	25.28859	0.094191						
29	B9	04-391	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					20.9619	21.07184	0.27171						
30	B10	04-516	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.80832	21.93865	0.282						
31	B11	04-494	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					23.32199	23.16444	0.183071						
32	B12	06-085	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.80762	21.94266	0.118875						
33	C1	08-051	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					23.16969	23.45671	0.296902						
34	C2	10-124	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.95815	23.14528	0.258766						
35	C3	03-189	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.47414	22.61112	0.129353						
36	C4	03-229	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					22.95823	22.65556	0.456941						
37	C5	03-238	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.95361	21.96301	0.087875						
38	C6	03-254	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					20.69557	20.94196	0.300475						
39	C7	03-302	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.83009	21.74673	0.177485						
40	C8	04-345	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					25.21576	25.28859	0.094191						
41	C9	04-391	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					20.87232	21.07184	0.27171						
42	C10	04-516	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					21.7454	21.93865	0.282						
43	C11	04-494	TMPRSS2	UNKNOWIFAM	NFQ-MGB					23.20774	23.16444	0.183071						

Abbildung 6: Beispielhafter Ausschnitt einer Ergebnistabelle der Rohdaten. Relevant für die Auswertung sind insbesondere die Spalten B, C und J mit Daten zur Probennummer, zum untersuchten Gen und zum Ct-Wert. Man kann erkennen, dass das Programm im ddCT-Modus ebenfalls Werte für dCT und ddCT berechnen kann, sofern eine Referenzprobe angegeben wird. Dies ist aber nicht zwingend erforderlich – zum Einsparen von Durchläufen und zum sparsamen Umgang mit den verfügbaren Materialien wurde auf die wiederholte Analyse der Referenzprobe verzichtet und die Werte für dCT und ddCT später in der Datenbank manuell berechnet.

Es wurden wiederum aus dieser Datei die genannten Daten zur Probe, zum untersuchten Gen und zum Ct-Wert exportiert und mit den Ergebnissen aller anderen Durchläufe und Recherchen zusammengeführt. Hieraus wurde eine anonymisierte Datenbank erstellt, die einen Rückschluss auf die einzelne Person nicht ermöglichte. Hierzu wurden den Patienten Nummern gegeben, die Initialen und Geburts- und OP-Daten entfernt,

sowie die einzelnen Messwerte nach Bildung von Mittelwerten ebenfalls entfernt. Zur weiteren Bearbeitung wurden diese anonymisierten Informationen als Ganzes in eine SPSS-Datenbank überführt, in der die weiteren Berechnungen durchgeführt wurden.

### 2.2.10 Berechnung der Ratio nach der $\Delta Ct$ -Methode

Zum statistischen Vergleich der unterschiedlichen Daten ist es praktikabel, die Ratio nach dem  $\Delta Ct$ -Standard zu berechnen.

Als erster Schritt wurde die  $\Delta Ct$  ermittelt. Wichtig war, dass jeweils derselbe Proband zu den Proben gehörte, es unterschied sich in diesem Schritt nur das jeweils untersuchte Gen. Dadurch war es möglich, alle ermittelten Cycles auf die enthaltene Gesamt-Genmenge umzurechnen und dadurch untereinander vergleichbar zu machen. Es wurde zuerst der Mittelwert aller gültigen Cycles berechnet. Dieser Mittelwert wird in die folgende Formel eingesetzt:

$$\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{Housekeeping-Gen}$$

Zum Vergleich der Proben untereinander musste nun eine Referenzprobe bestimmt werden, die als Vergleichspartner für alle anderen Proben verwendet wurde. Welche Probe gewählt wurde, war für die Analyse irrelevant. Für diese Arbeit wurde die Probe 08-119 als Referenzprobe bestimmt, da sie relativ nah an die bei der Umschreibung geforderte Konzentration von 1.000 ng/ $\mu$ l herankam. In diesem zweiten Schritt waren die untersuchten Gene gleich, es handelte sich jedoch um Proben verschiedener Probanden. Dieser Rechnungsschritt stellte den direkten Vergleich der verschiedenen Probanden untereinander dar. Es folgte die Berechnung der  $\Delta\Delta Ct$  mittels folgender Formel:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Probe} - \Delta Ct_{Referenzprobe\ 08-119}$$

Die für die weiteren statistischen Tests verwendete Ratio wurde im dritten Schritt durch Einsetzen in die untenstehende Formel ermittelt. Sie stelle laut Literatur das beste Mittel zum Vergleich der Gene und Patienten untereinander dar, da die Werte in den meisten Fällen nicht normalverteilt seien und die Logarithmierung das Mittel der Wahl sei, um die unbehandelten Ergebnisse zu entzerren (toptipbio.com). Die Basis des

Exponenten gibt gleichzeitig die erwartete Effizienz der einzelnen PCR-Durchläufe an. Die Basis 2 geht jeweils von einer Verdopplung der Genmenge pro Zyklus aus (Scientific).

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Eine Ratio von 1 bedeutet genau gleiche Ausprägung des Zielgens im Vergleich zu der Referenzprobe. Werte  $> 1$  bedeuten stärkere Ausprägung, Werte  $< 1$  entsprechend geringere Ausprägung. Genauer bedeutet eine Ratio von 2 eine doppelt so starke Ausprägung im Vergleich zur Referenzprobe, während eine Ratio von 0,5 eine halb so starke Ausprägung anzeigt – sofern von einer jeweiligen Verdopplung der Genmenge pro Zyklus ausgegangen werden kann.

Die Berechnungen dieses Kapitels wurden mittels Microsoft Excel 365 durchgeführt und zur Vermeidung von Eingabefehlern anschließend mit IBM SPSS Statistics 25 kontrolliert.

### **2.3 Heranziehung von Daten aus der TCGA-Datenbank**

The Cancer Genome Atlas Program (TCGA, National Cancer Institute & National Human Genome Research Institute, USA) ist eine öffentlich zugängliche Datenbank, die Veränderungen des Genoms innerhalb verschiedener Tumorerkrankungen zentral sammeln und jedermann zugänglich machen soll. Ziel ist es, durch die großen gebündelten Datenmengen eventuelle Rückschlüsse zu neuen diagnostischen Möglichkeiten und auch neuen Behandlungsstrategien ziehen zu können und in diesen neu ermittelten Bereichen weiter forschen zu können (Institute, Institute).

Zur Validierung der ermittelten Daten dieser Arbeit sollte ein Abgleich mit der TCGA-Datenbank erfolgen. Hierzu mussten zuerst die passenden Datensätze aus der Datenbank ausgewählt, heruntergeladen und anschließend in die Statistiksoftware importiert werden.

### 2.3.1 Auswahl und Download der Daten

Es erfolgte zunächst der direkte Zugriff auf die TCGA-Datenbank unter <https://portal.gdc.cancer.gov/>. Hier gestaltete sich der Download der entsprechenden Daten jedoch als schwierig, insbesondere die Auswahl der benötigten Dateien aus den entsprechenden Kategorien war sehr undurchsichtig.

Zur einfachen Auswahl der passenden Datensätze wurde das online-Tool cBioPortal for Cancer Genomics verwendet (Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013). Dieses Portal wurde dafür entwickelt, Datensätze aus frei zugänglichen Analysedatenbanken zusammenzuführen und herunterzuladen. Unter anderem unterstützt es mRNA-Expressionsdaten, wodurch es sich für diese Arbeit in ganz besonderem Maße eignete.

Bei dem Download der passenden Daten aus der TCGA-Datenbank unterstützte mich Prof. Dr. Tilman Todenhöfer (Universitätsklinik für Urologie, Tübingen)

1. Auf der Webseite [www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org) wurde der Tab Download gewählt.
2. Links unter *Prostate* wurde *Prostate Adenocarcinome TCGA Provisional (499 samples)* ausgewählt.
3. Im nächsten Schritt unter *Select Genomic profiles* wurde *mRNA expression (RNA Seq V2 RSEM)* gewählt.
4. Im nächsten Feld unter *Select Patient/Case set* blieb die Einstellung unverändert auf *All samples (499)*.
5. Unter *Enter genes* blieb im Auswahlfeld *User-defined list* ausgewählt, im Feld darunter wurden nun die bereits untersuchten Gene eingegeben. Eine Trennung mehrerer Gene voneinander geschah mittels Leerzeichen. Es erfolgte folgende Eingabe: *HPRT1 UCHL5 AR KLK2 TMPRSS2 SLC2A1 SLC16A3 LDHA*. Unter dem Eingabefeld erschien ein grüner Haken mit *All Gene Symbols are valid*.
6. Als vorletzter Schritt musste noch der Haken bei *Transpose data matrix* gesetzt werden.
7. Download anklicken.

Die heruntergeladene Datei im .txt-Format enthielt Datensätze von 499 Probanden.

Die folgende Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Auswahlfelder vom cBioPortal bis zum Download-Button.

## Material und Methoden

Abbildung 8 zeigt den Anfang des heruntergeladenen Textdokuments, das mittels Microsoft Editor geöffnet wurde. Es wurde im Anschluss in SPSS importiert.

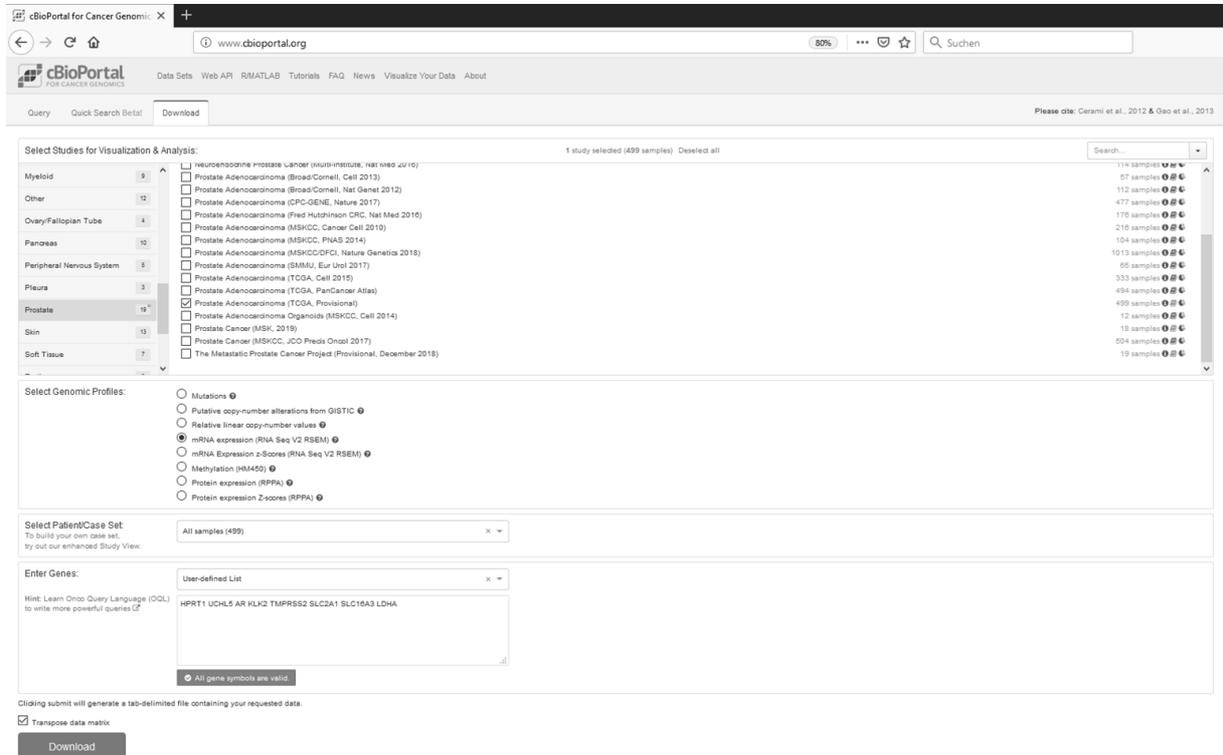


Abbildung 7: Screenshot der Oberfläche vom cBioPortal und der dort auszuwählenden Felder bis zum Download (Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013).

GENE_ID	COMMON AR	HPRT1	KLK2	LDHA	SLC16A3	SLC2A1	TMPRSS2	UCHL5											
367	3251	3817	3939	9123	6513	7113	51377												
TCGA-CH-5767-01	1008.6207			511.6192		128965.1462		7686.2819											
TCGA-G9-6332-01	138.2792			760.7550		153719.9298		8418.3494											
TCGA-G9-6336-01	206.3994			599.9747		134750.9801		7738.4596											
TCGA-G9-6348-01	131.2840			653.2181		117253.6023		11637.2078											
TCGA-G9-6356-01	456.7948			484.9638		69332.6989		8190.3312											
TCGA-G9-6362-01	83.0744	1168.9289			185469.1742	8983.8103	115.7809	551.4309											
TCGA-G9-6363-01	130.5242			841.7266		69894.1418		10470.7091											
TCGA-G9-6364-01	597.6961			517.9442		102658.8392		7546.3004											
TCGA-G9-6365-01	192.3379			606.4985		81009.2080		7718.8850											
TCGA-G9-6367-01	551.3050			358.5985		200354.6657		3991.0619											
TCGA-G9-6370-01	627.2984			327.0863		59711.4569		4286.4215											
TCGA-G9-6371-01	451.8412			574.3688		230745.8519		7304.3189											
TCGA-G9-6373-01	168.1799			574.1461		65584.5223		7715.0886											
TCGA-G9-6378-01	245.9988			486.6627		65138.7078		3456.4315											
TCGA-G9-6384-01	1278.7392			427.7193		105025.7015		7110.9802											
TCGA-G9-6385-01	460.0142			391.7197		162466.3836		5355.6263											
TCGA-G9-6494-01	635.6176			402.5441		120720.9684		4014.3619											
TCGA-G9-6496-01	153.7356			835.4885		104375.7184		5555.3161											
TCGA-EJ-7123-01	1414.2962			510.8327		157427.5608		5895.6522											
TCGA-EJ-7125-01	1855.3244			451.2056		178697.7129		10244.0236											
TCGA-G9-6329-01	141.7792			549.2454		104806.6005		8266.4813											
TCGA-G9-6333-01	174.4841			589.1182		189848.4053		6075.0469											
TCGA-G9-6338-01	150.3198			668.9765		72278.7846		9115.6716											
TCGA-G9-6342-01	340.7811			490.4632		98075.2044		7123.3424											
TCGA-G9-6343-01	183.7386			589.5357		251649.7175		5184.4756											
TCGA-G9-6351-01	234.4032			500.1803		167955.2831		5431.3018											
TCGA-G9-6353-01	420.1183			411.2426		136039.5710		5105.7692											
TCGA-G9-6361-01	204.3489			541.9125		100486.6219		6947.5386											
TCGA-G9-6369-01	162.3423			1293.9776		217289.6929		6250.4166											

Abbildung 8: Anfang des Textdokuments mit den heruntergeladenen Daten aus der TCGA-Datenbank.

### 2.3.2 Import der Daten in SPSS

Zur statistischen Verwertbarkeit musste die Textdatei in SPSS eingelesen werden. Hierzu wurde die heruntergeladene Textdatei per drag-and-drop in das SPSS-Feld gezogen. Nach der Berechnung einer ersten Vorschau startete automatisch der Assistent für Textimport von SPSS. Dort erfolgten folgende Eingaben:

1. Weist die Textdatei ein vordefiniertes Format auf? → Nein, weiter.
2. Variablenanordnung? → Mit Trennzeichen  
 Nummer der Zeile mit Variablenname? → 2  
 Was ist das Dezimalzeichen? → Punkt  
 Weiter
3. Zeile mit erstem Fall? → 3  
 Wie viele Fälle sollen importiert werden? → Alle  
 Weiter
4. Welches Zeichen trennt die Variablen? → Tabulator  
 Bei führende und nachfolgende Leerzeichen wurde nichts angewählt

Bei Texterkennungsmerkmal wurde keines ausgewählt

Weiter

5. In Schritt 5 können die Variablen neu benannt und das Datenformat neu gewählt werden. Hier wurde für die erste Spalte statt *Common* Fallnummer als Zeichenfolge eingegeben, die Gene blieben unverändert benannt und wurden als Zahlenformat festgelegt.

Weiter

6. Die Einstellungen sollten nicht als Vorlage gespeichert werden, ebenfalls sollte die Syntax auch nicht eingegeben werden.

Fertigstellen

7. In der Ausgabe wurde eine Fehlermeldung angezeigt: bei den Genen gibt es fehlende Werte. Das liegt daran, dass bei Fall 122 keine entsprechenden Werte eingegeben worden sind. Dieser Fall wurde aus der Datenbank entfernt, sodass nunmehr 498 Datensätze in der Datenbank enthalten waren.
8. Bei der angezeigten Datenbank wurden die festgelegten Datenformate und Messniveaus kontrolliert. Diese waren bei der als Zeichenfolge formatierten Fallnummer nominal und bei den einzelnen Genen numerisch mit metrischem Messniveau.
9. Die erzeugte Datenbank wurde unter `TCGA_ *Datum*.sav` gespeichert und für die weiteren statistischen Analysen verwendet.

## 2.4 Statistische Analyse der ermittelten Daten

Zur Erstellung einer deskriptiven Statistik, sowie zur statistischen Analyse von Verteilungen, zur Signifikanzanalyse und zum Erstellen von Diagrammen und weiteren die Statistik betreffenden Tabellen wurde das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 25 für PC (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) verwendet. Hierbei wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  als statistisch signifikant erachtet.

Zuerst war es notwendig, sich mit möglichen statistischen Tests auseinanderzusetzen, sowie deren Anwendungsbereiche und Berechnungen kennenzulernen. Dazu werden in den folgenden Unterkapiteln die verwendeten statistischen Tests vorgestellt, die nach Empfehlungen des Ärzteblatts für diese Arbeit ausgewählt worden sind (Prel, 2010).

### 2.4.1 Kodierung von Gleason-Score, T-Stadium und Risikogruppe

Zur vereinfachten graphischen Darstellung und zur Ermöglichung des Rechnens mit statistischen Tests wurden für das T-Stadium und die Risikogruppe Ränge entsprechend folgender Tabelle vergeben und mit diesen die Berechnungen durchgeführt. In den entsprechenden Kapiteln und unter den Diagrammen wird auf diese Tabelle verwiesen.

Rang	Gleason-Score	T-Stadium	Risikogruppe	Rang	Gleason-Score	T-Stadium	Risikogruppe
1	2	T1	Very low risk	8	8	T4	
2	3	T2a	Low risk	9	9		
3	4	T2b	Intermediate risk	10	10		
4	5	T2c	High risk				
5	6	T3a	Very high risk				
6	7a	T3b					
7	7b	T3c					

Tabelle 9: Vergebene Ränge zur einfacheren graphischen Darstellung und vor allem für Berechnungen mit dem T-Stadium und der durch den kombinierten Gleason-Score ermittelten Risikogruppe (low/mid/high-risk carcinoma).

## 2.4.2 Deskriptive Statistik und Prüfung des Kollektivs auf Plausibilität

Es wurden zunächst die Patientenstammdaten verarbeitet. Bei den jeweiligen Parametern Alter, Körpergröße und Körpergewicht wurden zunächst die Häufigkeiten und die Verteilung der Daten erfasst. Es wurden Minimum, Maximum, Median, die Quartilen, sowie Mittelwert und Standardabweichung erfasst. Zusätzlich erfolgte eine Vortestung auf Normalverteilung mit Hilfe von Histogrammen mit eingezeichneter Normalverteilungskurve und Q-Q-Diagrammen.

Q-Q-Diagramme dienen zur Einschätzung, inwiefern Messwerte einer Normalverteilung entsprechen könnten. Sie zeigen als 45°- Ausgleichsgerade die erwartete Häufigkeit im Falle einer Normalverteilung, die tatsächlichen Werte sind ebenfalls aufgetragen. Je genauer die Verteilung der Messwerte der Idealgeraden entspricht, desto eher liegt auch eine Normalverteilung vor.

Bei den laut Vortestung möglicherweise normalverteilten Daten erfolgte dann der Versuch des Beweises der Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests und Shapiro-Wilk-Tests.

Der Kolmogorov-Smirnov-Test vergleicht die jeweiligen Messwerte mit einer hypothetischen Normalverteilungskurve und berechnet deren Abweichung. Ist die flächenmäßige Abweichung oberhalb eines kritischen Wertes, muss die Hypothese einer bestehenden Normalverteilung verworfen werden (Ebermann, 2010).

Der Shapiro-Wilk-Test vergleicht vereinfacht die Varianz der Stichprobe mit der erwarteten Varianz im Falle einer Normalverteilung. Je nach Abweichung oder Übereinstimmung wird die Nullhypothese, dass eine Normalverteilung vorliegt, nicht verworfen (Shapiro, 1965). Schwierig ist bei diesem Test, dass mit niedriger werdendem p-Wert eine höhere Wahrscheinlichkeit für die irrtümliche Annahme einer Normalverteilung vorliegt. Darum ist die mehrfache Testung und vorherige Inaugenscheinnahme der Verteilungsgraphen sinnvoll.

Auf dieselbe Weise wurde im Anschluss auch mit den restlichen Daten verfahren. Hierzu zählen die erfassten klinischen Daten: präoperativ gemessenes freies PSA, Tumorstadium nach T, N und M, kombinierter Gleason-Score, Risikogruppe nach NCCN.

Anschließend wurde das Kollektiv auf Plausibilität geprüft, also die Verteilung der Stammdaten im Kollektiv mit veröffentlichten Daten der jeweiligen Verteilung in der Allgemeinbevölkerung verglichen. Zusätzlich erfolgte die Überprüfung logisch nachvollziehbarer und bereits bewiesener Umstände, also eine Korrelation vom Alter mit der Prostatagröße, die Korrelierung von Prostatagröße und -gewicht, sowie die Korrelation dieser genannten Werte mit dem PSA-Wert.

### **2.4.3 Nachweis der Korrelationen mittels Student's t-Test für unabhängige Stichproben**

Die weiteren Korrelationen zuerst der Stammdaten untereinander, dann der klinischen Daten untereinander, der klinischen Daten mit den experimentellen Daten und der experimentellen Daten untereinander erfolgte mittels Student's t-Test für unabhängige Stichproben. Als Trennmarke der beiden zu bildenden Gruppen ist jeweils der Median verwendet worden. Dies bewirkt, dass im Vergleich zum Mittelwert als Trennmarke einerseits Ausreißer keine zu starke Gewichtung erhalten und andererseits die beiden verglichenen Gruppen in etwa gleich groß sind.

Als Vortest musste der Levene Test der Varianzgleichheit durchgeführt werden. Der Levene Test der Varianzgleichheit testet, ob sich die Varianz von zwei Gruppen unterscheidet. Die Nullhypothese lautet, dass eine Varianzgleichheit vorliegt. Diese darf nur bei einem p-Wert  $< 0,05$  abgelehnt werden. Ziel ist bei diesem Test also eine Signifikanz mit  $p > 0,05$  zum Nachweis der Varianzgleichheit.

Dieser Test ist notwendig für die Anwendbarkeit des T-Tests für unabhängige Stichproben.

Im Anschluss wurde jeweils der Student's t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Der t-Test für unabhängige Stichproben überprüft, ob die Mittelwerte zweier Stichproben verschieden sind. Voraussetzung zur Anwendbarkeit ist eine Intervallskalierung der abhängigen Variable. Diese muss normalverteilt sein (Zürich, 2018). Dies sei laut zentralem Grenzwertsatz aber bei  $> 30$  Analysen vernachlässigbar, vgl. dazu *Kapitel 2.4.4 Zentraler Grenzwertsatz der Statistik*. Ebenfalls muss zur Gruppierung eine unabhängige Variable vorhanden sein. In beiden Gruppen muss die Varianz annähernd identisch sein (Nachweis mittels Levene-Tests). Die einzelnen Messwerte

müssen voneinander unabhängig sein.

Die Nullhypothese lautet, dass kein Unterschied beider Gruppen bezüglich der abhängigen Variable vorliegt. Um diese Nullhypothese verwerfen zu können, muss  $p < 0,05$  sein. Ziel zum Nachweis eines signifikanten Unterschieds ist also ein  $p < 0,05$ .

In SPSS ist der Test zu finden unter Analysieren > Mittelwerte vergleichen > T-Test für unabhängige Stichproben (Zürich, 2019).

### **2.4.4 Zentraler Grenzwertsatz der Statistik**

Der zentrale Grenzwertsatz der Statistik besagt, dass sich die Verteilung der Mittelwerte mehrerer Stichproben mit zunehmender Zahl an Stichproben immer weiter einer Normalverteilung annähert. Einschränkend muss erwähnt werden, dass dies nur auf natürliche oder zufällige Ereignisse zutrifft, wie z.B. die Körpergröße bei Männern oder die Körpergröße bei Frauen, jeweils einzeln betrachtet. Ausgehend von der Hypothese, dass der zentrale Grenzwertsatz auf die Genexpression beim Prostatakarzinom anwendbar ist, sind bei > 30 Analysen (hier 102) trotzdem parametrische Tests durchführbar (Weigand, 2009).

### **2.4.5 Darstellung der Ergebnisse**

Zur Darstellung der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit wurde pro Parameter jeweils eine Tabelle mit den Gruppenstatistiken der beiden verglichenen Gruppen erstellt, in die direkt der T-Wert und das Signifikanzniveau eingetragen wurden. Ergibt der Levene-Test der Varianzgleichheit ein signifikantes Ergebnis, so sind die Varianzen nicht gleich, sodass in der Tabelle die jeweils nächste Zeile für Varianzungleichheit verwendet werden muss. Die entsprechend signifikanten Ergebnisse sind überall grau markiert.

Um zusätzlich zu den Zahlenwerten eine bessere Idee von der Verteilung bzw. der Korrelation zweier Variablen desselben Patienten gewinnen zu können, wurde unter der Tabelle jeweils ein Streudiagramm mit Ausgleichsgerade abgebildet. Zur Erstellung eines Streudiagramms werden die Achsen eines Koordinatensystems jeweils mit den darzustellenden Parametern beschriftet und die daraus resultierenden Punkte markiert. Es entsteht eine Punktwolke, durch die eine Ausgleichsgerade gezogen

werden kann und die Rückschlüsse auf eine ggf. bestehende Korrelation zulässt. Wenn mehrere Parameter verglichen werden sollen, können unterschiedliche Farben und Skalierungen verwendet werden. Beachtet werden muss, dass je nach Skalierung der Achsen eine Korrelation vorgetäuscht oder unerkannt bleiben kann. Daher ist stets die Überprüfung mittels statistischer Tests notwendig (Center).

Für die Darstellung der Verteilung von ordinalskalierten Parametern ist ein Box-Plot deutlich besser geeignet als ein Streudiagramm, da ein Boxplot die Gruppenbildung besser widerspiegelt. Ein Boxplot besteht für jede Datenkategorie aus einer Box, die die Daten zwischen der ersten und dritten Quartile widerspiegelt. Sie enthält einen Strich als Unterteilung, die dem Median entspricht. Folglich enthält die Box die Hälfte der vorliegenden Daten. Die Länge der angehängten Antennen entspricht dem Wert, der gerade noch in maximal dem 1,5-fachen des Interquartilabstandes liegt. Ausreißer sind als Kreise, extreme Ausreißer als Sternchen außerhalb der Antennen dargestellt. Antennen und Ausreißer entsprechen den äußeren Quartilen, vom Median aus gesehen, und damit ebenfalls 50% der Daten. Zum Vergleich mehrerer Datenkategorien werden mehrere dieser Boxplots nebeneinander abgebildet.

Im Anschluss an die Auswertung der eigenexperimentell bestimmten Daten wurde mit den aus der TCGA-Datenbank ermittelten Daten ebenso verfahren. Die Darstellung der so bezogenen Vergleichs-Ergebnisse erfolgte gesondert in einem eigenen Kapitel, um eine Vermischung der Ergebnisse zu vermeiden und die Auswertung und den Vergleich der Ergebnisse in der späteren Diskussion vornehmen zu können. Aus der TCGA-Datenbank wurden leider keine klinischen Daten erhalten, es handelte sich lediglich um Daten zur Ausprägung der einzelnen Gene.

## **2.5 Datenschutz**

Bei der Gewinnung der Proben, der Datenerfassung, der Speicherung und Auswertung wurde mit allen Daten der vertrauliche Umgang, die ärztliche Schweigepflicht und die Auflagen des Datenschutzes beachtet. Die Gewinnung der Proben und die klinische Datenerfassung vor der endgültigen Anonymisierung wurden ausschließlich durch schweigepflichtiges Personal durchgeführt, das direkt an der Studie mitgewirkt

hat. Die Dateneingabe erfolgte vor der Anonymisierung ausschließlich an Computern, die vom Kliniknetzwerk abgekoppelt waren und keinen Internetanschluss besaßen. Die Daten wurden direkt nach der Erfassung der klinischen Parameter unwiderruflich anonymisiert und lagen danach ausschließlich in anonymisierter Form (laufende Patientennummern 1, 2, 3 etc.) vor. Nur in dieser Form wurden sie bearbeitet und weitergegeben. In der anonymisierten Datenbank sind keine Initialen oder Geburtsdaten vorhanden. Eine Rückführung der Daten war zu keinem Zeitpunkt möglich. Erst nach der endgültigen Anonymisierung und auch Entfernung der einzelnen Messwerte wurden statistische Analysen an der Datenbank durchgeführt, da hierzu eine Verbindung mit dem Universitätsnetzwerk notwendig war.

### **2.6 Ethik**

Die retrospektive Untersuchung der Proben, sowie die Erfassung der Ergebnisse in der Datenbank wurde bei Beachten der o.g. Datenschutzbestimmungen durch das Votum der Ethik-Kommission der Universitätsklinik Tübingen mit der Nummer 575/2018B02 uneingeschränkt genehmigt.

Die initiale Asservierung des Gewebes erfolgte gemäß Votum Nr. 279/2010BO2 oder routinemäßig. Die Patienten wurden vor der Operation ausführlich über die Asservierung zu Studienzwecken mündlich und schriftlich aufgeklärt. Allen Patienten wurden diesbezüglich die gleichen Informationen mitgeteilt. Es erfolgten dadurch keine weiteren Untersuchungen oder Maßnahmen direkt an oder mit den Patienten. Die durchgeführten Operationen waren medizinisch notwendig und wurden durch die Studienteilnahme weder verzögert noch erschwert. Für den Patienten ergab sich durch die Teilnahme an der Studie kein Vor- oder Nachteil bezüglich der Behandlung.

### 3 Ergebnisse

Der Zusammenstellungsprozess des Patientenkollektivs ist in Kapitel 2.1 ausführlich beschrieben worden. Im Folgenden sollen die Eigenschaften des Kollektivs hinsichtlich Stammdaten, klinischer tumorspezifischer Daten und der im Labor ermittelten Daten beschrieben werden.

Dabei werden zuerst die Häufigkeiten und deren Verteilung genannt. Dies ist interessant, um die ungefähre Lage der Werte abschätzen zu können. Zur Vereinfachung werden die Werte auch mit Hilfe von Histogrammen visualisiert. Dabei geben die Balken die jeweilige Häufigkeit der Messwerte an, wohingegen die schwarze Linie die erwartete Häufigkeit bei Normalverteilung zeigt.

Bei den Q-Q-Diagrammen stellt die schwarze Linie auch die Normalverteilung dar. Die einzelnen Messwerte werden dort nicht gruppiert, sondern als Messpunkte eingetragen. Derartige Diagramme geben einen weiteren Hinweis darauf, ob die Messwerte normalverteilt sind oder nicht. Den Beweis, dass Werte normalverteilt sind, kann nur ein statistischer Test bringen.

#### 3.1 Patientenstammdaten

Das mediane **Alter** des Kollektivs lag bei 66 Jahren, die Hälfte der Patienten war zwischen 61 und 70 Jahre alt, der jüngste Patient war 51 und der Älteste 77.

Der Mittelwert der **Körpergröße** liegt bei 175,3 cm. Die untere Quartile liegt bei 170 cm, der Median bei 175 cm, die obere Quartile liegt bei 180 cm. Der kleinste Patient war 162 cm groß, der Größte maß 196 cm.

Bei dem **Körpergewicht** lag der Mittelwert bei 83,8 kg. Die untere Quartile lag bei 76,75 kg und die obere Quartile bei 90,50 kg. Der leichteste Patient wog 62 kg, der schwerste 115 kg.

	Gültig	N Fehlend	Mittelwert	Std.- Abw.	Min	Max	Perzentile		
							25	50	75
Alter bei OP	101	1	65,4	6,42	51,00	77,00	61,00	66,00	70,00
Körpergröße (cm)	97	5	175,3	6,76	162,00	196,00	170,00	175,00	180,00
Körpergewicht (kg)	97	5	83,8	10,64	62,00	115,00	76,75	84,00	90,50

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der klinischen Patientendaten.

## 3.2 Klinische Daten

### 3.2.1 Präoperative PSA-Werte

Der Median der präoperativ gemessenen PSA-Werte lag bei 8,2 ng/ml. Die weitere Verteilung ist in Tabelle 11 dargestellt. Abbildung 9 stellt die Verteilung graphisch dar und verdeutlicht, dass die meisten Patienten einen PSA < 20 ng/ml hatten. Es zeigt sich bereits hier, dass beim PSA keine Normalverteilung vorliegt, da die Balken im Diagramm zu sehr von der Ausgleichskurve abweichen.

Beschreibung	PSA [ng/ml]
Maximum	53,4
Obere Quartile	12,7
Median	8,2
Untere Quartile	5,9
Minimum	1,1

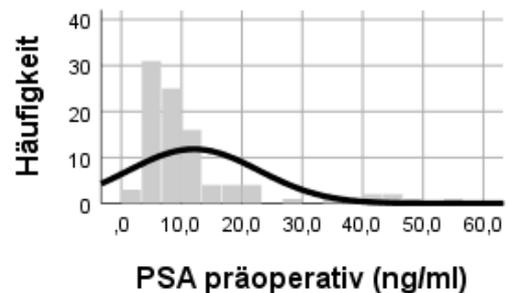


Tabelle 11: Verteilung der PSA-Werte.

Abbildung 9: Histogramm zur Verteilung der präoperativ gemessenen PSA-Werte mit eingezeichneter erwarteter Häufigkeit bei Normalverteilung. Standardabweichung 10,8.

### 3.2.2 Tumorstadium nach TNM-Klassifikation

Zum Zeitpunkt der Operation hatten 49% der Patienten mit einem dokumentierten T-Stadium niedriger als T3 eine organbegrenzte Tumorausdehnung. Bei 51% der Patienten mit dokumentiertem T-Stadium war im Prostatapräparat histologisch ein die Prostatakapsel überschreitendes Wachstum nachweisbar, was einem Stadium  $\geq$  T3a entspricht. Die genaue Stadienverteilung des T-Stadiums ist in Tabelle 12 dargestellt.

	T-Stadium	Häufigkeit	Prozent	Gültige Pro- zente	Kumulierte Pro- zente
Gültig	2a	6	5,9	6,0	6,0
	2c	43	42,2	43,0	49,0
	3a	22	21,6	22,0	71,0
	3b	25	24,5	25,0	96,0
	3c	1	1,0	1,0	97,0
	4	3	2,9	3,0	100,0
	Gesamt	100	98,1	100,0	
Fehlend		2	1,9		
Gesamt		102	100,0		

Tabelle 12: Verteilung der Tumorstadien: 49% der Patienten hatten ein T-Stadium niedriger als T3.

Lymphonodale Metastasen entsprechend eines N1-Status hatten 19%, die Tumoren von 81% der Probanden hatten mit N0 nicht in die Lymphknoten metastasiert.

Der M-Status war leider bei den wenigsten Patienten erfasst, sodass eine statistische Auswertung zu Fernmetastasierungen an dieser Stelle nicht möglich war. Ein M1-Status war lediglich bei 3 Patienten beschrieben. Es kann davon ausgegangen werden, dass in den allermeisten Fällen ein M0-Status vorliegt. In der Regel müssen Patienten vor einer Prostatektomie ein Staging durchlaufen, in dem eine Metastasierung auffallen würde. Dieses wird im Regelfall spätestens postoperativ, aber noch vor der Entlassung durchgeführt. Wenn Fernmetastasen gefunden werden, wird dies im Entlassbrief explizit erwähnt, damit der Patient zeitnah die adäquate und stadienangepasste Therapie erhalten kann. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in dieser Arbeit hauptsächlich nicht fernmetastasierte Karzinomzellen untersucht wurden.

### 3.2.3 Kombiniertes Gleason Score

Von den an der Studie teilnehmenden Patienten hatten laut Pathologiebericht der entnommenen Prostata 35,4% eine Gleason-Summe  $\leq 7a$ , während 64,6% eine Gleason-Summe  $\geq 7b$  hatten. Genauer hatten 9,1% einen kombinierten Gleason-Score von 5-6, 56,6% hatten eine Gleason-Summe von 7. Bei 34,3% der Probanden wurde ein Karzinom mit einem entsprechenden kombinierten Gleason-Score von 8-10 entfernt. Die genaue Verteilung der einzelnen Scores ist in Tabelle 13 genauer aufgeführt.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Pro- zente	Kumulierte Pro- zente
Gültig	5	1	1,0	1,0	1,0
	6	8	7,8	8,1	9,1
	7a	26	25,5	26,3	35,4
	7b	30	29,4	30,3	65,7
	8	13	12,7	13,1	78,8
	9	19	18,6	19,2	98,0
	10	2	2,0	2,0	100,0
	Gesamt	99	97,1	100,0	
Fehlend	Fehlend	3	2,9		
Gesamt		102	100,0		

Tabelle 13: Verteilung der Patienten nach kombiniertem Gleason-Score. Unterschieden ist die Gleason-Summe von 7 in 7a (3+4) und 7b (4+3).

### 3.2.4 Verteilung hinsichtlich Risikogruppe nach NCCN

Die Kriterien zur Einteilung der Karzinome in low-, intermediate- und high-risk Karzinome nach NCCN finden sich in Kapitel 1.2.6.2 wieder. 6,9% der Patienten hatten ein low-risk Karzinom, die Masse hatte mit 52% ein intermediate Risk Karzinom. Ein High Risk bzw. Very High Risk Karzinom hatten zusammen 36,2% der Probanden. Die Verteilung der Häufigkeiten ist in Tabelle 14 dargestellt.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Pro- zente	Kumulierte Pro- zente
Gültig	Low Risk	7	6,9	7,2	7,2
	Intermediate Risk	53	52,0	54,7	61,9
	High Risk	8	7,8	8,2	70,1
	Very High Risk	29	28,4	29,9	100,0
	Gesamt	97	95,1	100,0	
Fehlend		5	4,9		
Gesamt		102	100,0		

Tabelle 14: Tabelle zur Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Risikogruppen nach NCCN.

### 3.3 Prüfung des Kollektivs auf Plausibilität

Entsprechend der Verteilung in der Gesamtbevölkerung sollten auch in diesem Kollektiv natürliche Dinge, wie Körpergröße und Körpergewicht, normalverteilt sein. Hierzu wurden die entsprechenden Werte nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk getestet, siehe Tabelle 15. Es zeigt sich, dass für die Allgemeinbevölkerung gültige Gesetze auch in diesem Kollektiv gelten und Körpergröße und Körpergewicht normalverteilt sind. Es muss in diesem Fall  $p > 0,05$  gelten, um ein statistisch signifikantes Ergebnis zu erhalten.

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Körpergröße (cm)	,068	97	,20*	,98	97	,203
Körpergewicht (kg)	,078	97	,16	,98	97	,287
Alter bei OP	,096	101	,02	,97	101	,015

\*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle 15: Tests auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk. Signifikante Ergebnisse beweisen, dass keine Normalverteilung vorliegt. Nicht signifikante Ergebnisse weisen eine Normalverteilung nach, dies gilt nach beiden Tests für Körpergröße und Körpergewicht.

Des Weiteren gibt es allgemein gültige Zusammenhänge, deren Nachweis nun auch im Kollektiv erbracht werden soll. So gibt es Beobachtungen, dass ältere Männer eine größere Prostata und somit auch einen höheren PSA-Wert im Serum haben.

Die Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, Trennmarke war der Median der Altersverteilung bei 66 Jahren. Es zeigt sich, dass in Abhängigkeit vom Alter keine Korrelation mit Körpergröße ( $p = 0,076$ ) und Körpergewicht ( $p = 0,252$ ) nachgewiesen werden konnte. Es konnte aber eine zweiseitig signifikante Korrelation mit dem Prostatavolumen ( $p = 0,009$ ) und mit dem Prostatagewicht ( $p = 0,018$ ) berechnet werden.

Umgekehrt sind auch in Abhängigkeit vom PSA positive Korrelationen mit dem Prostatavolumen ( $p=0,043$ ) und mit dem Prostatagewicht ( $p=0,025$ ) nachweisbar.

### 3.4 Korrelation der experimentellen Daten mittels Student's t-Test für unverbundene Stichproben

Zur Ermittlung möglicher Korrelationen wurden pro Parameter jeweils per Trennwert Gruppen gebildet und bei den gemessenen Daten signifikante Unterschiede gesucht.

#### 3.4.1 Korrelation der experimentellen Daten mit den Patientendaten

##### 3.4.1.1 Experimentelle Ergebnisse in Abhängigkeit vom Alter

Es wurde wiederum die Grenze beim Median von 66 Jahren gesetzt. Die Gruppeneinteilung und Signifikanz des T-Tests sind in Tabelle 16 zu finden, alle Gruppierungen haben mindestens 45 zugeordnete Probanden. Es ergab sich kein statistisch signifikantes Ergebnis.

	Alter bei OP	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
AR-Ratio	≥ 66	56	,99	,51	,07	,41	,685
	< 66	45	,95	,44	,07		
KLK2-Ratio	≥ 66	56	,75	,46	,06	-1,47	,145
	< 66	45	,88	,44	,07		
TMPRSS2-Ratio	≥ 66	56	,74	,64	,09	-1,14	,256
	< 66	45	,89	,67	,10		
SLC2A1-Ratio	≥ 66	56	,54	,23	,03	-1,71	,091
	< 66	45	,63	,31	,05		
SLC16A3-Ratio	≥ 66	56	,56	,36	,05	,13	,897
	< 66	45	,55	,43	,06		
LDHA-Ratio	≥ 66	56	,70	,25	,03	-,26	,797
	< 66	45	,71	,26	,04		

Tabelle 16: Gruppenstatistik der experimentell bestimmten Daten in Abhängigkeit vom Patientenalter.

### 3.4.2 Korrelation der experimentellen Daten mit den klinischen Patientendaten

#### 3.4.2.1 T-Stadium

Bei Gruppenbildung anhand des T-Stadiums wurden die Probanden in die in Tabelle 17 aufgeführten Gruppen eingeteilt.

Es zeigt sich eine in Abhängigkeit vom T-Stadium negative Assoziation mit zweiseitiger Signifikanz für KLK2 ( $p = 0,009$ ) und TMPRSS2 ( $p = 0,011$ ). Für SLC16A3 konnte lediglich eine positive Assoziation einseitiger Signifikanz ( $p = 0,046$ ) nachgewiesen werden.

	T-Stadium	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
AR-Ratio	> T2	51	,99	,45	,06	,34	,737
	< T3	49	,96	,52	,07		
KLK2-Ratio	> T2	51	,69	,37	,05	-2,67	,009
	< T3	49	,93	,50	,07		
TMPRSS2-Ratio	> T2	51	,64	,64	,09	-2,59	,011
	< T3	49	,97	,63	,09		
SLC2A1-Ratio	> T2	51	,58	,31	,04	-,01	,991
	< T3	49	,58	,24	,03		
SLC16A3-Ratio	> T2	51	,62	,43	,06	1,71	,091
	< T3	49	,49	,35	,05		
LDHA-Ratio	> T2	51	,73	,25	,03	,82	,412
	< T3	49	,69	,27	,04		

Tabelle 17: Gruppenstatistik der experimentell bestimmten Daten bei Gruppenbildung anhand des T-Stadiums.

### 3.4.2.2 Nodalstatus

Es wurde auch eine Gruppeneinteilung nach dem Nodalstatus vorgenommen, deren Statistik in Tabelle 18 zu finden ist. Es ergeben sich einige Korrelationen:

Der Nodalstatus ist knapp nicht zweiseitig signifikant negativ mit der AR-Ratio ( $p = 0,052$ ) assoziiert.

Für die KLK2-Ratio ergab sich eine signifikante positive Assoziation mit dem Nodalstatus ( $p = 0,002$ ), die SLC16A3-Ratio ist mit dem Nodalstatus signifikant negativ assoziiert ( $p = 0,048$ ).

	N	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
AR-Ratio	0	81	,93	,46	,05	-1,97	,052
	1	19	1,17	,54	,12		
KLK2-Ratio	0	81	,87	,46	,05	3,19	,002
	1	19	,52	,31	,07		
TMPRSS2-Ratio	0	81	,86	,69	,08	1,75	,083
	1	19	,57	,41	,09		
SLC2A1-Ratio	0	81	,56	,23	,03	-,96	,349
	1	19	,66	,43	,10		
SLC16A3-Ratio	0	81	,52	,39	,04	-2,00	,048
	1	19	,71	,40	,09		
LDHA-Ratio	0	81	,70	,26	,03	-,62	,536
	1	19	,74	,24	,06		

Tabelle 18: Gruppenstatistiken der Einteilung der experimentell bestimmten Daten nach dem Nodalstatus.

### 3.4.2.3 Gleason Summe

Auch für die Auswertung der experimentellen Daten hinsichtlich des zugrunde liegenden kombinierten Gleason-Scores erscheint die Trennung der beiden Gruppen zwischen 7a und 7b am logischsten zu sein. Hierfür ergeben sich keine zweiseitig signifikanten Ergebnisse.

Werden die Grenzen entsprechend dem NCCN erweitert, ergibt sich für eine Grenze zwischen Gleasonsumme 6 und 7a eine signifikante negative Assoziation mit der TMPRSS2-Ratio ( $p=0,035$ ).

Wird die Grenze zwischen die Gleasonsumme von 7b und 8 gelegt, so ergibt sich für diesen Bereich eine signifikante negative Assoziation für die KLK2-Ratio ( $p=0,018$ ).

	Gleason-Summe	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
AR-Ratio	$\geq 7b$	64	1,03	,52	,07	1,54	,127
	$\leq 7a$	35	,87	,39	,07		
KLK2-Ratio	$\geq 7b$	64	,78	,46	,06	-,64	,523
	$\leq 7a$	35	,84	,47	,08		
TMPRSS2-Ratio	$\geq 7b$	64	,80	,65	,08	-,07	,944
	$\leq 7a$	35	,81	,69	,12		
SLC2A1-Ratio	$\geq 7b$	64	,61	,31	,04	1,86	,066
	$\leq 7a$	35	,52	,20	,03		
SLC16A3-Ratio	$\geq 7b$	64	,59	,35	,04	1,02	,309
	$\leq 7a$	35	,50	,47	,08		
LDHA-Ratio	$\geq 7b$	64	,75	,28	,04	1,93	,057
	$\leq 7a$	35	,64	,18	,03		

Tabelle 19: Gebildete Gruppen der experimentell bestimmten Daten nach dem kombinierten Gleason-Score.

### 3.4.2.4 PSA-Wert

Bei Gruppierung der experimentell bestimmten Daten nach dem präoperativ gemessenen PSA-Wert ergeben sich die in Tabelle 20 aufgeführten Gruppen. Hierfür wurde die Grenze bei 10 ng/ml gesetzt, es ergeben sich keine Assoziationen der gemessenen Parameter in Abhängigkeit vom PSA-Wert. Bei Setzen der Grenze für das PSA bei 4 ng/ml ergibt sich für die Assoziation der AR-Ratio ebenfalls kein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,110$ ).

	PSA präop. (ng/ml)	N	Mittelwert	Std.-Abwei- chung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
AR-Ratio	≥ 10,00	37	1,08	,51	,08	1,58	,119
	< 10,00	59	,93	,47	,06		
KLK2-Ratio	≥ 10,00	37	,81	,49	,08	-,08	,934
	< 10,00	59	,82	,44	,06		
TMPRSS2-Ratio	≥ 10,00	37	,84	,65	,11	,25	,803
	< 10,00	59	,81	,68	,09		
SLC2A1-Ratio	≥ 10,00	37	,62	,32	,05	,97	,337
	< 10,00	59	,56	,25	,03		
SLC16A3-Ratio	≥ 10,00	37	,57	,35	,06	,13	,897
	< 10,00	59	,55	,43	,06		
LDHA-Ratio	≥ 10,00	37	,70	,26	,04	-,26	,799
	< 10,00	59	,72	,26	,03		

Tabelle 20: Gruppenstatistik der experimentell bestimmten Daten bei Gruppierung durch den präoperativ ermittelten PSA-Wert.

Aus der TCGA-Datenbank wurden Daten von 499 Patienten heruntergeladen und in SPSS importiert. Enthalten war allerdings nur die Stärke der Ausprägung der untersuchten Gene, zu den klinischen Daten oder weiteren Tumoruntersuchungen waren in diesem Datensatz keine Daten vorhanden. Ein Patientenfall war leer, sodass in die statistische Auswertung die Daten von 498 Patienten eingegangen sind.

### 3.5 Korrelation der experimentellen Ergebnisse von AR und seinen Down-Stream-Parametern und Vergleich mit der TCGA-Datenbank

#### 3.5.1 Deskriptive Statistik der TCGA-Daten

In den folgenden Kapiteln werden Informationen zur Verteilung der Messwerte aus der TCGA-Datenbank gegeben. Die Tabelle 21 zeigt die Verteilung tabellarisch. Diese zeigt, dass für alle untersuchten Gene Daten für jeden Patienten vorhanden sind.

		HPRT1	UHL5	AR	KLK2	TMPRSS2	SLC2A1	SLC16A3	LDHA
N	Gültig	498	498	498	498	498	498	498	498
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		530,87	432,96	636,57	139565,94	31802,94	1146,19	253,14	6898,39
Median		487,06	422,06	506,78	132525,15	29400,74	1109,18	197,70	6239,61
Std.-Abweichung		186,18	151,06	566,83	65225,84	17273,33	340,90	187,76	3585,69
Minimum		188,59	67,87	13,55	453,14	9,18	343,21	20,09	1950,75
Maximum		2044,60	1233,03	4759,26	436561,28	105150,44	2879,52	1586,78	51978,37
Perzentile	25	414,25	333,03	234,19	97449,85	20301,82	913,43	129,78	4955,75
	75	598,86	524,67	866,87	174335,33	41559,55	1343,89	320,71	7799,75

Tabelle 21: Deskriptive Statistik zu den Daten aus der TCGA-Datenbank.

Es gab keine fehlenden Fälle, sodass für alle Gene insgesamt jeweils 498 Fälle ausgewertet werden konnten.

Für **HPRT1** wurden Werte zwischen 188,59 (Minimum) und 2044,60 (Maximum) ermittelt. Der Mittelwert lag bei 530,87, die Standardabweichung bei 186,18. Die 25. Perzentile lag bei 414,25, der Median bei 487,06 und die 75. Perzentile lag bei 598,86.

Bei **UHL5** lagen die Werte zwischen 67,87 (Minimum) und 1233,03 (Maximum). Der Mittelwert lag bei 432,96 mit einer Standardabweichung von 151,06. Der Median lag bei 422,06. Die untere Quartile lag bei 333,03, die obere Quartile lag bei 524,67.

Für das **AR**-Gen lag das Minimum bei 13,55, das Maximum lag bei 4759,26. Der Mittelwert lag bei 636,57, die Standardabweichung bei 566,83. Der Median lag bei 506,78. Die untere Quartile lag bei 234,19, die obere Quartile bei 866,87.

Bei **KLK2** war das Minimum bei 453,14 und das Maximum bei 436561,28. Der Mittelwert lag bei 139565,94, die Standardabweichung bei 65225,84. Die 25. Perzentile lag bei 97449,85, der Median bei 132525,15, die 75. Perzentile lag bei 174335,33.

Für **TMPRSS2** lagen die Werte zwischen minimal 9,18 und maximal 105150,44. Der Mittelwert lag bei 31802,94 und die Standardabweichung bei 17273,33. Der Median lag bei 29400,74, die untere Quartile bei 20301,82 und die obere Quartile bei 41559,55.

Bei **SLC2A1** lag der Mittelwert bei 1146,19, die Standardabweichung bei 340,90. Das Minimum lag bei 343,21, das Maximum bei 2879,52. Die 25. Perzentile lag bei 913,43, die 50. Perzentile lag bei 1109,18, die 75. Perzentile lag bei 1343,89.

Für **SLC16A3** wurden Werte zwischen minimal 20,09 und maximal 1586,78 ermittelt. Der Mittelwert lag bei 253,14, die Standardabweichung bei 187,76. Die untere Quartile lag bei 129,78, der Median bei 197,70 und die obere Quartile bei 320,71.

Für das Gen **LDHA** lagen die Werte zwischen 1950,75 (Minimum) und 51978,37 (Maximum). Der Mittelwert lag bei 6898,39, die Standardabweichung bei 3585,69. Der Median lag bei 6239,61. Die 25. Perzentile lag bei 4955,75, die 75. Perzentile lag bei 7799,75.

### 3.5.2 Korrelationen der eigen-experimentellen Ergebnisse in Abhängigkeit von AR

Die nötige Gruppeneinteilung der experimentellen Daten nach der AR-Ratio erfolgte mit dem Median als Trennmarke. Die Gruppenstatistik ist in Tabelle 22 aufgeführt. Beide Gruppen enthalten so viele Studienteilnehmer, dass die Testung auf Normalverteilung entfällt. Es zeigen sich keine zweiseitig signifikanten Ergebnisse.

	AR-Ratio	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
KLK2-Ratio	≥ ,91	51	,88	,51	,07	1,49	,139
	< ,91	51	,75	,39	,05		
TMPRSS2-Ratio	≥ ,91	51	,92	,81	,11	1,79	,077
	< ,91	51	,69	,43	,06		
SLC2A1-Ratio	≥ ,91	51	,63	,32	,05	1,91	,060
	< ,91	51	,53	,21	,03		
SLC16A3-Ratio	≥ ,91	51	,62	,44	,06	1,81	,073
	< ,91	51	,48	,33	,05		
LDHA-Ratio	≥ ,91	51	,67	,27	,04	-1,16	,248
	< ,91	51	,73	,24	,03		

Tabelle 22: Gruppenstatistik bei Einteilung der experimentellen Daten anhand der AR-Ratio.

### 3.5.3 Korrelationen der TCGA-Daten in Abhängigkeit von AR

Laut statistischem Grenzwertsatz kann der t-Test mehr oder weniger von der Normalverteilung unabhängig auch bei ausreichend hoher Fallzahl angewendet werden. Diese Zahl ist mit ca. 30 Fällen definiert. Bei annähernd 500 Probanden ist diese Mindestanforderung bei jeder Gruppe weit überschritten und der Test anwendbar.

Es wird nun für die möglichen Downstream-Parameter jeweils eine mögliche Korrelation mittels t-Testung in Abhängigkeit von AR untersucht.

Für AR erfolgte der t-Test einmal mit Aufteilung nach dem Median und einmal mit Aufteilung nach dem Mittelwert. Dadurch fallen etwaige grobe Ausreißer weniger ins Gewicht, es bleibt aber auch der Gesamteindruck des Kollektivs erhalten.

Die Tabelle 23 zeigt die Gruppenzusammensetzung der TCGA-Daten bei Aufteilung nach dem Median. Erwartungsgemäß sind beide Gruppen gleich groß. Hier zeigt sich eine positive Korrelation der Gene TMPRSS2 ( $p < 0,001$ ) und SLC2A1 ( $p < 0,001$ ) mit dem AR. Negativ korrelieren statistisch signifikant KLK2 ( $p < 0,001$ ) und SLC16A3 ( $p < 0,001$ ).

Darunter ist in Tabelle 24 die Gruppenaufteilung für AR nach dem Mittelwert zu finden. Es sind jeweils 187 bzw. 311 Probanden in die Gruppen eingeteilt worden. Darin zeigt sich ebenfalls eine positive Korrelation mit statistischer Signifikanz für die Gene TMPRSS2 ( $p < 0,001$ ) und SLC2A1 ( $p < 0,001$ ). Eine negative Korrelierung konnte für die Gene KLK2 ( $p < 0,001$ ), SLC16A3 ( $p < 0,001$ ) und zusätzlich für LDHA ( $p = 0,044$ ) nachgewiesen werden.

Insgesamt lässt sich bei Beachtung dieser beiden Korrelationsanalysen für die Aufteilung der Daten nach dem AR-Wert schließen, dass eine signifikante positive Korrelierung mit TMPRSS2 ( $p < 0,001$ ) und SLC2A1 ( $p < 0,001$ ) vorliegt. Ebenfalls ist eine negative Korrelation mit KLK2 ( $p < 0,001$ ) und SLC16A3 ( $p < 0,001$ ) nachgewiesen worden, die negative Korrelation mit LDHA ist für die Aufteilung nach dem Mittelwert zweiseitig signifikant ( $p = 0,044$ ), bei Aufteilung nach dem Median nur einseitig signifikant ( $p = 0,042$ ).

## Ergebnisse

	AR	N	Mittelwert	Std.-Abwei- chung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
KLK2	≥ 506,78	249	128562,66	51491,08	3263,11	-3,82	<0,001
	< 506,78	249	150569,23	75043,48	4755,69		
TMPRSS2	≥ 506,78	249	34639,13	18774,76	1189,80	3,71	<0,001
	< 506,78	249	28966,76	15142,49	959,62		
SLC2A1	≥ 506,78	249	1232,47	339,05	21,49	5,83	<0,001
	< 506,78	249	1059,90	320,93	20,34		
SLC16A3	≥ 506,78	249	213,49	156,	9,89	-4,82	<0,001
	< 506,78	249	292,79	207,75	13,17		
LDHA	≥ 506,78	249	6619,70	3185,42	201,87	-1,74	0,083
	< 506,78	249	7177,07	3932,35	249,20		

Tabelle 23: Gruppenstatistiken der TCGA-Daten von AR bei Aufteilung nach dem Median

	AR	N	Mittelwert	Std.-Abwei- chung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
KLK2	≥ 636,57	187	127478,58	50821,70	3716,45	-3,52	<0,001
	< 636,57	311	146833,90	71623,64	4061,40		
TMPRSS2	≥ 636,67	187	35565,56	18860,14	1379,19	3,66	<0,001
	< 636,57	311	29540,54	15850,98	898,83		
SLC2A1	≥ 636,57	187	1253,23	346,96	25,37	5,49	<0,001
	< 636,57	311	1081,83	320,97	18,20		
SLC16A3	≥ 636,57	187	206,39	159,80	11,69	-4,62	<0,001
	< 636,57	311	281,25	197,71	11,21		
LDHA	≥ 636,57	187	6480,60	2812,24	205,65	-2,02	0,044
	< 636,57	311	7149,60	3962,22	224,68		

Tabelle 24: Gruppenstatistiken der TCGA-Daten für AR bei Aufteilung nach dem Mittelwert.

### 3.5.4 Graphische Gegenüberstellung der Korrelationen in Abhängigkeit von AR

#### 3.5.4.1 KLK2

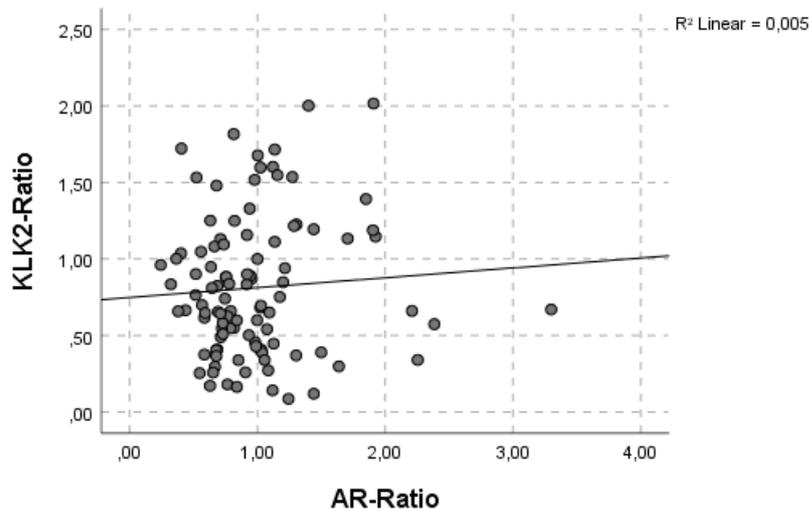


Abbildung 10: Streudiagramm der eigenexperimentellen Ergebnisse von AR mit KLK2 ( $p = 0,139$ ). Die Ausgleichsgerade hat die Gleichung  $y=0,75+0,06*x$ .

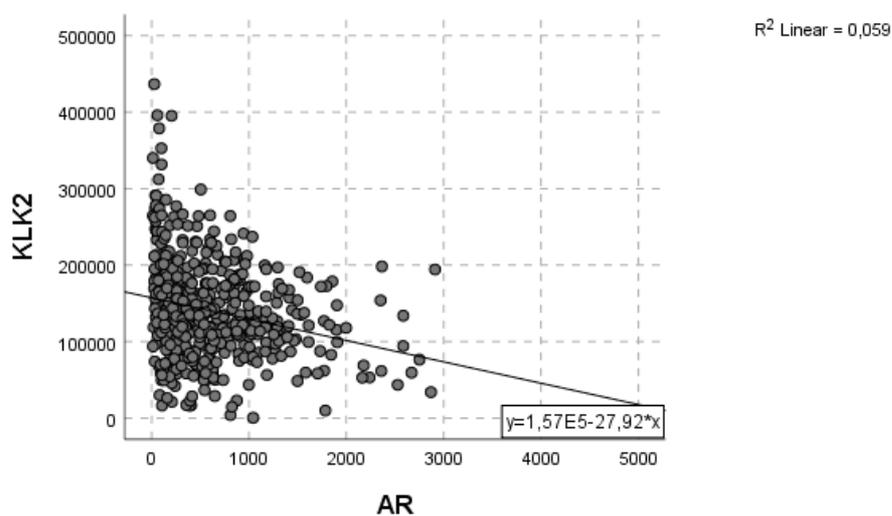


Abbildung 11: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit KLK2. Man erkennt eine statistisch signifikante negative Korrelation ( $p < 0,001$ ).

Man erkennt in den eigenexperimentellen Ergebnissen eine Ausgleichsgerade mit positiver Steigung, während die TCGA-Daten eine negative Steigung erkennen lassen.

### 3.5.4.2 TMPRSS2

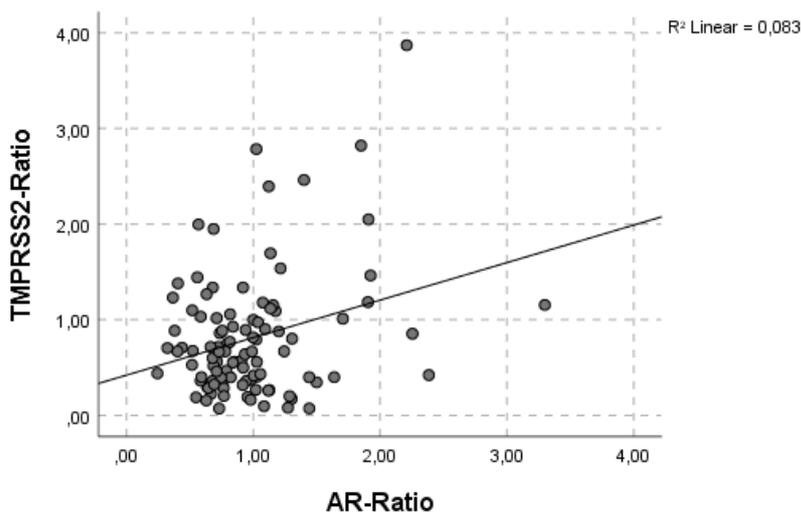


Abbildung 12: Streudiagramm der eigenen Daten von AR und TMPRSS2 ( $p = 0,077$ ). Die Ausgleichsgerade hat die Gleichung  $y=0,42+0,39*x$ .

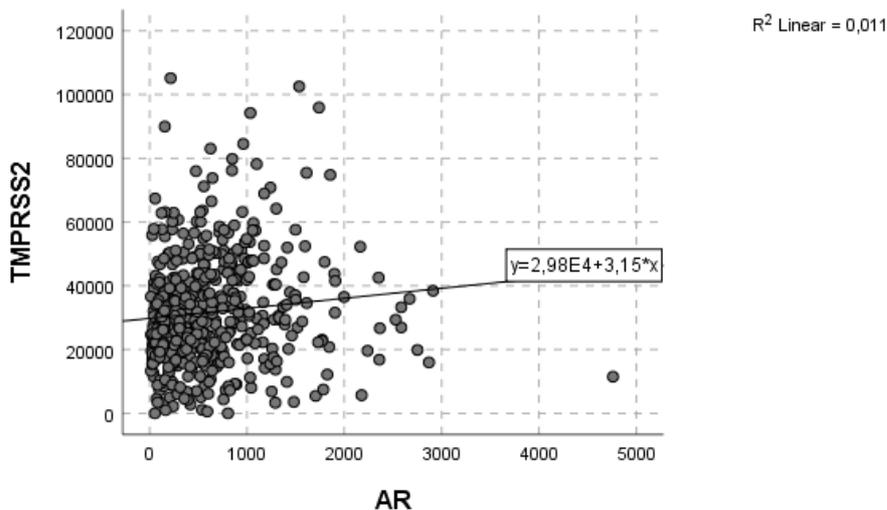


Abbildung 13: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit TMPRSS2. Man erkennt eine positive Korrelation, die statistisch signifikant ist ( $p < 0,001$ ).

Es zeigt sich sowohl für die eigenexperimentellen als auch für die TCGA-Daten eine positive Ausgleichsgerade. Für die eigenexperimentellen Daten konnte keine zweiseitige Signifikanz berechnet werden, die TCGA-Ergebnisse sind als hochsignifikant anzusehen.

### 3.5.4.3 SLC2A1

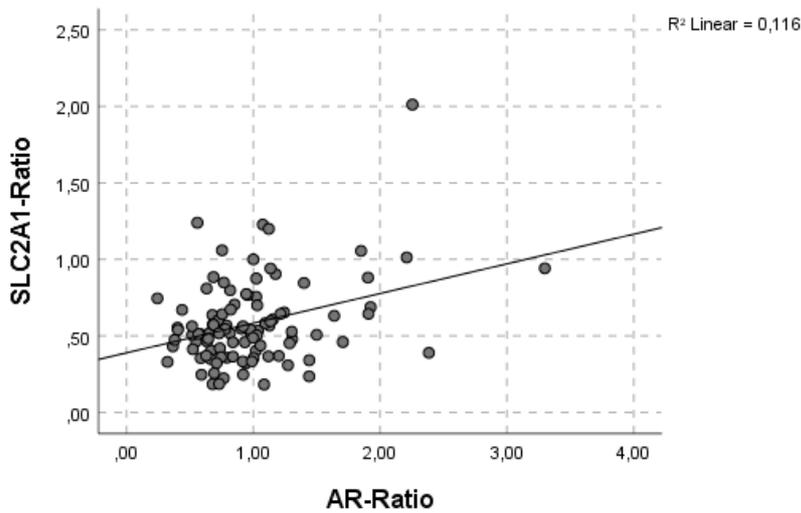


Abbildung 14: Streudiagramm der eigenen Daten von AR mit SLC2A1 ( $p = 0,060$ ). Die Ausgleichsgerade hat die Gleichung  $y = 0,39 + 0,19 \cdot x$ .

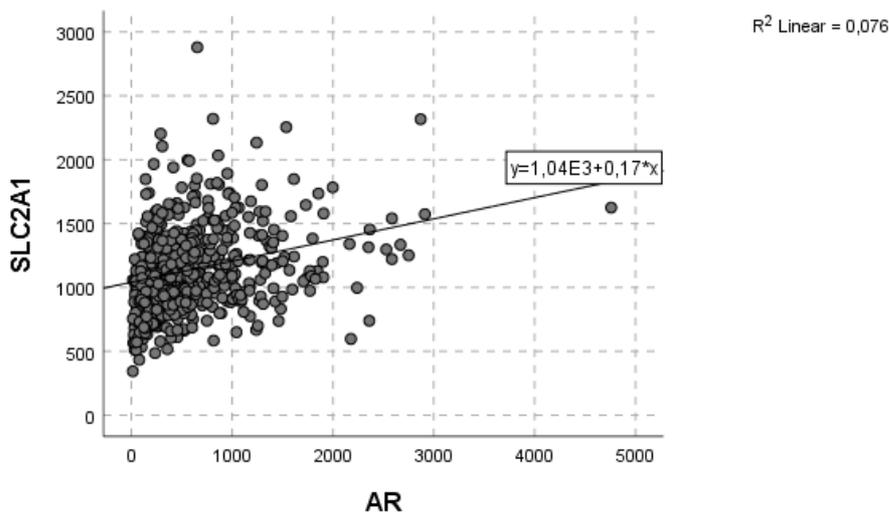


Abbildung 15: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit SLC2A1. Man erkennt eine statistisch signifikante positive Korrelation ( $p < 0,001$ ).

Zu erkennen ist in beiden Diagrammen eine positive Steigung der Ausgleichsgeraden. Es wurde für die eigenen Daten keine signifikante Korrelation herausgefunden. Die positive Korrelation der Daten aus der TCGA-Datenbank ist signifikant.

### 3.5.4.4 SLC16A3

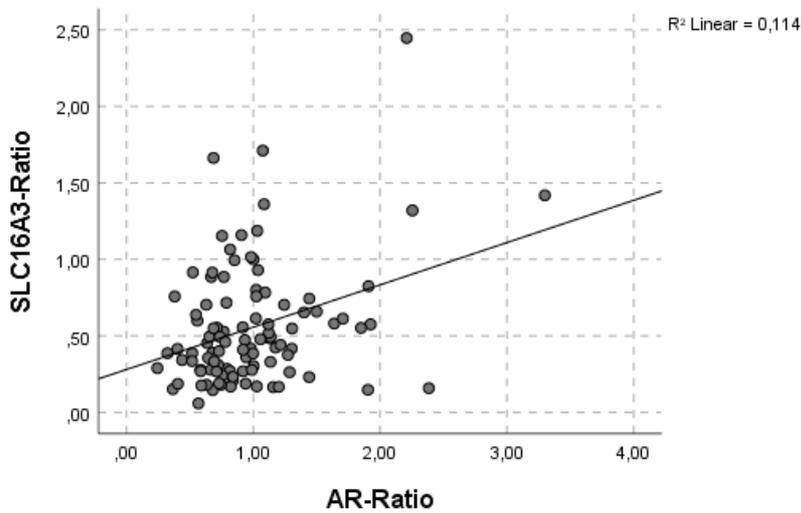


Abbildung 16: Korrelation der eigenen Daten von AR mit SLC16A3 ( $p = 0,073$ ). Die Ausgleichsgerade hat die Gleichung  $y=0,28+0,28*x$ .

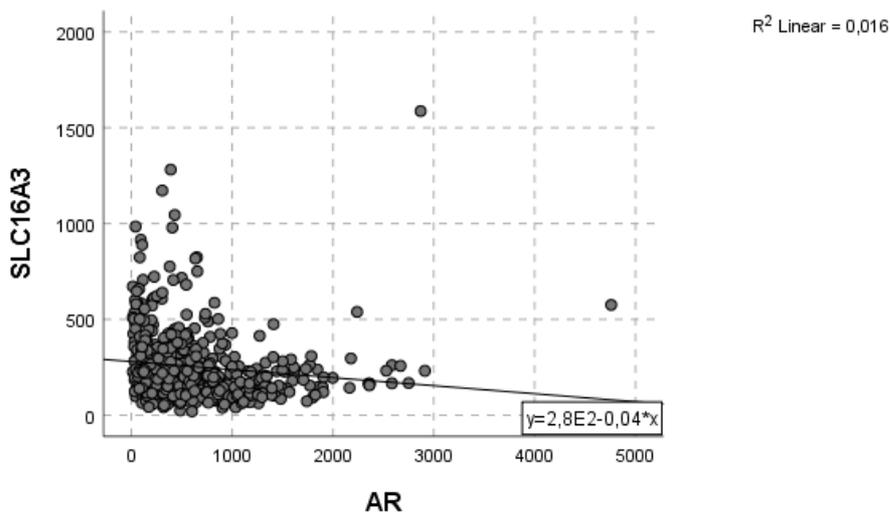


Abbildung 17: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit SLC16A3. Man erkennt eine statistisch signifikante negative Korrelation ( $p < 0,001$ ).

Zu erkennen ist bei den eigenen Daten eine positive Steigung der Ausgleichsgerade ohne zweiseitig signifikante Korrelation, in den TCGA-Daten hat die Ausgleichsgerade eine negative Steigung. Die Verteilung der eigenen Daten ähnelt eher einer Punktwolke.

### 3.5.4.5 LDHA

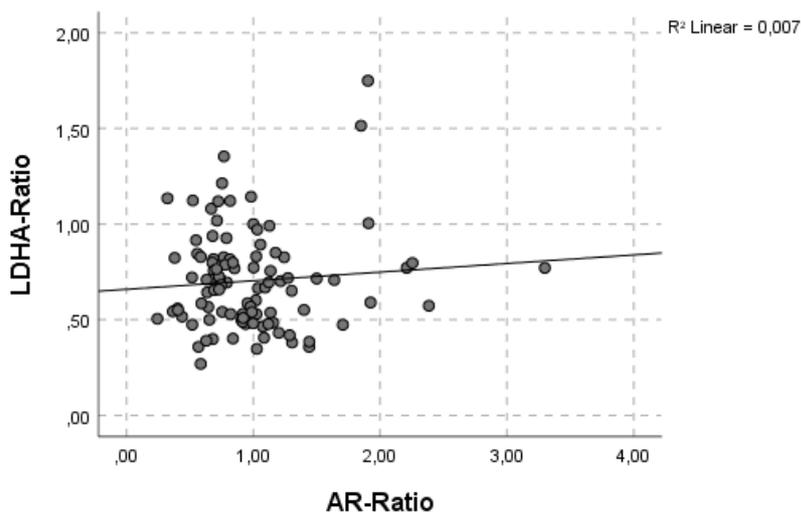


Abbildung 18: Streudiagramm der eigenen Daten von AR mit LDHA, für die keine Signifikanz berechnet wurde ( $p = 0,248$ ). Die Ausgleichsgerade hat die Gleichung  $y = 0,66 + 0,04 * x$ .

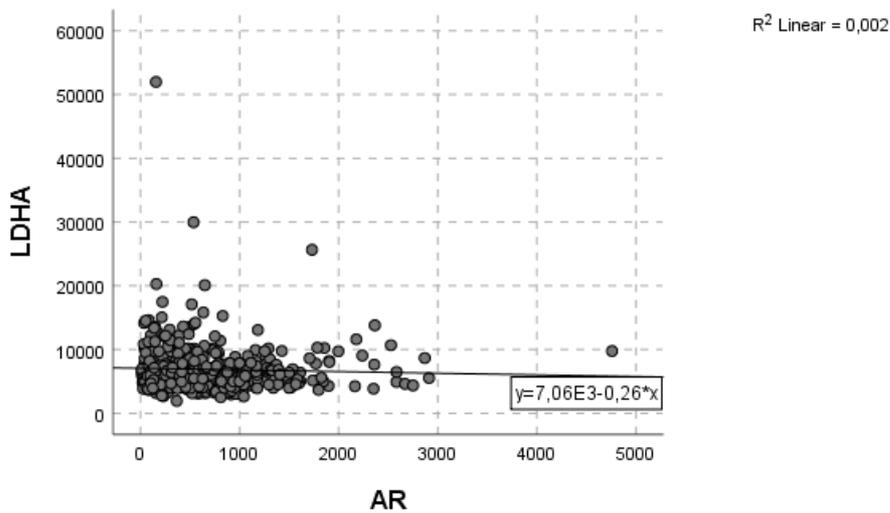


Abbildung 19: Streudiagramm der TCGA-Daten von AR mit LDHA. Man erkennt eine negative Steigung der Ausgleichsgeraden, die Korrelation ist je nach Einteilung der Werte signifikant bzw. nicht signifikant ( $p = 0,044$  bzw.  $p = 0,083$ ).

## 3.6 Korrelation der Downstream-Parameter untereinander und Vergleich der eigenen Daten mit den TCGA-Daten

### 3.6.1 Korrelationen der Daten in Abhängigkeit von KLK2

#### 3.6.1.1 Eigene Daten

Die Gruppeneinteilung mit p-Werten sind in der Tabelle 25 dargestellt. Als Trennmarke wurde auch hier der Median gewählt. Beide Gruppen enthalten 51 Mitglieder, sodass keine Testung auf Normalverteilung nötig ist. Es konnte eine zweiseitig signifikante positive Korrelation der KLK2-Ratio mit der TMPRSS2 Ratio nachgewiesen werden ( $p = 0,001$ ). Eine negative Korrelation konnte zweiseitig signifikant für die SLC16A3-Ratio nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Je mehr KLK2, desto mehr TMPRSS2 und desto weniger SLC16A3 war in der Probe enthalten.

	KLK2-Ratio	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
TMPRSS2-Ratio	$\geq ,70$	51	1,01	,68	,10	3,38	,001
	$< ,70$	51	,60	,55	,08		
SLC2A1-Ratio	$\geq ,70$	51	,61	,24	,03	1,05	,295
	$< ,70$	51	,55	,30	,04		
SLC16A3-Ratio	$\geq ,70$	51	,41	,23	,03	-3,89	<0,001
	$< ,70$	51	,69	,47	,07		
LDHA-Ratio	$\geq ,70$	51	,68	,28	,04	-,86	,392
	$< ,70$	51	,73	,23	,03		

Tabelle 25: Gruppenstatistiken bei Einteilung der experimentellen Daten anhand der KLK2-Ratio.

### 3.6.1.2 TCGA-Daten

Auch mit den TCGA-Daten erfolgte der t-Test in Abhängigkeit von KLK2. Die Daten wurden nach dem Median aufgeteilt, um etwaige Ausreißer nicht zu stark zu gewichten.

Die Tabelle 26 zeigt die Gruppenstatistiken bei Aufteilung nach dem Median. Es entstanden zwei gleich große Gruppen mit je 249 Proben pro Gen und Gruppe. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante positive Korrelation für TMPRSS2 ( $p < 0,001$ ). Eine negative Korrelation mit statistischer Signifikanz konnte für die Energiestoffwechselfogene SLC16A3 ( $p < 0,001$ ) und LDHA ( $p = 0,006$ ) nachgewiesen werden.

	KLK2	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
TMPRSS2	$\geq 132525,15$	249	37923,38	17477,58	1107,60	8,45	0,000
	$< 132525,15$	249	25682,51	14739,47	934,08		
SLC2A1	$\geq 132525,15$	249	1142,09	305,49	19,36	-0,27	0,789
	$< 132525,15$	249	1150,28	373,55	23,67		
SLC16A3	$\geq 132525,15$	249	199,84	134,43	8,52	-6,60	0,000
	$< 132525,15$	249	306,44	216,51	13,72		
LDHA	$\geq 132525,15$	249	6461,31	3799,51	240,78	-2,74	0,006
	$< 132525,15$	249	7335,46	3308,52	209,67		

Tabelle 26: Gruppenstatistiken für die TCGA-Daten von KLK2

### 3.6.1.3 Graphische Gegenüberstellung

#### KLK2 x TMPRSS2

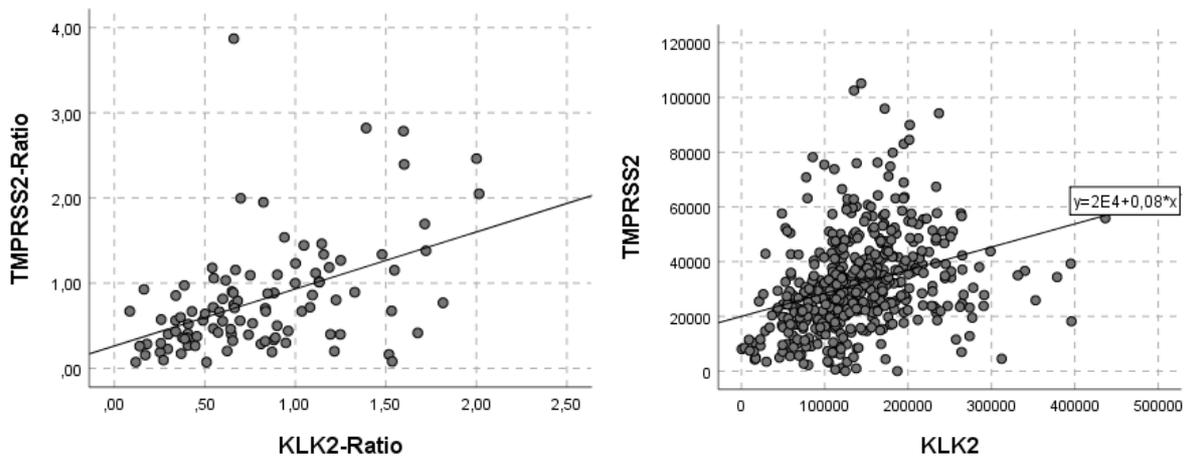


Abbildung 20: (links) Streudiagramm der eigenen Daten der KLK2-Ratio mit der TMPRSS2-Ratio ( $p = 0,001$ ). Die zugehörige Geradengleichung lautet  $y=0,26+0,67*x$ .

Abbildung 21: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von KLK2 mit TMPRSS2. Es zeigt sich eine statistisch signifikante positive Korrelation ( $p < 0,001$ ).

Es zeigt sich eine konkordante positive Ausgleichsgerade. Die Korrelation ist in beiden Fällen statistisch signifikant.

### KLK2 x SLC2A1

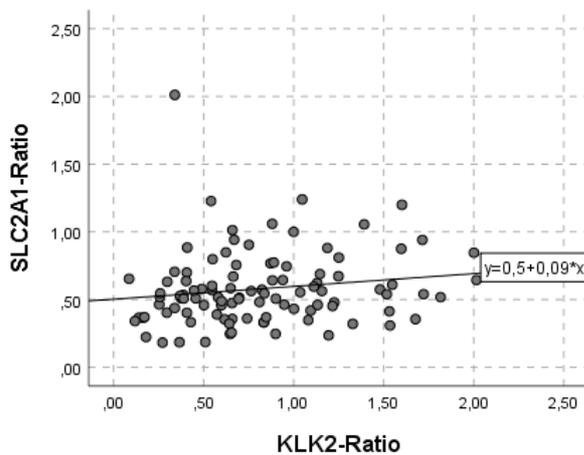


Abbildung 22: (links) Streudiagramm der eigenen Daten der KLK2-Ratio mit der SLC2A1-Ratio ( $p = 0,295$ ).

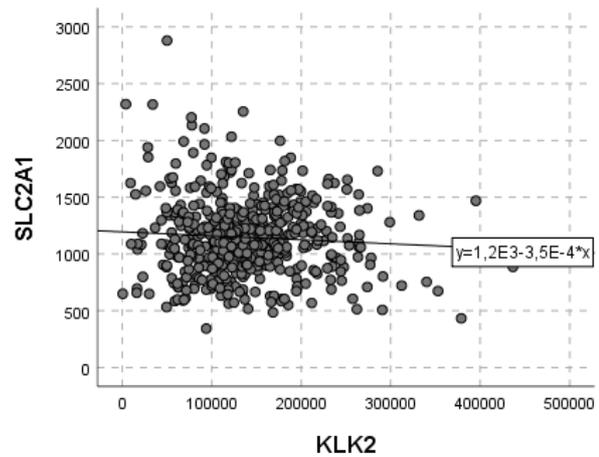


Abbildung 23: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von KLK2 mit SLC2A1. In der Punktwolke zeigt sich keine nachweisbare Korrelation ( $p = 0,83$ ).

Für keine der Punktwolken ließ sich eine Korrelation nachweisen.

### KLK2 x SLC16A3

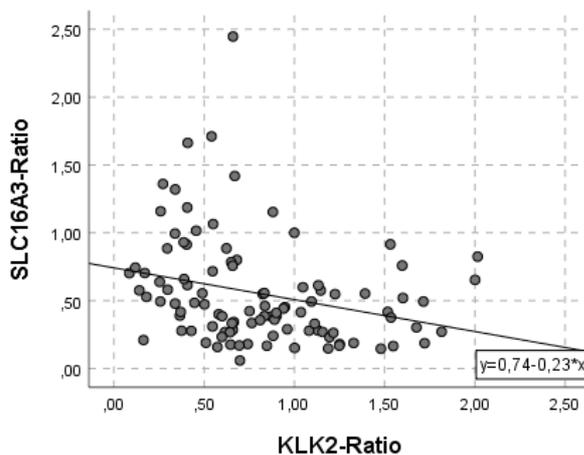


Abbildung 24: (links) Streudiagramm der eigenen Daten der KLK2-Ratio mit der SLC16A3-Ratio ( $p < 0,001$ ).

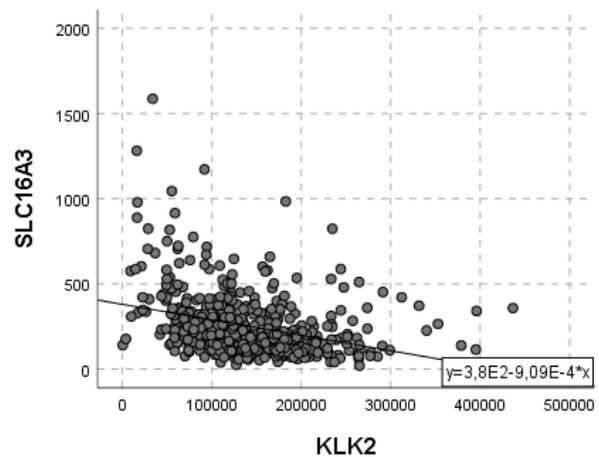


Abbildung 25: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von KLK2 mit SCL2A1. Es zeigt sich eine statistisch signifikante negative Korrelation ( $p < 0,001$ ).

Die negative Ausgleichsgerade ist konkordant, die Korrelation ist in beiden Fällen signifikant.

**KLK2 x LDHA**

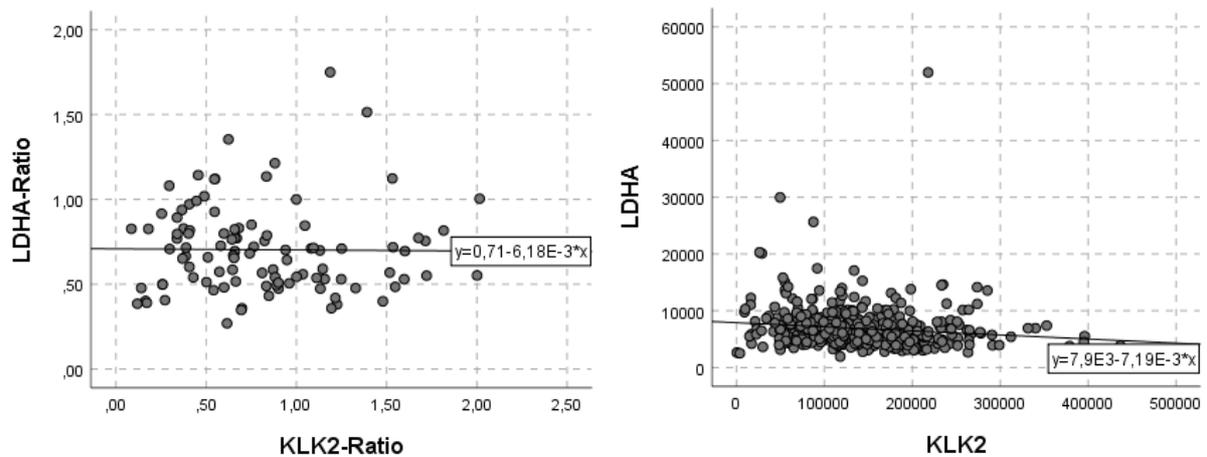


Abbildung 26: (links) Streudiagramm der eigenen Daten der KLK2-Ratio mit der LDHA-Ratio ( $p = 0,392$ ).

Abbildung 27: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von KLK2 mit LDHA. Es zeigt sich eine statistisch signifikante negative Korrelation ( $p = 0,006$  bzw.  $p = 0,009$ ).

In Abhängigkeit von der KLK2-Ratio ließ sich eigenexperimentell keine signifikante Korrelation herleiten. Die TCGA-Ergebnisse deuten auf eine negative Korrelation hin.

### 3.6.2 Korrelationen der Daten in Abhängigkeit von TMPRSS2

#### 3.6.2.1 Eigene Daten

Es erfolgte die Analyse der experimentell ermittelten Daten mit Gruppenbildung anhand der TMPRSS2-Ratio. Als Trennmarke wurde der Median gewählt. Dementsprechend enthalten beide Gruppen 51 Teilnehmer, wodurch die Testung auf Normalverteilung entfällt. Es zeigte sich für die TMPRSS2-Ratio eine positive Korrelation mit zweiseitiger Signifikanz für die SLC2A1-Ratio ( $p < 0,001$ ). Je mehr TMPRSS2 enthalten war, desto mehr SLC2A1 war in der Probe enthalten.

	TMPRSS2- Ratio	N	Mittelwert	Std.-Abwei- chung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
SLC2A1-Ratio	≥ ,67	51	,68	,31	,04	3,81	<0,001
	< ,67	51	,48	,19	,03		
SLC16A3-Ratio	≥ ,67	51	,56	,44	,06	,15	0,885
	< ,67	51	,55	,34	,05		
LDHA-Ratio	≥ ,67	51	,71	,28	,04	,25	0,800
	< ,67	51	,70	,23	,03		

Tabelle 27: Gruppenstatistik der experimentellen Daten bei Einteilung nach der TMPRSS2-Ratio

#### 3.6.2.2 TCGA-Daten

Auch für TMPRSS2 erfolgte der t-Test mit Trennmarke Median. Die Tabelle 28 zeigt die Gruppenstatistik. Es ergaben sich zwei gleich große Gruppen mit je 249 Probanden pro Gruppe und Gen.

Für das TMPRSS2-Gen wurden im t-Test positive Korrelationen mit KLK2 ( $p < 0,001$ ) und SLC2A1 ( $p < 0,001$ ) nachgewiesen. Eine negative Korrelation wurde für SLC16A3 ( $p < 0,001$ ) und LDHA ( $p < 0,001$ ) berechnet. Die Ergebnisse sind als Streudiagramme in Abbildung 29, Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 33 aufgeführt.

## Ergebnisse

	TMPRSS2	N	Mittelwert	Std.-Abwei- chung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
SLC2A1	≥ 29400,74	249	1231,21	317,53	20,12	5,74	<0,001
	< 29400,74	249	1061,17	342,87	21,73		
SLC16A3	≥ 29400,74	249	205,71	134,26	8,51	-5,82	<0,001
	< 29400,74	249	300,57	219,34	13,90		
LDHA	≥ 29400,74	249	6236,55	3743,49	237,23	-4,19	<0,001
	< 29400,74	249	7560,23	3297,41	208,97		

Tabelle 28: Gruppenstatistiken für die TCGA-Daten von TMPRSS2.

### 3.6.2.3 Graphische Gegenüberstellung

#### TMPRSS2 x SLC2A1

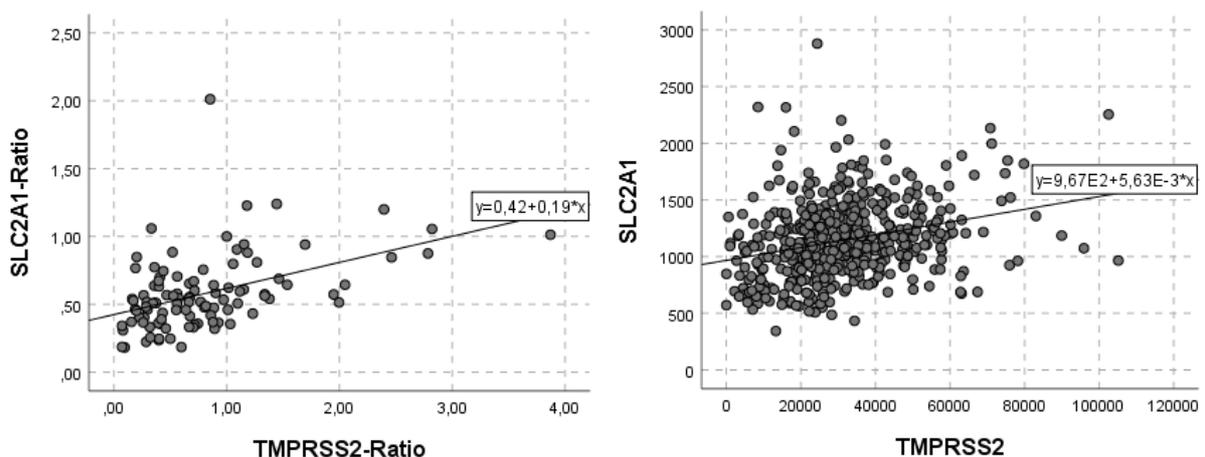


Abbildung 28: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von TMPRSS2 mit SLC2A1 mit positiver Steigung der Ausgleichsgeraden ( $p < 0,001$ ).

Abbildung 29: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von TMPRSS2 mit SLC2A1. Es zeigt sich eine statistisch signifikante positive Korrelation ( $p < 0,001$ ).

Es zeigt sich eine statistisch signifikante positive Korrelation der eigenen Daten, die in den TCGA-Daten bestätigt wird.

**TMPRSS2 x SLC16A3**

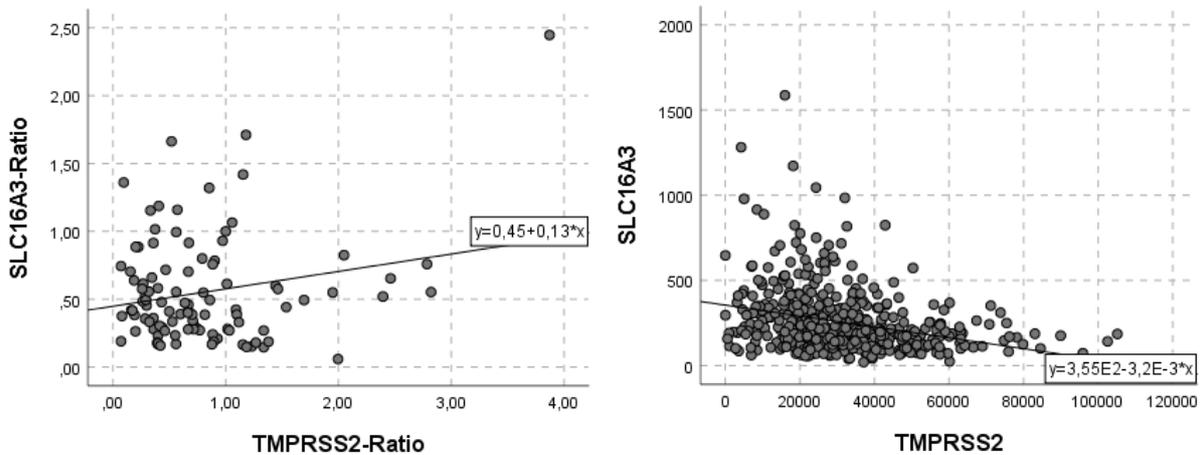


Abbildung 30: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von TMPRSS2 mit SLC16A3 ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,885$ ).

Abbildung 31: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von TMPRSS2 mit SLC16A3. Es zeigt sich eine statistisch signifikante negative Korrelation ( $p < 0,001$ ).

**TMPRSS2 x LDHA**

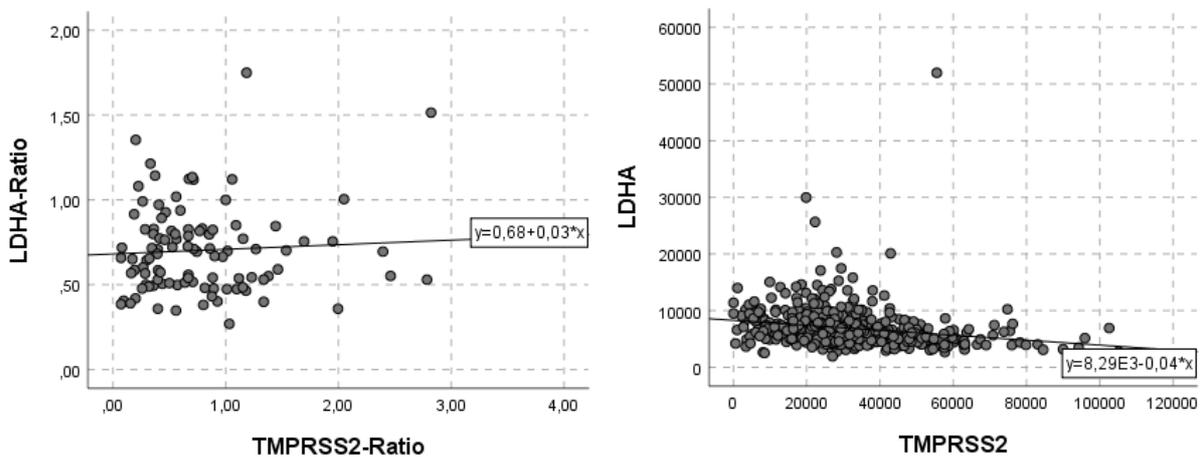


Abbildung 32: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von TMPRSS2 mit LDHA ohne Signifikanz ( $p = 0,800$ ).

Abbildung 33: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von TMPRSS2 mit LDHA. Es zeigt sich eine statistisch signifikante negative Korrelation ( $p < 0,001$ ).

### 3.6.3 Korrelationen der Daten in Abhängigkeit von SLC2A1

#### 3.6.3.1 Eigene Daten

Es erfolgte die Gruppenbildung anhand der SLC2A1-Ratio, als Trennmarke wurde der Median verwendet. Dadurch ergaben sich zwei Gruppen mit je 51 Teilnehmern, die nicht auf Normalverteilung getestet werden müssen. Die genaue Gruppenstatistik ist in Tabelle 29 aufgeführt. Es ergab sich eine zweiseitig signifikante positive Korrelation für die SLC2A1-Ratio mit der SLC16A3-Ratio ( $p = 0,002$ ) und für die LDHA-Ratio ( $p = 0,006$ ). Je mehr SLC2A1, desto mehr SLC16A3 und desto mehr LDHA war in der Probe enthalten.

	SLC2A1-Ratio	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
SLC16A3-Ratio	$\geq ,53$	51	,67	,46	,07	3,26	0,002
	$< ,53$	51	,43	,25	,04		
LDHA-Ratio	$\geq ,53$	51	,77	,27	,04	2,78	0,006
	$< ,53$	51	,63	,22	,03		

Tabelle 29: Gruppenstatistik bei Einteilung der experimentellen Daten anhand der SLC2A1-Ratio.

#### 3.6.3.2 TCGA-Daten

Für SLC2A1 erfolgte ebenfalls die t-Testung mit Trennmarke Median. Die Tabelle 30 zeigt die Gruppenstatistiken. Es wurden zwei gleich große Gruppen pro Gen gebildet, die je 249 Proben enthalten.

Es waren keine neuen zweiseitig signifikanten Korrelationen nachzuweisen, es zeigte sich lediglich eine einseitig signifikante negative Korrelation mit SLC16A3 ( $p = 0,039$ ).

	SLC2A1	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
SLC16A3	$\geq 1109,18$	249	238,27	178,40	11,31	-1,77	0,077
	$< 1109,18$	249	268,00	195,91	12,42		
LDHA	$\geq 1109,18$	249	6967,66	4234,92	268,38	0,43	0,667
	$< 1109,18$	249	6829,12	2796,79	177,24		

Tabelle 30: Gruppenstatistiken für die TCGA-Daten von SLC2A1

### 3.6.3.3 Graphische Gegenüberstellung

#### SLC2A1 x SLC16A3

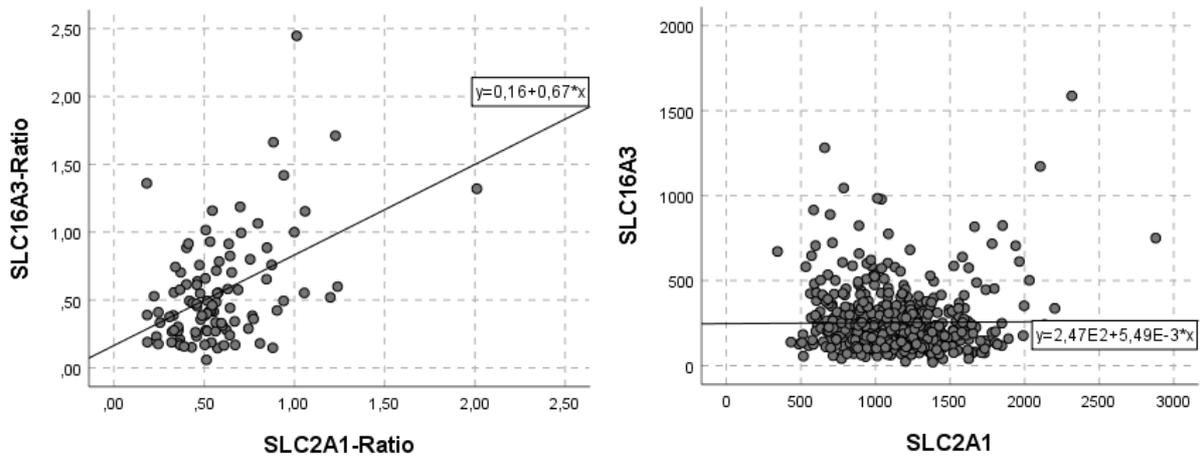


Abbildung 34: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von SLC2A1 mit SLC16A3 ( $p = 0,002$ ). Es ergibt sich eine Ausgleichsgerade mit positiver Steigung.

Abbildung 35: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von SLC2A1 mit SLC16A3. In der Punktwolke zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation ( $p = 0,077$ ), wobei die Ausgleichsgerade eine ebenfalls positive Steigung aufweist.

#### SLC2A1 x LDHA

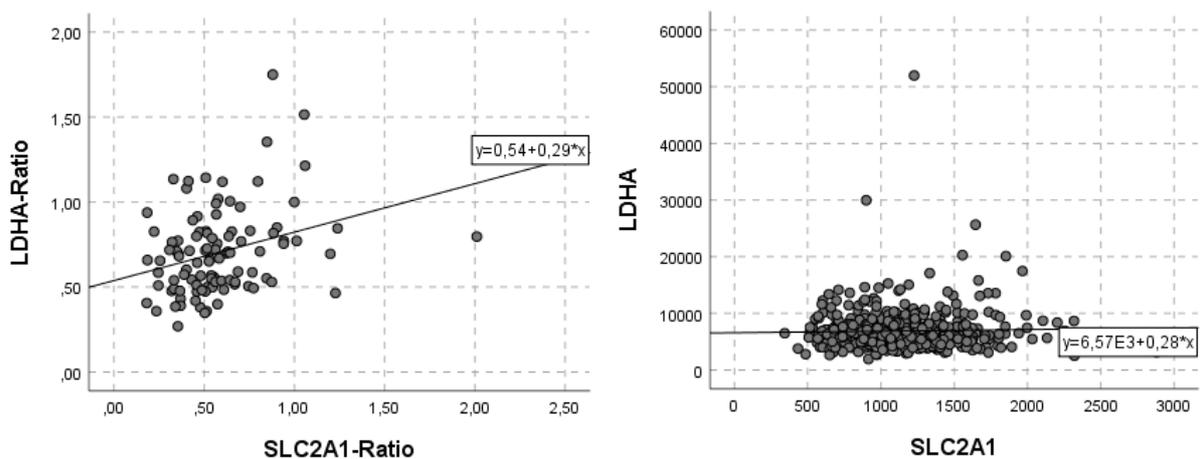


Abbildung 36: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von SLC2A1 mit LDHA ( $p = 0,006$ ).

Abbildung 37: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von SLC2A1 mit LDHA. In der Punktwolke zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation ( $p = 0,667$ ).

### 3.6.4 Korrelationen der Daten in Abhängigkeit von SLC16A3

#### 3.6.4.1 Eigene Daten

Es erfolgte die Gruppeneinteilung zur Korrelation der experimentellen Ergebnisse anhand der SLC16A3-Ratio. Als Trennmarke wurde wieder der Median gewählt, sodass zwei gleichgroße, 51 Teilnehmer starke Gruppen entstehen und keine Testung auf Normalverteilung erforderlich war. Die genaue Gruppenstatistik ist in Tabelle 31 aufgeführt. Es zeigt sich eine zweiseitig signifikante positive Korrelation der SLC16A3-Ratio mit der LDHA-Ratio ( $p = 0,005$ ). Je mehr SLC16A3, desto mehr LDHA enthielt die Probe.

	SLC16A3-Ratio	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
LDHA-Ratio	$\geq ,45$	51	,77	,26	,04	2,90	,005
	$< ,45$	51	,63	,24	,03		

Tabelle 31: Gruppenstatistik bei Einteilung der experimentellen Daten anhand der SLC16A3-Ratio.

#### 3.6.4.2 TCGA-Daten

Als Trennmarke für die t-Testung wurde wiederum der Median gewählt. Die Tabelle 32 zeigt die Gruppenstatistiken für die Aufteilung der Daten von SLC16A3. Es entstanden dadurch zwei gleich große Gruppen mit je 249 Teilnehmern pro Gruppe und Gen.

Es zeigt sich eine positive Korrelation zweiseitiger Signifikanz mit LDHA ( $p = 0,009$ ).

	SLC16A3	N	Mittelwert	Std.-Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	T	Signifikanz (2-seitig)
LDHA	$\geq 197,70$	249	7319,45	3402,66	215,64	2,64	0,009
	$< 197,70$	249	6477,32	3719,15	235,69		

Tabelle 32: Gruppenstatistiken für die TCGA-Daten von SLC16A3 bei Aufteilung nach dem Median

### 3.6.4.3 Graphische Gegenüberstellung

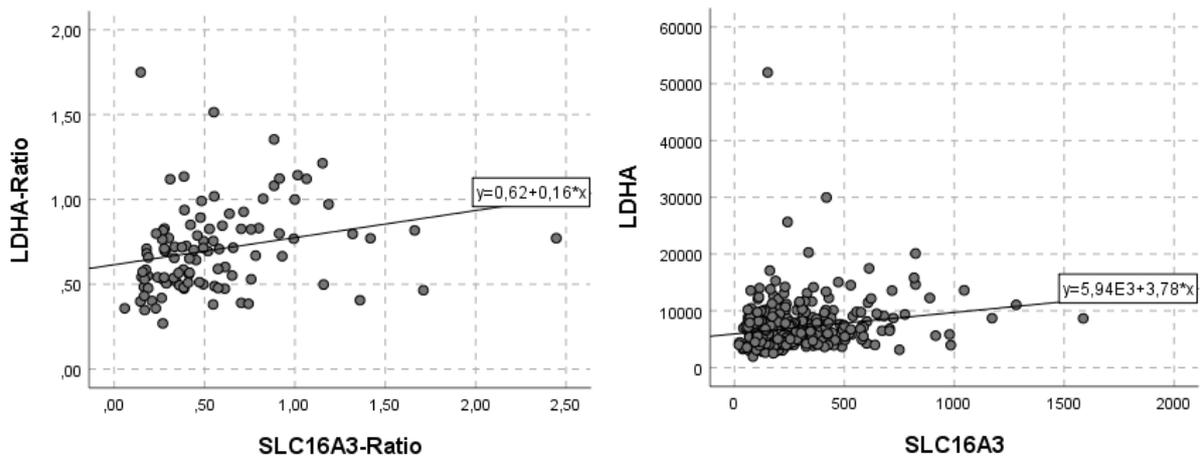


Abbildung 38: (links) Streudiagramm der eigenen Daten von SLC16A3 mit LDHA ( $p = 0,005$ ).

Abbildung 39: (rechts) Streudiagramm der TCGA-Daten von SLC16A3 mit LDHA. Es zeigt sich eine positive Korrelation, welche zweiseitig signifikant ist ( $p = 0,009$ ).

Die positive Ausgleichsgerade der eigenen Daten wird in den TCGA-Daten bestätigt, die Korrelation ist in beiden Fällen statistisch signifikant.

### **3.6.5 Zusammenfassung der Korrelationen der eigenen Daten**

Zur verbesserten Übersicht der mittels t-Test ermittelten Korrelationen wurden die nachfolgenden Tabellen erstellt. Eingetragen sind signifikante positive (+) und negative (-) Korrelationen. Ergebnisse mit nur einseitiger Signifikanz sind in Klammern gesetzt.

Bei HPRT1 und UCHL5 wurde jeweils mit dem Mittelwert an Zyklen ausgewertet und entsprechend keine Ratio berechnet. Generell bedeutet ein späteres Anschlagen allerdings weniger Genmenge, sodass eine positive Korrelation der reinen Zahlenwerte eigentlich eine negative Korrelation mit der Genmenge bedeuten würde. Um die Logik der Beziehungen der Parameter untereinander beizubehalten, sind daher für HPRT1 und UCHL5 die berechneten Korrelationen + und – vertauscht worden. Hier ein Beispiel: In der Tabelle sieht man eine positive Korrelation von UCHL5 mit AR. Dies bedeutet, dass in Proben mit insgesamt mehr gewonnenem genetischem Material auch anteilmäßig mehr AR enthalten war als in Proben, die insgesamt weniger genetisches Material enthielten.

Die Tabelle 36 zeigt die nachgewiesenen Korrelationen der klinischen Daten mit den experimentellen Daten. Die Tabelle 34 zeigt die nachgewiesenen Korrelationen der experimentellen Daten untereinander.

	HPRT1	UCHL5	AR	KLK2	TMPRSS2	SLC2A1	SLC16A3	LDHA	
Tabelle Zusammenfassung t-Test senen nen der daten tell Daten.	Patientenalter								33: menfas- der mittels nachgewie- Korrelatio- Patienten- mit den experimen- ermittelten Einseitige Korrelatio-
	Körpergröße								
	Körpergewicht								
	PSA								
	T-Stadium	-			-	-		+	
	N-Stadium	+		-	+	+		-	
	R-Status				+	+			
	Gleason-Summe				-	-	+	+	
	Prostatagewicht								
	Prostatavolumen								

nen sind in Klammern gesetzt.

	HPRT1	UCHL5	AR	KLK2	TMPRSS2	SLC2A1	SLC16A3	LDHA
HPRT1		+			-	-		
UCHL5	+		+		-			
AR								
KLK2					+	+		
TMPRSS2				+		+		
SLC2A1				+	+		+	+
SLC16A3			+	-		+		+
LDHA						+	+	

Tabelle 34: Zusammenfassung der mittels t-Test nachgewiesenen Korrelationen, einseitige Korrelationen in Klammern.

### 3.6.6 Zusammenfassung der Korrelationen der TCGA-Daten

Der Übersichtlichkeit wegen sind die Ergebnisse der t-Tests mit den TCGA-Daten in diesem Kapitel nochmal in Tabelle 35 und Tabelle 36 tabellarisch zusammengefasst. Dadurch können übergreifende Zusammenhänge besser erfasst und dargestellt werden.

Es zeigt sich, dass sowohl für die Trennmarke Median als auch für die Gruppierung nach dem Mittelwert größtenteils die gleichen Korrelationen nachgewiesen werden konnten. Lediglich die Signifikanzniveaus unterscheiden sich teilweise. Ebenfalls konnte für die Gruppierung nach dem Mittelwert zusätzlich noch eine Korrelation in Abhängigkeit von AR mit LDHA nachgewiesen werden, die bei Gruppierung nach dem Median nur einseitig signifikant war (dortiges  $p = 0,083$ ).

#### Gruppierung nach Median

Median	AR	KLK2	TMPRSS2	SLC2A1	SLC16A3	LDHA
AR		( $p < 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) +	( $p < 0,001$ ) +	( $p < 0,001$ ) -	
KLK2	( $p < 0,001$ ) -		( $p < 0,001$ ) +		( $p < 0,001$ ) -	( $p = 0,006$ ) -
TMPRSS2		( $p < 0,001$ ) +		( $p < 0,001$ ) +	( $p < 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) -
SLC2A1	( $p < 0,001$ ) +		( $p < 0,001$ ) +			
SLC16A3	( $p = 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) -			( $p = 0,009$ ) +
LDHA		( $p = 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) -		( $p < 0,001$ ) +	

Tabelle 35: Zusammenfassung der im t-Test nachgewiesenen zweiseitig signifikanten Korrelationen für die TCGA-Daten mit Trennmarke Median.

#### Gruppierung nach Mittelwert

Mittelwert	AR	KLK2	TMPRSS2	SLC2A1	SLC16A3	LDHA
AR		( $p < 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) +	( $p < 0,001$ ) +	( $p < 0,001$ ) -	( $p = 0,044$ ) -
KLK2	( $p < 0,001$ ) -		( $p < 0,001$ ) +		( $p < 0,001$ ) -	( $p = 0,009$ ) -
TMPRSS2		( $p < 0,001$ ) +		( $p < 0,001$ ) +	( $p < 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) -
SLC2A1	( $p < 0,001$ ) +		( $p < 0,001$ ) +			
SLC16A3	( $p < 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) -			( $p = 0,003$ ) +
LDHA		( $p = 0,001$ ) -	( $p < 0,001$ ) -		( $p = 0,001$ ) +	

Tabelle 36: Zusammenfassung der im t-Test nachgewiesenen zweiseitig signifikanten Korrelationen für die TCGA-Daten mit Trennmarke Mittelwert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Hintergrund und Übersicht

Der Androgenrezeptor und seine Aktivität haben beim Prostatakarzinom einen entscheidenden Einfluss auf das Tumorwachstum. Dies wird durch die Wirksamkeit der antiandrogenen Therapie und die bei weiter entdifferenzierten kastrationsresistenten Karzinomzellen vorhandene eigene Steroidproduktion bzw. Mutation des Androgenrezeptors hin zur androgenunabhängigen Daueraktivierung deutlich. Zusätzlich benötigt das Prostatakarzinom durch den erhöhten Zellumsatz und den gesteigerten Metabolismus eine hohe Energiezufuhr in Form von Glukose.

Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Veränderungen des Glukosestoffwechsels von Prostatakarzinomzellen in Abhängigkeit vom Androgenrezeptor zu beleuchten, die eventuell später therapeutisch nutzbar gemacht werden könnten.

Es sind neben dem Androgenrezeptor Gene mit nachgewiesener Abhängigkeit von AR ausgewählt worden, um die AR-Aktivität besser abbilden zu können. Ausgewählt wurden hierfür KLK2 und TMPRSS2. Für beide Gene wurde neben der Abhängigkeit von der AR-Aktivität bereits eine Assoziation mit dem Prostatakarzinom nachgewiesen (Shang et al., 2014b) (Bonk et al., 2020).

Zur Abbildung des Energiestoffwechsels der Prostatakarzinomzellen wurden die Gene SLC2A1, SLC16A3 und LDHA ausgewählt. SLC2A1 kodiert für GLUT1 und damit den wichtigsten Glukosetransporter. SLC16A3 kodiert für MCT4, einen Transporter von u.a. Laktat, Pyruvat und Ketonkörpern. LDHA katalysiert die Reaktion von Laktat zu Pyruvat. Mit Hilfe der in den Karzinomzellen enthaltenen Genmenge dieser Gene ist ein Rückschluss auf den stattfindenden Energiestoffwechsel der Karzinomzellen möglich.

Bei Tumorpatienten der urologischen Universitätsklinik Tübingen wurden – nach entsprechender Einwilligung in das Procedere – intraoperativ Frischgewebeproben entnommen und für Forschungszwecke in einer Datenbank zusammengeführt. Hierbei gab es zum jeweiligen Tumor einen repräsentativen Gewebepblock zur histologischen Auswertung und zwei damit direkt benachbarte Frischgewebeproben. Aus dieser Datenbank wurden anhand des histologisch eruibaren Tumoranteils Proben

ausgewählt und klinische Daten zu den passenden Patienten zusammengeführt. Die Datenbank wurde im Anschluss zur Weiterbearbeitung datenschutztechnisch bearbeitet, sodass kein Rückschluss mehr auf die einzelne Person möglich war. Es erfolgte die RNA-Isolierung aus einem repräsentativen Anteil der Frischgewebeprobe, sowie das Umschreiben in cDNA für die weitere Analyse und Lagerung. Im Anschluss wurden für die jeweiligen untersuchten Gene PCR-Analysen durchgeführt und die daraus generierten Ergebnisse in einer Datenbank erfasst und statistisch analysiert. Zur Verifizierung der Ergebnisse erfolgte nach einem generellen Plausibilitätscheck ein Vergleich mit dem Datensatz aus der TCGA-Datenbank. Dabei zeigten sich Überschneidungen, aber auch Unterschiede bei den Assoziationen. Teils war in den Ergebnissen der eigenen Laboruntersuchungen nur ein Trend bzw. eine Korrelation zweiseitiger Signifikanz nachweisbar, wohingegen in der TCGA-Datenbank eine klare Korrelation errechnet werden konnte. Dies liegt mutmaßlich an der größeren Fallzahl. Es konnten dennoch einige Korrelationen bestätigt werden.

Beispielsweise liegt eine positive Korrelation zwischen der Ausprägung von AR und der Ausprägung von TMPRSS2 und SLC2A1 vor. Eine höhere AR-Aktivität scheint also mit einer höheren Aktivität von GLUT1 assoziiert zu sein. Damit scheint der AR und seine Aktivität mit dem Glukosemetabolismus zusammenzuhängen.

## 4.2 Patientenstammdaten und Plausibilitätsprüfung des Kollektivs

Die Daten zum Patientenalter, der Körpergröße und des Körpergewichts sind annähernd normalverteilt, so wie dies in der Grundgesamtheit der Patienten zu erwarten wäre.

In diesem Kollektiv haben Patienten mit zunehmendem Alter eine größere ( $p = 0,005$ ) und schwerere Prostata ( $p = 0,009$ ). Dies entspricht dem aktuellen Wissensstand für die Grundgesamtheit der Männer und ist auch in anderen Kollektiven nachgewiesen worden (Untergasser et al., 2005), ebenso tritt ein mit einer größeren Prostata einhergehendes BPS im Alter deutlich häufiger auf (Berges, 2008).

Eine größere Prostata produziert normalerweise auch mehr PSA, also sollte in der Grundgesamtheit der Männer ein höherer PSA-Spiegel ein Hinweis auf eine größere Prostata sein (im Kollektiv  $p = 0,043$ ). Die größere Prostata sollte dann auch mit einem größeren Gewicht einhergehen. Im Kollektiv korreliert das präoperative PSA ebenfalls positiv mit dem Prostatagewicht ( $p = 0,025$ ). Je höher das T-Stadium, also je größer und invasiver der Tumor wächst, desto höher ist auch der PSA-Spiegel ( $p = 0,006$ ). Ein größerer Tumor spricht aber nicht automatisch für ein größeres Organ, es gibt keine Korrelation vom T-Stadium mit dem Prostatagewicht und dem Prostatavolumen.

Bei Korrelation des Alters, der Körpergröße und des Körpergewichts mit den experimentellen Daten ergaben sich keine statistisch signifikanten Korrelationen. Dies kann mit der Vielfalt der Prostatakarzinom-Subtypen erklärt werden und könnte bei umfangreicheren Kollektiven anders sein.

Der Diabetes-Status der an dieser Arbeit teilnehmenden Patienten ist nicht erfasst worden. Einige Studien legen aber nahe, dass Diabetes mellitus als Vorerkrankung ebenfalls einen Einfluss auf den Stoffwechsel der Prostatakarzinomzellen und sogar den nahen umgebenden Zellen haben könnte (Heni et al., 2012). Schon länger ist bekannt, dass ein höheres Glukoseangebot, das beim Patienten durch einen erhöhten HbA1c-Wert nachweisbar ist, mit einem aggressiveren Tumorwachstum einhergeht (Kim et al., 2010). Diese Patienten haben wahrscheinlich ein höheres Risiko für Lymphknotenmetastasen und eine stärkere Zellentartung (Lutz et al., 2018b).

Housekeeping-Gene stehen in der eigentlichen Auswertung nur im Hintergrund. Es scheint aber auch plausibel, dass die beiden verwendeten Housekeeping-Gene miteinander stark positiv korrelieren – je später der steady-state bei HPRT1 erreicht war, desto später war er auch bei UCHL5 erreicht ( $p < 0,001$ ) und umgekehrt ( $p < 0,001$ ). Die Housekeeping-Gene ergänzen sich also gut miteinander und zeigen kongruent zueinander die enthaltene Genmenge der Probe an.

Insgesamt kann man also sagen, dass in der Allgemeinheit gültige Grundsätze auch im vorliegenden Kollektiv Gültigkeit haben. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass im Kollektiv herausgefundene Korrelationen oder Assoziationen ebenfalls auf die Allgemeinheit extrapoliert werden können.

## 4.3 Korrelation der klinischen Daten

### 4.3.1 T-Stadium

Beim T-Stadium ist eine negative Assoziation mit KLK2 ( $p = 0,009$ ) und TMPRSS2 ( $p = 0,010$ ) nachgewiesen worden. Dies passt nicht ganz zu der Literatur, laut der entweder ein höherer Spiegel von KLK2 (Shang et al., 2014b) oder ein höherer Spiegel von TMPRSS2 (Bonk et al., 2020) mit höheren Tumorstadien und aggressiverem Wachstum einhergeht. Ein Vergleich mit der TCGA-Datenbank wurde für die klinischen Daten nicht durchgeführt, da die Fragestellung der Arbeit sich auf den AR und die nachgeschalteten Gene bezieht und nicht auf eine Korrelation mit klinischen Daten.

Die positive Assoziation vom T-Stadium mit SLC16A3 ist in dieser Arbeit nicht signifikant nachweisbar. Diese positive Assoziation wurde in einer Arbeit aus 2011 beschrieben, in der eine vermehrte Ausprägung von unter anderem MCT-Isoformen bei der PIN auch mit einem höheren T-Stadium einherging (Pértega-Gomes et al., 2011).

### 4.3.2 Nodalstatus

Es ergab sich eine positive Assoziation des Nodalstatus mit KLK2 ( $p = 0,002$ ) und TMPRSS2 ( $p = 0,083$ ). Dies spricht wieder für das Vorliegen von mehreren Entitäten des Prostatakarzinoms. Einerseits gibt es ein Prostatakarzinom mit erhöhten KLK2-Raten, welches mit schlechter Prognose einhergeht (Shang et al., 2014b). Andererseits gibt es später einen KLK2-Verlust mit erhöhten TMPRSS2-Raten, die ebenfalls mit einer schlechten Prognose im Sinne von Metastasen einhergehen (Bonk et al., 2020).

Zusätzlich ist eine negative Assoziation des Nodalstatus mit AR ( $p = 0,052$ ) nachgewiesen worden. Dies könnte durch den im späteren Verlauf stattfindenden Wandel der Karzinomzellen zu einem androgenunabhängigen Wachstum hin bedingt sein (Gamat and McNeel, 2017).

Ebenfalls ist eine negative Assoziation des Nodalstatus mit SLC16A3 ( $p = 0,048$ ) nachgewiesen worden. Dies passt nicht zum aktuellen Kenntnisstand, da in Zellreihen von metastasierten Prostatakarzinomzellen eine erhöhte Expression von MCT4 aufgezeigt werden konnte (Pereira-Nunes et al., 2020).

Einschränkend muss erwähnt werden, dass Zellkulturen nicht immer einen Rückschluss auf den tatsächlich stattfindenden Stoffwechsel geben können. Es gibt einerseits androgenunabhängige Basalzellen und andererseits luminale Zellen, die in Abhängigkeit von Androgenen PSA produzieren und KLK2 exprimieren. Vielfach gewinnt man in der Zellkultur jedoch Intermediärzellen, die Eigenschaften der beiden genannten Zellarten haben. Teilweise repräsentieren diese Zellkulturen dann also nicht die tatsächlich im Patienten vorhandenen Prostatakarzinomzellen und deren Stoffwechsel (Bühler et al., 2010). Hinzu komme noch, dass es selbst innerhalb der Prostata in den verschiedenen Zonen verschiedene Arten von Prostatazellen gebe. Beispielsweise sei in der peripheren Zone unter anderem weniger p53 exprimiert, was das bevorzugte Auftreten von Karzinomen in diesem Bereich miterklären könnte (Kirschenbaum et al., 2006). Die Ergebnisse aus Zellkulturen sind also immer mit Vorsicht zu betrachten und nicht zwangsläufig mit denen aus primärem Karzinomgewebe vergleichbar, da sich die tatsächlich vorhandenen Zellen voneinander und deren Zusammenspiel untereinander unterscheiden können. In dieser vorliegenden Arbeit wurde primäres Karzinomgewebe verwendet, also natürlich gewachsene Tumorzellen aus Patienten und keine künstlichen Karzinomzellen. Dies könnte eventuelle Differenzen der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen der in anderen Arbeiten oftmals verwendeten Zellkulturlinien erklären.

### **4.3.3 Gleason-Summe**

Für die Gleason-Summe konnte eine positive Korrelation mit LDHA nicht signifikant nachgewiesen werden ( $p = 0,057$ ). Diese war allerdings in einer Studie aus 2020 nachweisbar, die mittels PET-CT in einer Zellkultur mit Prostatakarzinomzellen bei High-Grade Prostatakarzinomzellen ab Gleason 4 eine deutlich höhere LDHA-Aktivität nachgewiesen hat und dies als Möglichkeit sieht, beim frisch diagnostizierten Prostatakarzinom oder im Rahmen der Active Surveillance low-grade und high-grade nicht-invasiv differenzieren zu können (Sriram et al., 2020). Möglicherweise hätte eine höhere Fallzahl eine Signifikanz zeigen können.

#### **4.3.4 PSA**

Bemerkenswert ist, dass das präoperativ gemessene PSA nur knapp nicht signifikant mit der Ausprägung von AR korreliert ( $p = 0,110$ ), es aber keine Korrelation mit KLK2 gibt. In der Zellkultur und im Mausmodell war bereits gezeigt worden, dass KLK2 PSA aktivierte, das dann nicht mehr in freier Form nachweisbar war (Williams et al., 2010). In dieser Arbeit ist bei PSA immer das im Labor messbare freie PSA gemeint. Theoretisch müsste man davon eine negative Korrelation ableiten können, also weniger freies PSA präoperativ bei mehr KLK2-Expression.

## **4.4 Korrelation der experimentellen Daten und Vergleich mit dem TCGA-Datensatz**

### **4.4.1 AR und AR-Aktivität**

In der Literatur ist wiederholt eine Abhängigkeit von AR und den mutmaßlich nachgeschalteten Genen KLK2 und TMPRSS2 beschrieben worden, die einen Hinweis auf die AR-Aktivität geben (Murtha et al., 1993, Wadosky et al., 2019, Vander Griend et al., 2009, Culig and Santer, 2014, Shang et al., 2014b), (Bonk et al., 2020), Vgl. auch Kapitel 1.3.2 ab Seite 32).

Im Rahmen dieser Arbeit ist keine signifikante zweiseitige Korrelation von AR mit TMPRSS2 nachgewiesen worden ( $p = 0,077$ ). Diese war in den TCGA-Daten signifikant positiv (TCGA  $p < 0,001$ ). Für KLK2 ist eine positive Korrelation mit TMPRSS2 ( $p = 0,001$ ) nachgewiesen, die in den TCGA-Daten bestätigt wurde (TCGA  $p < 0,001$ ).

Die unterschiedliche Korrelation von AR mit TMPRSS2 in den eigenen Daten und den TCGA-Daten könnte an der mit 102 recht niedrigen Fallzahl liegen. Vergleichsweise wurden aus der TCGA-Datenbank 498 Datensätze exportiert. Zusätzlich könnte trotz Plausibilitätsprüfung des Kollektivs eine Selektionierung durch unbekannte Einflussfaktoren stattgefunden haben. So könnten im eigenen Kollektiv vergleichsweise viele TMPRSS2-negative Tumore enthalten sein, während die TCGA-Datenbank statistisch gesehen wahrscheinlicher ein besseres Abbild der Verteilung aller Tumorvarianten bietet. Allerdings muss auch erwähnt werden, dass ein p-Wert von 0,077 nicht weit von der statistischen Signifikanz  $< 0,05$  entfernt ist.

Für das Prostatakarzinom gibt es verschiedene Therapieansätze, die sich auf den AR beziehen. Da diese weiterhin Probleme in Verträglichkeit und Wirkung haben, besteht weiterer Forschungs- und Optimierungsbedarf.

Es war bereits 1941 beobachtet worden, dass durch operative Kastration und damit Androgenentzug der Tumor und seine Metastasen schrumpften (Huggins et al., 1941), was auf eine Reduktion des Energiestoffwechsels hindeuten könnte. Vergleichbare Ergebnisse sind auch durch chemische Kastration erreichbar (Sciarra et al., 2004).

Allerdings haben die operativen und medikamentösen Androgen-unterdrückenden Therapien Nebenwirkungen, die für die Patienten bedeutsam sein können. Die neueren nichtsteroidalen Antiandrogene haben im Vergleich zum obsoleten Cyproteronacetat Vorteile hinsichtlich besserer Libido, Potenz und körperlicher Leistungsfähigkeit, fehlendem kardiovaskulären Risiko und fehlender Hepatotoxizität. Sie bewirken aber deutlich häufiger eine Gynäkomastie und Brustschmerz (Gillatt, 2006). Die jeweiligen Nebenwirkungen der neuen Medikamente sind medikamentös teils gut beherrschbar, bedeuten für die einzelnen Patienten dennoch teils starke Einschränkungen in der Lebensqualität (Sciarra et al., 2004).

Generell ist nach Kastration ebenfalls die dann fehlende immunsuppressive Wirkung der Androgene und damit die Verstärkung der körpereigenen Abwehr durch beispielsweise Einwanderung von Lymphozyten vorteilhaft. Problematisch ist allerdings die ausnahmslose Mutation der Tumorzellen hin zu einem androgenunabhängigen Wachstum (Gamat and McNeel, 2017), beispielsweise durch eigenständige Produktion von Androgenen (Eidelman et al., 2017) oder Eigenstimulation des AR (Sobhani et al., 2021).

Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit der Kombination von Chemotherapeutika wie bspw. Docetaxel mit der Androgendeprivationstherapie und mit der Entwicklung neuer wirksamerer antihormoneller Substanzen, um auch für höhergradige Prostatakarzinome eine optimal wirksame und nebenwirkungsarme Therapiesequenz finden zu können (Kretschmer and Todenhöfer, 2020).

Außerdem wird untersucht, ob die Expression von bestimmten AR-Subtypen bereits eine Aussage zur möglichen Effektivität einer antiandrogenen Therapie treffen kann und dadurch die Therapie weiter optimiert werden könnte, damit jeder Patient die für ihn optimale Therapie erhält. Beispielsweise gibt es mit AR-V7 eine Splice-Variante von AR, die keine Ligandenbindungsstelle hat und ständig aktiv ist (Todenhöfer et al., 2017, Sobhani et al., 2021). Bei Ausprägung dieser Variante ist selbst unter antiandrogener Therapie eine erhöhte Ausprägung von KLK2 und KLK3 beobachtet worden (Lovell et al., 2021).

Bonk et al. haben herausgefunden, dass auch eine verminderte Expression von KLK2 mit einer höheren Invasivität, erhöhten Zellteilungsraten, höherem Gleason-Score und

früherem erneuten PSA-Anstieg einhergehen kann. Die Arbeitsgruppe hat in diesen Fällen eine Häufung des TMPRSS2-ERG-Fusionsgen beobachtet (Bonk et al., 2020).

Es scheint also mehrere Entitäten des Prostatakarzinoms zu geben, welche den Energiestoffwechsel der Karzinomzellen abhängig von KLK2 oder TMPRSS2 beeinflussen können und entsprechend unterschiedliche Therapieansätze bieten könnten.

Das weitere Verständnis der nachgeschalteten Stoffwechselprozesse könnte weitere neue Therapieansätze aufzeigen, die unter Umständen nebenwirkungsärmer sein oder eine längerfristige Remission bewirken könnten. Diese könnten ggf. als Ersatz oder Ergänzung der Androgendeprivationstherapie oder beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom Anwendung finden. Hierzu ist es allerdings erforderlich, entsprechende Zielstrukturen zu finden.

### **4.4.2 SLC2A1 und GLUT1**

In den eigenen experimentellen Ergebnissen wurde für TMPRSS2 eine positive Korrelation mit SLC2A1 ( $p < 0,001$ ) berechnet, welche in den TCGA-Daten bestätigt werden konnte (TCGA  $p < 0,001$ ). In den TCGA-Daten ist ebenfalls eine positive Korrelation von AR mit SLC2A1 (TCGA  $p < 0,001$ ) nachweisbar.

Die Dysregulation von Glukosetransportern ist bei verschiedenen Karzinomen bereits erwähnt, insbesondere die des auch hier untersuchten GLUT1 (Yi et al., 2023, Moreno-Acosta et al., 2017). Edemir hat 2020 eine Übersichtsarbeit zu verschiedenen Transportproteinen veröffentlicht, in der es nicht primär um das Prostatakarzinom geht. Es werden SLC2A1 und SLC16A3 als prognostisch ungünstige Marker bei anderen Tumorentitäten genannt, da deren verstärkte Ausprägung mit einem verkürzten Überleben vergesellschaftet war (Edemir, 2020). Die vermehrte Ausprägung von GLUT1 und damit einhergehende Assoziation mit einer schlechteren Prognose ist beispielsweise für das Mammakarzinom (Younes et al., 1995), das Lungenkarzinom (Ogawa et al., 1997) und das kolorektale Karzinom (Haber et al., 1998) beschrieben worden. GLUT1 sei bei verschiedenen Tumorentitäten häufig dereguliert und durch die Funktion der

Energieversorgung mit Glukose ein gutes Ziel für neue Therapiesubstanzen (Ancey et al., 2018).

Beim Prostatakarzinom haben Androgene und der AR ebenfalls einen Einfluss auf die GLUT1-Aktivität (Gonzalez-Menendez et al., 2018b), wobei es Hinweise dafür gibt, dass Androgene selbst ohne AR-Aktivierung bereits den Glukosemetabolismus direkt beeinflussen könnten (Martins et al., 2013).

2010 konnte gezeigt werden, dass beim Prostatakarzinom eine vermehrte GLUT1-Expression mit einer kürzeren Zeit bis zum PSA-Rezidiv einherging. Diese Arbeit sieht GLUT1 eher als möglichen prognostischen Marker, um die richtigen Patienten für eine engere Nachsorge auswählen zu können, nicht aber als möglichen therapeutischen Ansatz (Jans et al., 2010).

Xiao et al. haben 2017 gezeigt, dass die GLUT1-Expression in Prostatatumorgewebe im Vergleich zum normalen Prostatagewebe erhöht ist und dies wahrscheinlich für Glykolyse und Proliferation wichtig ist. Abweichend zur vorherigen Arbeit von Jans sahen sie eine Unabhängigkeit der GLUT1-Expression von Tumorgröße und -stadium. Sie erklärten, dass GLUT1 am ehesten nicht mit der Progression korreliert und schränken damit die Bedeutung von GLUT1 als möglichen prognostischen Marker wieder ein (Xiao et al., 2018).

Es wurde mittels PET-CT die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme von Prostatakarzinomzellen untersucht, wobei diese Studie sich auf Gleason-Summen von 8-10 beschränkte. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme zumindest beim high-grade Prostatakarzinom mit der Ausprägung von GLUT1 korrelierte und damit für die Prognose und die Auswahl der geeigneten Therapie hilfreich sein könnte (Meziou et al., 2020).

Es gibt Hinweise auf einen androgenabhängig gesteigerten Glukoseverbrauch mit gesteigerter Laktatproduktion und gesteigerter Expression von GLUT1 und MCT4, was Proteinprodukt von SLC16A3 ist. Zusätzlich ist in der Zellkultur nach Gabe von Dihydrotestosteron eine entsprechende Hochregulierung von GLUT1 und auch GLUT3 nachgewiesen worden (Vaz et al., 2016). Andersherum ist im Zellversuch nach Androgenentzug bei bestimmten Prostatakarzinomzelllinien eine verminderte Aufnahme von Fluordesoxyglukose (FDG) beschrieben worden (Emonds et al., 2011), was für

eine Herunterregulierung von GLUT1 durch Androgenentzug spricht (Mochizuki et al., 2001) und wiederum die Hypothese der hier nachgewiesenen AR-Aktivitäts-Abhängigkeit von GLUT1 stärkt.

In einer anderen Arbeit ist gezeigt worden, dass durch Steigerung der AR-Expression ebenfalls eine häufigere Expression von GLUT1 (SLC2A1) beobachtet werden kann (Wang et al., 2020). Zuvor war bereits eine durch Androgene gesteigerte GLUT1-Expression beschrieben worden, was den Tumorzellen ebenfalls für die Reduktion des durch Glukoseentzug entstehenden Oxydationsstresses diene (Gonzalez-Menendez et al., 2018a). Der AR steigert dabei direkt die Expression von SLC2A1 bzw. GLUT1 (Massie et al., 2011). Eine Arbeitsgruppe sieht GLUT1 als vielversprechende Zielstruktur für die Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (Wang et al., 2020).

GLUT1-Inhibitoren sind Bestandteil der aktuellen Forschung zur Entdeckung neuer Therapieoptionen (Pliszka and Szablewski, 2021, Reckzeh and Waldmann, 2020). Bei anderen Karzinomen werden bereits entsprechende GLUT1-Inhibitoren zur Therapie an Zellkulturen getestet, beispielsweise für neuroendokrine Tumoren und kleinzellige Bronchialkarzinome (Winter et al., 2023), für das Pankreaskarzinom (Poonprasartporn et al., 2024). Eine Arbeit zur kombinierten GLUT1-Inhibition mit Chemotherapie beim Melanom zeigte ein deutlich besseres Ansprechen der Tumorzellen, wohingegen Fibroblasten deutlich weniger sensitiv waren und keine signifikante Menge Sauerstoffradikale bildeten (Nawrot-Hadzic et al., 2023).

GLUT1-Inhibitoren könnten auch zur Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms verwendet werden oder aber in Kombination mit der Androgendeprivationstherapie die Zeit bis zur Kastrationsresistenz verlängern.

Eine Arbeitsgruppe, die ebenfalls einen Zusammenhang der GLUT1-Expression mit dem Gleason-Score und der Zellproliferation gesehen hat, will GLUT1 therapeutisch nutzbar machen. Sie haben bei GLUT1-Inhibition die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen und schließlich Apoptose der Prostatakarzinomzellen nachweisen können (Cardoso et al., 2021).

Eine Arbeitsgruppe sieht in der mikro-RNA miR-378a einen möglichen GLUT1-Inhibitor. Diese sei beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom herunterreguliert, wodurch

GLUT1 vermehrt exprimiert werde. Die beste Wirksamkeit zeigte sich im Zellversuch beim frühen Prostatakarzinom, weitere Versuche gab es bisher nicht (Cannistraci et al., 2022). Fraglich ist der therapeutische Nutzen und wie man diese mikro-RNA in die Tumorzellen bekommen könnte.

Monoethanolamin verlagert den GLUT1 ins Zytosol und behindert den Wiedereinbau in die Zellmembran. Die Expression an sich werde hierbei nicht verändert. Hierdurch werden die Prostatakarzinomzellen durch Glukoseentzug unter metabolischen Stress gesetzt. Weiterhin induziert Monoethanolamin die Apoptose durch Autophagie. Diese Beobachtungen wurden im Xenograft-Modell an Mäusen bestätigt (Garlapati et al., 2021).

Einige weitere Arbeitsgruppen versuchen bereits, sich dieses Wissen in der Therapie nutzbar zu machen. So wurde mit Fasentin ein im virtuellen Modell an GLUT1 bindender Inhibitor entwickelt (Wood et al., 2008), der in neueren Studien aber auch unabhängig vom Glukosemetabolismus einen negativen Effekt auf die Angioneogenese hatte. Dieser war mit bereits bekannten GLUT1-Inhibitoren so nicht nachzuvollziehen (Ocaña et al., 2020). Hier besteht also weiterer Forschungsbedarf.

Ein anderer Ansatz ist, die Überexprimierung von GLUT1 auszunutzen und eben diesen Transporter für den Import von Medikamenten in die Prostatakarzinomzelle zu verwenden. Dies hat den Vorteil, dass die Medikamente zielgerichtet in den Tumorzellen konzentriert werden und dort den größten zytotoxischen Effekt hat. Eine Arbeitsgruppe hat mit Glukose-Konjugaten von 1,4-Naphthoquinon vielversprechende Stoffe gefunden, die diesen Ansatz nutzen und über eine Eliminierung der Mitochondrien die Apoptose der Karzinomzellen einleiten (Dyshlovoy et al., 2019).

### **4.4.3 SLC16A3 / MCT4, Laktatshuttle und LDHA / LDH**

In den eigenen experimentellen Ergebnissen wurde für KLK2 eine signifikante negative Korrelation mit SLC16A3 ( $p < 0,001$ ) und mit LDHA ( $p = 0,009$ ) nachgewiesen.

In den TCGA-Daten zeigte sich eine negative Korrelation von je KLK2 und TMPRSS2 mit jeweils SLC16A3 und LDHA (jeweils TCGA  $p \leq 0,001$ ).

Eine erhöhte AR-Aktivität, gemessen durch die erhöhte KLK2- und TMPRSS2-Expression, ist also in den Daten mit einer Runterregulation von SLC16A3 und LDHA assoziiert.

In den eigenen Daten ließ sich eine statistisch signifikante positive Assoziation von SLC2A1, SLC16A3 und LDHA untereinander feststellen (p-Werte siehe ab Kapitel 3.6.3 ab Seite 110). Diese ist insofern konklusiv, als dass sie für jeden der Parameter untereinander nachgewiesen werden kann. In den TCGA-Daten ist lediglich eine positive Assoziation von SLC16A3 und LDHA nachzuweisen.

#### **4.4.3.1 SLC16A3 und MCT4**

MCT4, das Proteinprodukt von SLC16A3, ist unter anderem ein Protonentransporter, sowie ein Transporter von Laktat, Pyruvat und Ketonkörpern, sowie von Medikamenten (Edemir, 2020). Tumoreale sind für den absolut erhöhten Energiebedarf relativ schlecht perfundiert, wodurch neben dem erforderlichen anaeroben Stoffwechsel auch die Diffusion der Chemotherapeutika zum Wirkort bereits erschwert wird. Durch die Hochregulation von MCT4 und damit der Senkung des pH-Wertes im Tumorgebiet findet ein ion-trapping von leicht basischen Chemotherapeutika statt, die dann nur in unzureichendem Maße in die Tumorzelle eindringen können. Durch den zusätzlich generell niedrigen Sauerstoffpartialdruck in der Tumorzelle ergebe sich eine Resistenz gegenüber Radiotherapie durch geringere Bildung von Sauerstoffradikalen. Eine vermehrte Hypoxie scheint außerdem mit einer höheren Metastasierungsrate einherzugehen (Gillies et al., 2002). Andere Quellen gehen davon aus, dass die verschiedenen MCT-Isoformen in Tumorzellen eher aus der Not heraus hochreguliert seien, da die Tumorzellen sonst durch Ansammlung toxischer Metabolite – wie zu viel Laktat – zugrunde gehen könnten (Eidelman et al., 2017, Franklin and Costello, 2007).

Beim Pankreaskarzinom habe man bereits das Malignitätspotenzial verringern können, indem MCT4 als Ziel einer Chemotherapie verwendet wurde (Edemir, 2020). Auch für das Blasenkarzinom gibt es bereits Arbeiten, die eine Überexpression von MCT4 mit schlechterem Überleben assoziieren. Eine MCT4-Inhibition hingegen sei mit reduzierter Proliferation, vermehrter Apoptose und vermehrten Sauerstoffradikalen vergesellschaftet. Im Zellmodell sei ebenfalls ein reduziertes Tumorwachstum beobachtet worden. Die Arbeit bezieht sich auf den basischen Subtyp des Urothelkarzinoms (Todenhöfer et al., 2018), grundlegende Stoffwechselprozesse könnten jedoch gut auf andere Karzinome übertragbar sein (Vgl. (Edemir, 2020)).

Alle MCT-Isoformen und CD147 werden bei der PIN vermehrt exprimiert und gehen mit schlechter Prognose im Sinne von höheren PSA-Spiegeln, höherem Gleason-Score und höherem T-Stadium, perineuralem Wachstum und früherem PSA-Rezidiv einher (Pértega-Gomes et al., 2011).

Es wurde in androgenresistenten Prostatakarzinomzellreihen von einer verminderten Expression von GLUT3, aber einer höheren Expressionsrate von MCT4 und einer erhöhten LDH-Aktivität berichtet. Nebenbefundlich seien Hinweise auf einen erhöhten oxidativen Stress gefunden worden. Diese Arbeitsgruppe sieht LDH und MCT4 als mögliche Parameter zur Erschließung neuer Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten (Vaz et al., 2012).

MCT4-Inhibitoren sind Bestandteil der aktuellen Forschung und werden für verschiedene Karzinome als neue Therapieoption in Erwägung gezogen (Liu et al., 2023).

Eine Arbeit aus 2019 zeigt, dass bei Inhibierung der MCT4-Expression in der Prostatakarzinomzellkultur die Zellproliferation reduziert und die Apoptose eingeleitet wurde. Dort wurde auch die parallele Herunterregulation von VEGF, CD147, MMP2 und MMP9 beschrieben, welche somit als mögliche Downstream-Parameter von MCT4 infrage kämen und für die Invasivität mitverantwortlich seien (Sun et al., 2019a).

Zusätzlich sind bereits Tierversuche durchgeführt worden, die eine MCT4-Inhibition mit vermindertem Tumorwachstum ohne größere Toxizität bei Mäusen zeigte. Einschränkend sind hier nur Verhaltensanalysen der Mäuse für 15 Tage durchgeführt worden, was von einer Langzeittherapie beim Menschen weit entfernt ist. Die Studie kommt zu dem Ergebnis, dass die MCT4-Inhibition eine mögliche und nützliche

Antwort auf die Kastrationsresistenz des Prostatakarzinoms und auch anderer Karzinome sein könnte, da sie beim karzinombedingt umprogrammierten Energiestoffwechsel eingreift (Choi et al., 2016).

Beim neuroendokrinen Prostatakarzinom führte eine MCT4-Blockade zu verminderter Laktatsekretion, vermindertem Glukosemetabolismus und vermindertem Zellwachstum. Auch diese Arbeit bezeichnet die MCT4-Inhibition als vielversprechenden Therapieansatz (Choi et al., 2018).

Möglicherweise könnte also neben einer GLUT1-Inhibition auch eine MCT4-Inhibition zielführend sein, hier ist aber ebenfalls noch viel Forschung erforderlich.

### **4.4.3.2 Der (reverse) Warburg – Effekt**

Es ist schon länger bekannt, dass der bereits in der Einleitung beschriebene Laktat-Shuttle (Vgl. Kapitel 1.4.2, S. 35f) auch beim Prostatakarzinom existiert (Fiaschi et al., 2012). Fibroblasten des Stromas produzieren Laktat und schleusen dies über MCT4 nach extrazellulär. Von dort aus kann die Tumorzelle über MCT1 das Laktat nach intrazellulär einschleusen, es in Pyruvat umwandeln und im Citratzyklus zur Energiegewinnung verwenden. Zusätzlich nehmen Tumorzellen mit oxidativem Stoffwechsel dadurch mehr Laktat und weniger Glukose auf. Diese steht dann Tumorzellen mit anaerobem Stoffwechsel zur Verfügung (Liu et al., 2023).

Eine MCT1/MCT4-Coexpression sei mit einer schlechten Prognose entsprechend einem pT3-Stadium oder einem kombinierten Gleason-Score  $\geq 9$  vergleichbar. Die Arbeitsgruppe schränkt zur therapeutischen Relevanz ein, dass MCTs ebenfalls für das Einschleusen von Medikamenten in die Tumorzellen verantwortlich seien (s.o.) und eine Inhibierung ggf. zusätzliche Nachteile für eine anschließende Chemotherapie haben könnte (Andersen et al., 2015). Die gleiche Hypothese, dass der Laktat-Shuttle zwischen Stroma- und Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose im Sinne eines pT3-Stadiums einhergeht, wurde bereits 2014 aufgestellt (Pértega-Gomes et al., 2014).

Mehrere Arbeitsgruppen haben den reversen Warburg-Effekt und den Bezug von den Karzinom-assoziierten Fibroblasten zu den Prostatakarzinomzellen untersucht und sind zu dem Schluss gekommen, dass die Prostatakarzinomzellen die

Laktatproduktion der Fibroblasten mittels Produktion vom Hypoxie-induzierten Faktor 1 steuern können (Sanità et al., 2014, Martinez-Outschoorn et al., 2014, Fiaschi et al., 2012).

Der HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor) erhöht die Glykolyse, Erythropoese und Angiogenese – Letzteres über Stimulierung von VEGF – und kann mittels abhängiger Proteine auch auf den Zellzyklus Einfluss nehmen, namentlich p51, p21 und Bcl-2. Ein HIF-1 $\alpha$ -Verlust könne aber durch verminderte hypoxieinduzierte Apoptose und stressbedingte Proliferation auch zum beschleunigten Tumorwachstum führen (Carmeliet et al., 1998). Zusätzlich sei auch GLUT1 ein Protein, das durch Hypoxie und damit erhöhte AMPK-Spiegel (5'-AMP-Activated-Protein-Kinase) vermehrt exprimiert werde (Laderoute et al., 2006).

Als erster Versuch des therapeutischen Einsatzes war 2008 im Xenograft-Mausmodell beim Zervixkarzinom, kolorektalen Karzinom und Lungenkarzinom durch MCT1-Inhibition der Wechsel der Karzinomzellen zur Glykolyse und unter Glukoseentzug und Hypoxie der Zelltod beschrieben worden. Durch den sinkenden Laktatspiegel waren die übrig gebliebenen Zellen durch Bestrahlung abtötbar (Sonveaux et al., 2008).

MCT1 und MCT4 sind Bestandteil der aktuellen Forschung bei vielen Karzinomen (Singh et al., 2023). Die kombinierte Inhibition von MCT1 und MCT4 zeigte beispielsweise bei Mammakarzinomzellen eine Verbesserung der zytotoxischen Wirkung (Nadai et al., 2023).

In Zellreihen metastasierten Prostatakarzinoms werde mehr MCT1/4 exprimiert als in Zellreihen von lokal begrenztem Prostatakarzinom. Auch hier sank bei MCT1/4- und LDH- Inhibition die Zellteilungsrate in vitro und in vivo. Die Arbeitsgruppe sieht diese Kombination als mögliche neue Strategie bei der Therapie des Prostatakarzinoms (Pereira-Nunes et al., 2020).

Neben GLUT1 und MCT4 wäre also auch MCT1 eine mögliche Zielstruktur für neue Medikamente zur Therapie des Prostatakarzinoms.

#### 4.4.3.3 LDHA bzw. LDH

Laktat und Pyruvat sind als Radikalfänger für die Unempfindlichkeit der Karzinomzellen gegenüber Radiochemotherapie mitverantwortlich. Der saure Umgebungs-pH wirkt der körpereigenen Tumorabwehr entgegen (Vaupel and Multhoff, 2021). Das ion-trapping und die Bedeutung hinsichtlich der Energieversorgung ist bereits oben erwähnt worden (Vgl. Kapitel 4.4.3.1). Zusätzlich führt der niedrige pH zu einer Säure-induzierten Toxizität für das umgebende Gewebe, zur Schädigung der Extrazellulärmatrix durch unter anderem Freisetzung von Cathepsin B und zur Angiogeneese (Gatenby and Gillies, 2004, Gatenby et al., 2006).

Laktat steigert die Proliferation der Prostatakarzinomzellen und erhöht deren Metastasierungsrate. Eine Supprimierung von LDHA hatte entsprechend einen Rückgang des Tumorwachstums und der lymphnodalen und viszeralen Metastasen zur Folge und erhöhte die Apoptoserate (Cardoso et al., 2021). Damit übereinstimmend schreiben Xian et al. ebenfalls von der Schaffung einer tumorgünstigen Mikroumgebung durch LDHA und bezeichnen dies als möglichen Therapieansatz zur Metastasenkontrolle und Reduktion des Tumorwachstums (Xian et al., 2015).

Eine andere Studie aus 2020 hat gezeigt, dass vor allem bei stark entdifferenzierten Prostatakarzinomzellen eine höhere LDHA-Aktivität vorliegt. Die Arbeitsgruppe hat dies mittels PET-CT nachgewiesen und dabei keinen relevanten Unterschied der LDHA-Aktivität zwischen Normalgewebe und nur leicht entdifferenzierten Prostatakarzinomzellen festgestellt. Parallel dazu war auch eine höhere Ausprägung von MCT4 erkannt worden, was auf den Warburg Effekt hindeutet. Dieser Unterschied der LDH- und MCT4-Expression wird in der Studie als Möglichkeit gesehen, um eventuell beim noch nicht therapierten Karzinom die Trennschärfe zu erhöhen und die Entscheidung zu vereinfachen, ob diesem Patienten eine kurative Therapie nützlich wäre oder er mit einem Watchful Waiting aktuell besser versorgt wäre (Sriram et al., 2020).

Eine LDH-Inhibition ist Bestandteil der aktuellen Forschung im Zellmodell, beispielsweise beim Mammakarzinom (Khajah et al., 2024), ist aber auch in Kombination mit MCT1- und MCT4-Inhibition bereits oben als vielversprechende Therapieoption erwähnt worden (Pereira-Nunes et al., 2020).

Mögliche Zielstrukturen für die Therapie des Prostatakarzinoms sind also unter anderem GLUT1, MCT4, MCT1 und LDH.

## 4.5 Schlussfolgerungen

Beim Prostatakarzinom sind in der vorliegenden Arbeit einige Korrelationen des AR mit nachgeschalteten Stoffwechselfparametern aufgezeigt worden.

KLK2 und TMPRSS2 sind androgenabhängig regulierte Gene, die neben der tatsächlichen Expressierung von AR die Aktivität des Androgenrezeptors widerspiegeln. Eine höhere Androgenrezeptoraktivität korreliert mit einer gesteigerten Expression von SLC2A1 und damit GLUT1, dem wichtigsten Glukosetransporter. Dieser stellt die primäre Versorgung der Prostatakarzinomzellen mit Glukose sicher.

LDHA und damit der anaerobe Stoffwechsel scheint erst später bei stärker entdifferenzierten Karzinomzellen eine größere Rolle zu spielen und dann unabhängig von AR verstärkt ausgeprägt zu sein.

Die als Indikator für den Stoffwechsel ausgewählten Gene SLC2A1, SLC16A3 und LDHA korrelieren jeweils miteinander, was wiederum durch den hohen Glukoseverbrauch beim anaeroben Stoffwechsel im Sinne des Warburg-Effekts und dem daraus resultierenden und erforderlichen Export von Laktat erklärbar wäre. Durch den Warburg-Effekt wird ausreichend Energie und Substrat für das massive Wachstum bereitgestellt. Das saure Milieu fördert die Invasivität und schützt über das Ion-Trapping vor basischen Chemotherapeutika. Laktat und Pyruvat dienen als Radikalfänger und machen die Tumorzelle widerstandsfähiger gegen Chemo- und Strahlentherapie.

Die Hochregulation von SLC2A1 kann laut Literaturrecherche auch die benachbarten Fibroblasten betreffen, die dann ein Laktat-Shuttle-System aufbauen und so die Karzinomzellen mit zusätzlicher Energie versorgen, was dem reversen Warburg-Effekt entspricht. Dieser werde mutmaßlich durch den Androgenrezeptor, Hypoxie und den dann gebildeten HIF1 gefördert. Für den reversen Warburg-Effekt ist ebenfalls eine verstärkte Expression von SLC2A1, SLC16A1 (in dieser Arbeit nicht untersucht), SLC16A3 und LDHA erforderlich.

TMPRSS2 scheint ein möglicher Marker für Filialisierung zu sein und ist in der Literatur als ein Marker für die Zeit bis zum biochemischen Rezidiv beschrieben.

SLC16A3 scheint mit einer insgesamt invasiveren und höhergradigeren Erkrankung und einer schlechteren Prognose vergesellschaftet zu sein.

Insgesamt könnten diese Ergebnisse dazu beitragen, die zielgerichtete medikamentöse Therapie des Prostatakarzinoms zu verbessern. Die genauen Auswirkungen eines zielgerichteten Eingriffs in die hier untersuchten Energiestoffwechselprozesse müssen weiter erforscht werden. Hierzu zählen insbesondere das Zusammenspiel von AR, KLK2, TMPRSS2, GLUT1, HIF1, MCT1, MCT4 und LDH in Abhängigkeit vom Tumorstadium mit einer größeren Fallzahl und im Zusammenspiel mit den umgebenden Zellen des Stromas. Zusätzlich sollte eine Verifikation der erhaltenen Ergebnisse dieser hier vorliegenden Arbeit auf Proteinebene erfolgen, da von diesen Proben bisher nur die Genebene untersucht wurde. Auch nach der Literaturrecherche scheinen SLC2A1, SLC16A3 und LDHA für die Therapie und LDHA für die Diagnostik vielversprechende Ansätze zu sein.

Einschränkend muss jedoch auf die Plastizität von Tumorzellen und deren ständige Mutation hingewiesen werden, die eine zielgerichtete (Mono-) Therapie erschweren. Als zielführend wird sich eher wieder die Kombination mehrerer Therapieverfahren herausstellen (Cardoso et al., 2021).

## 4.6 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Das Patientenkollektiv ist bereits in Kapitel 3.3 *Prüfung des Kollektivs auf Plausibilität* auf Plausibilität geprüft worden. Einschränkend kann nur das monozentrische Studiendesign und die vergleichsweise geringe Fallzahl mit  $n = 102$  erwähnt werden. Eine Studie mit mehr Teilnehmern aus mehr und auch überregionalen Zentren könnte statistisch signifikantere Ergebnisse für die Grundgesamtheit der Männer aufzeigen, gerade bei dem heterogenen Prostatakarzinom. Dies ist anhand der Ergebnisse der TCGA-Daten ersichtlich, wobei nach Literaturrecherche auch in anderen Teilen der Welt vergleichbare Ergebnisse erzielt worden sind.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde keine Vorauswahl nach Stadien durchgeführt. Es könnten bei höherer Fallzahl und Beschränkung auf low- oder high-Grade Prostatakarzinome weitere Unterschiede des Metabolismus erkennbar sein.

Es wurde für den Einschluss einer Probe in diese Studie ein Befall von mindestens 40% eines repräsentablen Gewebeschnitts gefordert. Eine Interobservervariabilität kann hier ausgeschlossen werden, da sämtliche Schnitte ausschließlich durch Dr. M. Scharpf (Institut für Pathologie, Universitätsklinik Tübingen) befundet wurden. Einschränkend kann hier bei kleineren Karzinomen die Extrapolation auf die angrenzenden Kryo-Frischgewebeproben genannt werden, welches eventuell schon wieder Normalgewebe enthalten haben könnte.

Zusätzlich könnte bei der Probengewinnung und Zerkleinerung des Frischgewebes im Mörser akzidentell angrenzendes Normalgewebe für die Analysen verwendet worden sein.

Hinzu kommt noch die Komplexität der Signalwege. Es könnte durch bisher unbekannte Einflussfaktoren – bspw. auch intraoperativ – zu einem veränderten Stoffwechsel kommen, sodass die dann experimentell nachgewiesene Genexpression nicht mehr der vorher in vivo vorhandenen entspräche.

Bezüglich der teils unterschiedlichen Ergebnisse der hier analysierten Genexpressionen zu den Proteinprodukten in der Literatur sei erwähnt, dass die Genexpressionsregelkreise hoch komplex sind und die Halbwertszeit der mRNA und die der jeweiligen Proteinprodukte teils sehr verschieden sind (Jackson et al., 2000, Mata et al., 2005).

Einschränkend dazu muss aber auch erwähnt werden, dass generell die stoffwechselbezogene mRNA eine hohe Stabilität aufweist (Sharova et al., 2009).

Zusätzlich muss beachtet werden, dass eine Ausprägung auf Genebene nicht zwangsläufig einer Ausprägung auf Proteinebene entspricht, sondern diese durch weitere Einflussfaktoren beeinflusst werden kann. Beispielsweise verändern erhöhte Zink-Spiegel eine Herunterregulierung der AR-Proteinexpression (To et al., 2018).

## 5 Zusammenfassung

Der Androgenrezeptor (AR) hat eine große Bedeutung für das Tumorwachstum des Prostatakarzinoms, die durch die Wirksamkeit der antiandrogenen Therapie und der beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom später vorhandenen eigenständigen Steroidhormonproduktion der Tumorzellen bzw. Mutation des AR unterstrichen wird. Gleichzeitig spielen Veränderungen des Glukosemetabolismus beim Prostatakarzinom eine wichtige Rolle für die Biologie des Tumors.

In dieser vorliegenden Arbeit sollte die Expression und Aktivität des Androgenrezeptors und dessen Einfluss auf Metabolismus-assoziierte Gene untersucht werden.

Hierzu wurden in Prostatakarzinomproben von 102 Patienten die Genexpression des AR sowie die Expression der AR-regulierten Gene KLK2 und TMPRSS2 untersucht und mit der Genexpression von Regulatoren des Glukosemetabolismus (SLC2A1, SLC16A3 und LDHA) korreliert. Die Genexpression dieser Parameter wurde nach Genextraktion aus asserviertem Kryo-Frischgewebe mittels qPCR erfasst. Die erhaltenen Daten wurden mit klinischen Patientendaten und untereinander korreliert. Zur Validierung der eigenexperimentellen Ergebnisse wurden diese mit Daten der TCGA-Datenbank verglichen, um auch mögliche seltenere statistische Zusammenhänge erkennen zu können.

Es zeigte sich eine AR-Abhängigkeit von KLK2, TMPRSS2 und SLC2A1. KLK2 und TMPRSS2 korrelierten ebenfalls positiv mit SLC2A1. TMPRSS2 war Marker für ein invasiveres Wachstum, SLC16A3 zeigte ein invasiveres Wachstum, eine höhere Metastasierungsrate und laut Literatur eine schlechtere Prognose an. SLC2A1, SLC16A3 und LDHA korrelierten positiv miteinander. LDHA war AR-unabhängig erhöht bei stärker entdifferenzierten Zellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine erhöhte AR-Aktivität eine höhere Ausprägung von SLC2A1 bewirkt. Zusätzlich scheinen sowohl der Warburg-Effekt als auch der reverse Warburg-Effekt auch beim Prostatakarzinom Selektions- und Wachstumsvorteile zu bewirken.

Die vorliegenden Daten unterstützen die Hypothese, dass ein Targeting des Glukosemetabolismus zur Ergänzung der antiandrogenen Therapie oder Chemotherapie

sinnvoll sein könnte. Mögliche Zielstrukturen hierfür könnten GLUT1, MCT4 oder auch LDH sein.

Insgesamt ist das genaue Zusammenspiel der AR-abhängigen Gene und des Karzinomenergiestoffwechsels noch nicht vollständig geklärt. Sinnvoll ist sicherlich die weitere Forschung mit KLK2, SLC2A1 oder SLC16A3 als möglichem Therapieansatz, ggf. in Kombination mit Antiandrogenen, Chemo- oder Strahlentherapie. SLC16A3 und LDHA könnten weitere diagnostisch und prognostisch relevante Parameter darstellen.

## 6 Literaturverzeichnis

- AARNINK, R. G., BEERLAGE, H. P., DE LA ROSETTE, J. J., DEBRUYNE, F. M. & WIJKSTRA, H. 1998. Transrectal ultrasound of the prostate: innovations and future applications. *J Urol*, 159, 1568-79.
- ABRAHAMSSON, P. A. 1996. Natürlicher Verlauf des Prostatakarzinoms. *Der Urologe A*, 35, 438-442.
- AL., F. H. E. 2005. *Biochemie des Menschen*, Stuttgart, Thieme Verlag.
- ANCEY, P. B., CONTAT, C. & MEYLAN, E. 2018. Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment. *Febs j*, 285, 2926-2943.
- ANDERSEN, S., SOLSTAD, Ø., MOI, L., DONNEM, T., EILERTSEN, M., NORDBY, Y., NESS, N., RICHARDSEN, E., BUSUND, L. T. & BREMNES, R. M. 2015. Organized metabolic crime in prostate cancer: The coexpression of MCT1 in tumor and MCT4 in stroma is an independent prognosticator for biochemical failure. *Urol Oncol*, 33, 338.e9-17.
- B. HELPAP, W. H. H. 1997. *Prostata*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- BERGES, R. 2008. [Epidemiology of benign prostatic syndrome. Associated risks and management data in German men over age 50]. *Urologe A*, 47, 141-8.
- BIER, S., HENNENLOTTER, J., RAUSCH, S., AUFDERKLAMM, S., MARTZOG, J. C., STENZL, A., SCHWENTNER, C. & TODENHÖFER, T. 2016. Return to Work and Normal Daily Life Activity after Open and Robot-Assisted Radical Prostatectomy--A Single Surgeon Analysis. *Urol Int*, 96, 280-6.
- BOK, R., LEE, J., SRIRAM, R., KESHARI, K., SUKUMAR, S., DANESHMANDI, S., KORENCHAN, D. E., FLAVELL, R. R., VIGNERON, D. B., KURHANEWICZ, J. & SETH, P. 2019. The Role of Lactate Metabolism in Prostate Cancer Progression and Metastases Revealed by Dual-Agent Hyperpolarized (13)C MRSI. *Cancers (Basel)*, 11.

- BONK, S., KLUTH, M., JANSEN, K., HUBE-MAGG, C., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., HÖFLMAYER, D., WEIDEMANN, S., MÖLLER, K., UHLIG, R., BÜSCHECK, F., LUEBKE, A. M., BURANDT, E., CLAUDITZ, T. S., STEURER, S., SCHLOMM, T., HULAND, H., HEINZER, H., SAUTER, G., SIMON, R. & DUM, D. 2020. Reduced KLK2 expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in ERG-negative prostate cancer. *Prostate*, 80, 1097-1107.
- BÖRGERMANN, C., SIEVERDING, M., FORNARA, P., GRAEFEN, M., HAMMERER, P., SEMJONOW, A., SCHRÖDER, F. & RÜBBEN, H. 2006. PSA 2010 - Aufbruch in eine neue Ära der Früherkennung des Prostatakarzinoms. *Der Urologe*, 45:127-133 [Sonderheft], 127-133.
- BÜHLER, P., WOLF, P., KATZENWADEL, A., SCHULTZE-SEEMANN, W., WETTERAUER, U., FREUDENBERG, N. & ELSÄSSER-BEILE, U. 2010. Primary prostate cancer cultures are models for androgen-independent transit amplifying cells. *Oncol Rep*, 23, 465-70.
- CANCER.NET. 2018. *Prostate Cancer: Stages and Grades* [Online]. Available: <https://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/stages-and-grades> [Accessed 31.08.2019].
- CANNISTRACI, A., HASCOET, P., ALI, A., MUNDRA, P., CLARKE, N. W., PAVET, V. & MARAIS, R. 2022. MiR-378a inhibits glucose metabolism by suppressing GLUT1 in prostate cancer. *Oncogene*, 41, 1445-1455.
- CARDOSO, H. J., CARVALHO, T. M. A., FONSECA, L. R. S., FIGUEIRA, M. I., VAZ, C. V. & SOCORRO, S. 2021. Revisiting prostate cancer metabolism: From metabolites to disease and therapy. *Med Res Rev*, 41, 1499-1538.
- CARMELIET, P., DOR, Y., HERBERT, J. M., FUKUMURA, D., BRUSSELMANS, K., DEWERCHIN, M., NEEMAN, M., BONO, F., ABRAMOVITCH, R., MAXWELL, P., KOCH, C. J., RATCLIFFE, P., MOONS, L., JAIN, R. K., COLLEN, D. & KESHERT, E. 1998. Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394, 485-90.

- CENTER, I. K. *Streudiagramme und Punktdiagramme* [Online]. Available: [https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/de/SSLVMB\\_sub/statistics\\_mainhelp\\_ddita/spss/base/chart\\_creation\\_scatterdot.html](https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/de/SSLVMB_sub/statistics_mainhelp_ddita/spss/base/chart_creation_scatterdot.html) [Accessed 21.11.2018].
- CERAMI, E., GAO, J., DOGRUSOZ, U., GROSS, B. E., SUMER, S. O., AKSOY, B. A., JACOBSEN, A., BYRNE, C. J., HEUER, M. L., LARSSON, E., ANTIPIN, Y., REVA, B., GOLDBERG, A. P., SANDER, C. & SCHULTZ, N. 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*, 2, 401-4.
- CHEN, Y. W., LEE, M. S., LUCHT, A., CHOU, F. P., HUANG, W., HAVIGHURST, T. C., KIM, K., WANG, J. K., ANTALIS, T. M., JOHNSON, M. D. & LIN, C. Y. 2010. TMPRSS2, a serine protease expressed in the prostate on the apical surface of luminal epithelial cells and released into semen in prostasomes, is misregulated in prostate cancer cells. *Am J Pathol*, 176, 2986-96.
- CHIU, P. K. F., AHMED, H. U. & RASTINEHAD, A. R. 2022. TRUS Biopsy vs Transperineal Biopsy for Suspicion of Prostate Cancer. *Urology*, 164, 18-20.
- CHOI, S. Y., XUE, H., WU, R., FAZLI, L., LIN, D., COLLINS, C. C., GLEAVE, M. E., GOUT, P. W. & WANG, Y. 2016. The MCT4 Gene: A Novel, Potential Target for Therapy of Advanced Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 22, 2721-33.
- CHOI, S. Y. C., ETTINGER, S. L., LIN, D., XUE, H., CI, X., NABAVI, N., BELL, R. H., MO, F., GOUT, P. W., FLESHNER, N. E., GLEAVE, M. E., COLLINS, C. C. & WANG, Y. 2018. Targeting MCT4 to reduce lactic acid secretion and glycolysis for treatment of neuroendocrine prostate cancer. *Cancer Med*, 7, 3385-92.
- CONSORTIUM, U. 2019. *UniProtKB - Q9Y5K5 (UCHL5\_HUMAN)* [Online]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y5K5> [Accessed].
- CRAWFORD, E. D., SCHELLHAMMER, P. F., MCLEOD, D. G., MOUL, J. W., HIGANO, C. S., SHORE, N., DENIS, L., IVERSEN, P., EISENBERGER, M. A. & LABRIE, F. 2018. Androgen Receptor Targeted Treatments of Prostate Cancer: 35 Years of Progress with Antiandrogens. *J Urol*, 200, 956-966.

- CULIG, Z. & SANTER, F. R. 2014. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 33, 413-27.
- DARSON, M. F., PACELLI, A., ROCHE, P., RITTENHOUSE, H. G., WOLFERT, R. L., YOUNG, C. Y., KLEE, G. G., TINDALL, D. J. & BOSTWICK, D. G. 1997. Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. *Urology*, 49, 857-62.
- DYSHLOVOY, S. A., PELAGEEV, D. N., HAUSCHILD, J., BORISOVA, K. L., KAUNE, M., KRISP, C., VENZ, S., SABUTSKII, Y. E., KHMELEVSKAYA, E. A., BUSENBENDER, T., DENISENKO, V. A., POKHILO, N. D., ATOPKINA, L. N., GRAEFEN, M., SCHLÜTER, H., STONIK, V. A., BOKEMEYER, C., ANUFRIEV, V. P. & VON AMSBERG, G. 2019. Successful Targeting of the Warburg Effect in Prostate Cancer by Glucose-Conjugated 1,4-Naphthoquinones. *Cancers (Basel)*, 11.
- EBERMANN, E. 2010. *Nachweis der Normalverteilung: Kolmogorov-Smirnov-Test* [Online]. Available: <https://www.univie.ac.at/ksa/elearning/cp/quantitative/quantitative-61.html> [Accessed 2022].
- EDEMIR, B. 2020. Identification of Prognostic Organic Cation and Anion Transporters in Different Cancer Entities by In Silico Analysis. *Int J Mol Sci*, 21.
- EIDELMAN, E., TWUM-AMPOFO, J., ANSARI, J. & SIDDIQUI, M. M. 2017. The Metabolic Phenotype of Prostate Cancer. *Front Oncol*, 7, 131.
- EMONDS, K. M., SWINNEN, J. V., VAN WEERDEN, W. M., VANDERHOYDONC, F., NUYTS, J., MORTELMANS, L. & MOTTAGHY, F. M. 2011. Do androgens control the uptake of 18F-FDG, 11C-choline and 11C-acetate in human prostate cancer cell lines? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38, 1842-53.
- EPSTEIN, J. I., EGEVAD, L., AMIN, M., DELAHUNT, B., SRIGLEY, J. R., HUMPHREY, P. A., AL HUSSAIN, T., ALGABA, F., ARON, M., BERMAN, D., BERNEY, D., BRIMO, F., CAO, D., CHEVILLE, J., CLOUSTON, D.,

- COLECCHIA, M., COMPÉRAT, E., CUNHA, I., DE MARZO, A. & RODRIGUES, G. 2016. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *American Journal of Surgical Pathology*, 40, 244-52.
- FIASCHI, T., MARINI, A., GIANNONI, E., TADDEI, M. L., GANDELLINI, P., DE DONATIS, A., LANCIOTTI, M., SERNI, S., CIRRI, P. & CHIARUGI, P. 2012. Reciprocal metabolic reprogramming through lactate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay. *Cancer Res*, 72, 5130-40.
- FOUNDATION, P. C. 2019. *Risk Groups and Prostate Cancer* [Online]. Available: <https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/diagnosis-staging-prostate-cancer/risk-groups/> [Accessed 31.08.2019].
- FRANKLIN, R. B. & COSTELLO, L. C. 2007. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Arch Biochem Biophys*, 463, 211-7.
- FUJITA, K. & NONOMURA, N. 2019. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health*, 37, 288-295.
- GAMAT, M. & MCNEEL, D. G. 2017. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 24, T297-t310.
- GANDAGLIA, G., MONTORSI, F., KARAKIEWICZ, P. I. & SUN, M. 2015. Robot-assisted radical prostatectomy in prostate cancer. *Future Oncol*, 11, 2767-73.
- GAO, J., AKSOY, B. A., DOGRUSOZ, U., DRESDNER, G., GROSS, B., SUMER, S. O., SUN, Y., JACOBSEN, A., SINHA, R., LARSSON, E., CERAMI, E., SANDER, C. & SCHULTZ, N. 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 6, pl1.
- GARLAPATI, C., JOSHI, S., TURAGA, R. C., MISHRA, M., REID, M. D., KAPOOR, S., ARTINIAN, L., REHDER, V. & ANEJA, R. 2021. Monoethanolamine-induced

glucose deprivation promotes apoptosis through metabolic rewiring in prostate cancer. *Theranostics*, 11, 9089-9106.

GASSER, T. 2019. *Basiswissen Urologie*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

GATENBY, R. A., GAWLINSKI, E. T., GMITRO, A. F., KAYLOR, B. & GILLIES, R. J. 2006. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res*, 66, 5216-23.

GATENBY, R. A. & GILLIES, R. J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 4, 891-9.

GENECARDS. 2019a. *HPRT1 Gene* [Online]. Weizmann Institute of Science. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HPRT1> [Accessed 21.11.2018].

GENECARDS. 2019b. *LDHA Gene* [Online]. Weizmann Institute of Science. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LDHA&keywords=ldha> [Accessed 2019].

GENECARDS. 2019c. *SLC2A1 Gene* [Online]. Weizmann Institute of Science. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC2A1&keywords=slc2a1> [Accessed 2019].

GENECARDS. 2019d. *SLC16A3 Gene* [Online]. Weizmann Institute of Science. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC16A3> [Accessed 2019].

GENECARDS. 2019e. *TMPRSS2 Gene* [Online]. Weizmann Institute of Science. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TMPRSS2> [Accessed 09.12.2019].

GENECARDS. 2019f. *UCHL5 Gene (Protein Coding)* [Online]. Weizmann Institute of Science. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=UCHL5> [Accessed 21.11.2018].

- GILLATT, D. 2006. Antiandrogen treatments in locally advanced prostate cancer: are they all the same? *J Cancer Res Clin Oncol*, 132 Suppl 1, S17-26.
- GILLIES, R. J., RAGHUNAND, N., KARCZMAR, G. S. & BHUJWALLA, Z. M. 2002. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging*, 16, 430-50.
- GONZALEZ-MENENDEZ, P., HEVIA, D., ALONSO-ARIAS, R., ALVAREZ-ARTIME, A., RODRIGUEZ-GARCIA, A., KINET, S., GONZALEZ-POLA, I., TAYLOR, N., MAYO, J. C. & SAINZ, R. M. 2018a. GLUT1 protects prostate cancer cells from glucose deprivation-induced oxidative stress. *Redox Biol*, 17, 112-127.
- GONZALEZ-MENENDEZ, P., HEVIA, D., MAYO, J. C. & SAINZ, R. M. 2018b. The dark side of glucose transporters in prostate cancer: Are they a new feature to characterize carcinomas? *Int J Cancer*, 142, 2414-2424.
- HABER, R. S., RATHAN, A., WEISER, K. R., PRITSKER, A., ITZKOWITZ, S. H., BODIAN, C., SLATER, G., WEISS, A. & BURSTEIN, D. E. 1998. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer*, 83, 34-40.
- HENI, M., HENNENLOTTER, J., SCHARPF, M., LUTZ, S. Z., SCHWENTNER, C., TODENHÖFER, T., SCHILLING, D., KÜHS, U., GERBER, V., MACHICAO, F., STAIGER, H., HÄRING, H. U. & STENZL, A. 2012. Insulin receptor isoforms A and B as well as insulin receptor substrates-1 and -2 are differentially expressed in prostate cancer. *PLoS One*, 7, e50953.
- HIREMATH, S. A., SURULESCU, C., JAMALI, S., AMES, S., DEITMER, J. W. & BECKER, H. M. 2018. Modeling of pH regulation in tumor cells: Direct interaction between proton-coupled lactate transporters and cancer-associated carbonic anhydrase. *Math Biosci Eng*, 16, 320-337.
- HUGGINS, C., STEVENS, R. E., JR. & HODGES, C. V. 1941. STUDIES ON PROSTATIC CANCER: II. THE EFFECTS OF CASTRATION ON ADVANCED CARCINOMA OF THE PROSTATE GLAND. *Archives of Surgery*, 43, 209-223.

INSTITUT, R. K. 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 40-43.

INSTITUTE, N. C. *The Cancer Genome Atlas Program* [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga> [Accessed 31.08.2019].

INSTITUTE, N. C. *NCI Dictionary of Cancer Terms: TCGA* [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tcga> [Accessed 31.08.2019].

ISMAIL, M. T. & GOMELLA, L. G. 2013. Transrectal prostate biopsy. *Urol Clin North Am*, 40, 457-72.

JACKSON, D. A., POMBO, A. & IBORRA, F. 2000. The balance sheet for transcription: an analysis of nuclear RNA metabolism in mammalian cells. *Faseb j*, 14, 242-54.

JANS, J., VAN DIJK, J. H., VAN SCHELVEN, S., VAN DER GROEP, P., WILLEMS, S. H., JONGES, T. N., VAN DIEST, P. J. & BOSCH, J. L. 2010. Expression and localization of hypoxia proteins in prostate cancer: prognostic implications after radical prostatectomy. *Urology*, 75, 786-92.

KAPOOR, K., FINER-MOORE, J. S., PEDERSEN, B. P., CABONI, L., WAIGHT, A., HILLIG, R. C., BRINGMANN, P., HEISLER, I., MULLER, T., SIEBENEICHER, H. & STROUD, R. M. 2016. Mechanism of inhibition of human glucose transporter GLUT1 is conserved between cytochalasin B and phenylalanine amides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 4711-6.

KHAJAH, M. A., KHUSHAISH, S. & LUQMANI, Y. A. 2024. The effect of lactate dehydrogenase inhibitors on proliferation, motility and invasion of breast cancer cells in vitro highlights a new role for lactate. *Mol Med Rep*, 29.

KIM, H. S., PRESTI, J. C., JR., ARONSON, W. J., TERRIS, M. K., KANE, C. J., AMLING, C. L. & FREEDLAND, S. J. 2010. Glycemic control and prostate cancer progression: results from the SEARCH database. *Prostate*, 70, 1540-6.

- KIRSCHENBAUM, A., LIU, X. H., YAO, S., NARLA, G., FRIEDMAN, S. L., MARTIGNETTI, J. A. & LEVINE, A. C. 2006. Sex steroids have differential effects on growth and gene expression in primary human prostatic epithelial cell cultures derived from the peripheral versus transition zones. *Carcinogenesis*, 27, 216-24.
- KO, C. J., HUANG, C. C., LIN, H. Y., JUAN, C. P., LAN, S. W., SHYU, H. Y., WU, S. R., HSIAO, P. W., HUANG, H. P., SHUN, C. T. & LEE, M. S. 2015. Androgen-Induced TMPRSS2 Activates Matriptase and Promotes Extracellular Matrix Degradation, Prostate Cancer Cell Invasion, Tumor Growth, and Metastasis. *Cancer Res*, 75, 2949-60.
- KOULIKOV, D., MAMBER, A., FRIDMANS, A., ABU ARAFEH, W. & SHENFELD, O. Z. 2012. Why I cannot find the prostate? Behind the subjectivity of rectal exam. *ISRN Urol*, 2012, 456821.
- KRETSCHMER, A. & TILKI, D. 2017. Biomarkers in prostate cancer - Current clinical utility and future perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*, 120, 180-193.
- KRETSCHMER, A. & TODENHÖFER, T. 2020. [Systemic treatment of advanced prostate cancer]. *Urologe A*, 59, 1565-1576.
- KRISTIANSEN, G. 2012. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. *Histopathology*, 60, 125-41.
- LADEROUTE, K. R., AMIN, K., CALAOAGAN, J. M., KNAPP, M., LE, T., ORDUNA, J., FORETZ, M. & VIOLLET, B. 2006. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol*, 26, 5336-47.
- LAI, J., AN, J., NELSON, C. C., LEHMAN, M. L., BATRA, J. & CLEMENTS, J. A. 2014. Analysis of androgen and anti-androgen regulation of KLK-related peptidase 2, 3, and 4 alternative transcripts in prostate cancer. *Biol Chem*, 395, 1127-32.

- LAKES, J. & ARSOV, C. 2019. [PSA screening and molecular markers]. *Urologe A*, 58, 486-493.
- LEE, C. H., TAN, T. W. & TAN, C. H. 2021. Multiparametric MRI in Active Surveillance of Prostate Cancer: An Overview and a Practical Approach. *Korean J Radiol*, 22, 1087-1099.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF) 2019. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 5.1.
- LIU, T., HAN, S., YAO, Y. & ZHANG, G. 2023. Role of Human Monocarboxylate Transporter 1 (hMCT1) and 4 (hMCT4) in Tumor Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Manag Res*, 15, 957-975.
- LONERGAN, P. E. & TINDALL, D. J. 2011. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog*, 10, 20.
- LOVELL, S., ZHANG, L., KRYZA, T., NEODO, A., BOCK, N., DE VITA, E., WILLIAMS, E. D., ENGELSBERGER, E., XU, C., BAKKER, A. T., MANEIRO, M., TANAKA, R. J., BEVAN, C. L., CLEMENTS, J. A. & TATE, E. W. 2021. A Suite of Activity-Based Probes To Dissect the KLK Activome in Drug-Resistant Prostate Cancer. *J Am Chem Soc*, 143, 8911-8924.
- LUNGER, L., RETZ, M., BANDUR, M., SOUCHAY, M., VITZTHUM, E., JÄGER, M., WEIRICH, G., SCHUSTER, T., AUTENRIETH, M., KÜBLER, H., MAURER, T., THALGOTT, M., HERKOMMER, K., KOLL, F., GSCHWEND, J. E., NAWROTH, R. & HECK, M. M. 2021. KLK3 and TMPRSS2 for molecular lymph-node staging in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 24, 362-369.
- LUTZ, S. Z., HENNENLOTTER, J., SCHARPF, M. O., SAILER, C., FRITSCHKE, L., SCHMID, V., KANTARTZIS, K., WAGNER, R., LEHMANN, R., BERTI, L., PETER, A., STAIGER, H., FRITSCHKE, A., FEND, F., TODENHOFER, T.,

- STENZL, A., HARING, H. U. & HENI, M. 2018a. Androgen receptor overexpression in prostate cancer in type 2 diabetes. *Mol Metab*, 8, 158-166.
- LUTZ, S. Z., TODENHÖFER, T., WAGNER, R., HENNENLOTTER, J., FERCHL, J. M., SCHARPF, M. O., MARTUS, P., STAIGER, H., FRITSCHKE, A., STENZL, A., HÄRING, H. U. & HENI, M. 2018b. Higher prevalence of lymph node metastasis in prostate cancer in patients with diabetes. *Endocr Relat Cancer*, 25, L19-L22.
- LV, Z., WANG, J., WANG, M., HOU, H., SONG, L., LI, H., WANG, X. & LIU, M. 2023. Is it necessary for all patients with suspicious lesions undergo systematic biopsy in the era of MRI-TRUS fusion targeted biopsy? *Int Braz J Urol*, 49, 359-371.
- MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E., LISANTI, M. P. & SOTGIA, F. 2014. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin Cancer Biol*, 25, 47-60.
- MARTINS, A. D., ALVES, M. G., SIMÕES, V. L., DIAS, T. R., RATO, L., MOREIRA, P. I., SOCORRO, S., CAVACO, J. E. & OLIVEIRA, P. F. 2013. Control of Sertoli cell metabolism by sex steroid hormones is mediated through modulation in glycolysis-related transporters and enzymes. *Cell Tissue Res*, 354, 861-8.
- MASSIE, C. E., LYNCH, A., RAMOS-MONTOYA, A., BOREN, J., STARK, R., FAZLI, L., WARREN, A., SCOTT, H., MADHU, B., SHARMA, N., BON, H., ZECCHINI, V., SMITH, D. M., DENICOLA, G. M., MATHEWS, N., OSBORNE, M., HADFIELD, J., MACARTHUR, S., ADRYAN, B., LYONS, S. K., BRINDLE, K. M., GRIFFITHS, J., GLEAVE, M. E., RENNIE, P. S., NEAL, D. E. & MILLS, I. G. 2011. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *Embo j*, 30, 2719-33.
- MATA, J., MARGUERAT, S. & BÄHLER, J. 2005. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci*, 30, 506-14.
- MEDICINE, U. S. N. L. O. 2019a. AR gene, Androgen receptor. *Genetics Home Reference*.

- MEDICINE, U. S. N. L. O. 2019b. HPRT1 gene, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1. *Genetics Home Reference*.
- MEDICINE, U. S. N. L. O. 2019c. *KLK2 kallikrein related peptidase 2 [ Homo sapiens (human) ]* [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3817> [Accessed 09.12.2019].
- MEZIOU, S., RINGUETTE GOULET, C., HOVINGTON, H., LEFEBVRE, V., LAVALLÉE, É., BERGERON, M., BRISSON, H., CHAMPAGNE, A., NEVEU, B., LACOMBE, D., BEAUREGARD, J. M., BUTEAU, F. A., RIOPEL, J. & POULIOT, F. 2020. GLUT1 expression in high-risk prostate cancer: correlation with (18)F-FDG-PET/CT and clinical outcome. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 23, 441-448.
- MOCHIZUKI, T., TSUKAMOTO, E., KUGE, Y., KANEGAE, K., ZHAO, S., HIKOSAKA, K., HOSOKAWA, M., KOHANAWA, M. & TAMAKI, N. 2001. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. *J Nucl Med*, 42, 1551-5.
- MORENO-ACOSTA, P., VALLARD, A., CARRILLO, S., GAMBOA, O., ROMERO-ROJAS, A., MOLANO, M., ACOSTA, J., MAYORGA, D., RANCOULE, C., GARCIA, M. A., COTES MESTRE, M. & MAGNÉ, N. 2017. Biomarkers of resistance to radiation therapy: a prospective study in cervical carcinoma. *Radiat Oncol*, 12, 120.
- MURTHA, P., TINDALL, D. J. & YOUNG, C. Y. 1993. Androgen induction of a human prostate-specific kallikrein, hKLK2: characterization of an androgen response element in the 5' promoter region of the gene. *Biochemistry*, 32, 6459-64.
- NADAI, T., NARUMI, K., MUKAI, Y., UEDA, H., FURUGEN, A., SAITO, Y. & KOBAYASHI, M. 2023. 5-Oxoproline Enhances 4-Hydroxytamoxifen-induced Cytotoxicity by Increasing Oxidative Stress in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Anticancer Res*, 43, 1113-1120.

- NAKANISHI, K., TANAKA, J., NAKAYA, Y., MAEDA, N., SAKAMOTO, A., NAKAYAMA, A., SATOMURA, H., SAKAI, M., KONISHI, K., YAMAMOTO, Y., NAGAHARA, A., NISHIMURA, K., TAKENAKA, S. & TOMIYAMA, N. 2022. Whole-body MRI: detecting bone metastases from prostate cancer. *Jpn J Radiol*, 40, 229-244.
- NAWROT-HADZIK, I., MATKOWSKI, A., FAST, M. & CHOROMAŃSKA, A. 2023. The combination of pro-oxidative acting vanicosides and GLUT1 inhibitor (WZB117) exerts a synergistic cytotoxic effect against melanoma cells. *Fitoterapia*, 171, 105702.
- NGUYEN-NIELSEN, M. & BORRE, M. 2016. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. *Semin Nucl Med*, 46, 484-490.
- OCAÑA, M. C., MARTÍNEZ-POVEDA, B., MARÍ-BEFFA, M., QUESADA, A. R. & MEDINA, M. 2020. Fasentin diminishes endothelial cell proliferation, differentiation and invasion in a glucose metabolism-independent manner. *Sci Rep*, 10, 6132.
- OGAWA, J., INOUE, H. & KOIDE, S. 1997. Glucose-transporter-type-I-gene amplification correlates with sialyl-Lewis-X synthesis and proliferation in lung cancer. *Int J Cancer*, 74, 189-92.
- PARK, D. H. & YU, J. H. 2023. Prostate-specific antigen density as the best predictor of low- to intermediate-risk prostate cancer: a cohort study. *Transl Cancer Res*, 12, 502-514.
- PAVLIDES, S., WHITAKER-MENEZES, D., CASTELLO-CROS, R., FLOMENBERG, N., WITKIEWICZ, A. K., FRANK, P. G., CASIMIRO, M. C., WANG, C., FORTINA, P., ADDYA, S., PESTELL, R. G., MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E., SOTGIA, F. & LISANTI, M. P. 2009. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, 8, 3984-4001.

- PEREIRA-NUNES, A., SIMÕES-SOUSA, S., PINHEIRO, C., MIRANDA-GONÇALVES, V., GRANJA, S. & BALTAZAR, F. 2020. Targeting lactate production and efflux in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866, 165894.
- PÉRTEGA-GOMES, N., VIZCAÍNO, J. R., ATTIG, J., JURMEISTER, S., LOPES, C. & BALTAZAR, F. 2014. A lactate shuttle system between tumour and stromal cells is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer*, 14, 352.
- PÉRTEGA-GOMES, N., VIZCAÍNO, J. R., MIRANDA-GONÇALVES, V., PINHEIRO, C., SILVA, J., PEREIRA, H., MONTEIRO, P., HENRIQUE, R. M., REIS, R. M., LOPES, C. & BALTAZAR, F. 2011. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer*, 11, 312.
- PINHEIRO, C., LONGATTO-FILHO, A., AZEVEDO-SILVA, J., CASAL, M., SCHMITT, F. C. & BALTAZAR, F. 2012. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr*, 44, 127-39.
- PLISZKA, M. & SZABLEWSKI, L. 2021. Glucose Transporters as a Target for Anticancer Therapy. *Cancers (Basel)*, 13.
- POONPRASARTPORN, A., XIAO, J. & CHAN, K. L. A. 2024. A study of WZB117 as a competitive inhibitor of glucose transporter in high glucose treated PANC-1 cells by live-cell FTIR spectroscopy. *Talanta*, 266, 125031.
- PREL, J.-B. D. R., BERND; HOMMEL, GERHARD; BLETNER, MARIA 2010. Choosing Statistical Tests—Part 12 of a Series on Evaluation of Scientific Publikations. *Dtsch Arztebl Int*, 107, 343–8.
- RECKZEH, E. S. & WALDMANN, H. 2020. Small-Molecule Inhibition of Glucose Transporters GLUT-1-4. *Chembiochem*, 21, 45-52.
- SANITÀ, P., CAPULLI, M., TETI, A., GALATIOTO, G. P., VICENTINI, C., CHIARUGI, P., BOLOGNA, M. & ANGELUCCI, A. 2014. Tumor-stroma metabolic

- relationship based on lactate shuttle can sustain prostate cancer progression. *BMC Cancer*, 14, 154.
- SCHLOMM, T. & SAUTER, G. 2016. Beurteilung des Prostatakarzinoms: Gleason-Score – Status 2016. *Dtsch Arztebl International*, 113, -14-.
- SCHWENTNER, C. 2019. Apalutamid: Eine neue Option für die Therapie des Hochrisiko-M0CRPC. *Oncol Res Treat*, 42 Suppl 2, 4-6.
- SCIARRA, A., CARDI, A. & DI SILVERIO, F. 2004. Antiandrogen monotherapy: recommendations for the treatment of prostate cancer. *Urol Int*, 72, 91-8.
- SCIENTIFIC, T. F. *Efficiency of Real-Time PCR* [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/efficiency-real-time-pcr-qpcr.html> [Accessed 05.09.2019].
- SHANG, Z., NIU, Y., CAI, Q., CHEN, J., TIAN, J., YEH, S., LAI, K.-P. & CHANG, C. 2014a. Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation. *Tumor Biology*, 35, 1881-1890.
- SHANG, Z., NIU, Y., CAI, Q., CHEN, J., TIAN, J., YEH, S., LAI, K. P. & CHANG, C. 2014b. Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation. *Tumour Biol*, 35, 1881-90.
- SHAPIRO, S., WILK, MB 1965. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*, 52, 591-611.
- SHARIAT, S. F., GOTTENGER, E., NGUYEN, C., SONG, W., KATTAN, M. W., ANDENORO, J., WHEELER, T. M., SPENCER, D. M. & SLAWIN, K. M. 2002. Preoperative blood reverse transcriptase-PCR assays for prostate-specific antigen and human glandular kallikrein for prediction of prostate cancer progression after radical prostatectomy. *Cancer Res*, 62, 5974-9.

- SHAROVA, L. V., SHAROV, A. A., NEDOREZOV, T., PIAO, Y., SHAIK, N. & KO, M. S. 2009. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res*, 16, 45-58.
- SIKARIS, K. 2012. Prostate cancer screening. *Pathology*, 44, 99-109.
- SINGH, M., AFONSO, J., SHARMA, D., GUPTA, R., KUMAR, V., RANI, R., BALTAZAR, F. & KUMAR, V. 2023. Targeting monocarboxylate transporters (MCTs) in cancer: How close are we to the clinics? *Semin Cancer Biol*, 90, 1-14.
- SLAWIN, K. M., SHARIAT, S. F., NGUYEN, C., LEVENTIS, A. K., SONG, W., KATTAN, M. W., YOUNG, C. Y., TINDALL, D. J. & WHEELER, T. M. 2000. Detection of metastatic prostate cancer using a splice variant-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for human glandular kallikrein. *Cancer Res*, 60, 7142-8.
- SMEENGE, M., BARENTSZ, J., COSGROVE, D., DE LA ROSETTE, J., DE REIJKE, T., EGGNER, S., FRAUSCHER, F., KOVACS, G., MATIN, S. F., MISCHI, M., PINTO, P., RASTINEHAD, A., ROUVIERE, O., SALOMON, G., POLASCIOK, T., WALZ, J., WIJKSTRA, H. & MARBERGER, M. 2012. Role of transrectal ultrasonography (TRUS) in focal therapy of prostate cancer: report from a Consensus Panel. *BJU Int*, 110, 942-8.
- SOBHANI, N., NEELI, P. K., D'ANGELO, A., PITTACOLO, M., SIRICO, M., GALLI, I. C., ROVIELLO, G. & NESI, G. 2021. AR-V7 in Metastatic Prostate Cancer: A Strategy beyond Redemption. *Int J Mol Sci*, 22.
- SONVEAUX, P., VÉGRAN, F., SCHROEDER, T., WERGIN, M. C., VERRAX, J., RABBANI, Z. N., DE SAEDELEER, C. J., KENNEDY, K. M., DIEPART, C., JORDAN, B. F., KELLEY, M. J., GALLEZ, B., WAHL, M. L., FERON, O. & DEWHIRST, M. W. 2008. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 3930-3942.

- SRIDHARAN, K. & SIVARAMAKRISHNAN, G. 2018. Prostatectomies for localized prostate cancer: a mixed comparison network and cumulative meta-analysis. *J Robot Surg*, 12, 633-639.
- SRIRAM, R., VAN CRIEKINGE, M., DELOS SANTOS, J., AHAMED, F., QIN, H., NOLLEY, R., SANTOS, R. D., TABATABAI, Z. L., BOK, R. A., KESHARI, K. R., VIGNERON, D. B., PEEHL, D. M. & KURHANEWICZ, J. 2020. Elevated Tumor Lactate and Efflux in High-grade Prostate Cancer demonstrated by Hyperpolarized (<sup>13</sup>C) Magnetic Resonance Spectroscopy of Prostate Tissue Slice Cultures. *Cancers (Basel)*, 12.
- STENZL, A. 2009. Pelvic neuroanatomy and recovery of potency. *Eur Urol*, 55, 284-6.
- SUN, Q., HU, L. L. & FU, Q. 2019a. MCT4 promotes cell proliferation and invasion of castration-resistant prostate cancer PC-3 cell line. *Excli j*, 18, 187-194.
- SUN, Y., REYNOLDS, H. M., PARAMESWARAN, B., WRAITH, D., FINNEGAN, M. E., WILLIAMS, S. & HAWORTH, A. 2019b. Multiparametric MRI and radiomics in prostate cancer: a review. *Australas Phys Eng Sci Med*, 42, 3-25.
- TO, P. K., DO, M. H., CHO, Y. S., KWON, S. Y., KIM, M. S. & JUNG, C. 2018. Zinc Inhibits Expression of Androgen Receptor to Suppress Growth of Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 19.
- TODENHÖFER, T., AZAD, A., STEWART, C., GAO, J., EIGL, B. J., GLEAVE, M. E., JOSHUA, A. M., BLACK, P. C. & CHI, K. N. 2017. AR-V7 Transcripts in Whole Blood RNA of Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer Correlate with Response to Abiraterone Acetate. *J Urol*, 197, 135-142.
- TODENHÖFER, T., SEILER, R., STEWART, C., MOSKALEV, I., GAO, J., LADHAR, S., KAMJABI, A., AL NAKOUZI, N., HAYASHI, T., CHOI, S., WANG, Y., FREES, S., DAUGAARD, M., OO, H. Z., FISEL, P., SCHWAB, M., SCHAEFFELER, E., DOUGLAS, J., HENNENLOTTER, J., BEDKE, J., GIBB, E. A., FAZLI, L., STENZL, A. & BLACK, P. C. 2018. Selective Inhibition of the

- Lactate Transporter MCT4 Reduces Growth of Invasive Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther*, 17, 2746-2755.
- TOPTIPBIO.COM. *How To Perform The Delta-Delta Ct Method* [Online]. Available: <https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/> [Accessed 21.11.2018].
- TSAUR, I., RENNINGER, M., HENNENLOTTER, J., OPPERMAN, E., MUNZ, M., KUEHS, U., STENZL, A. & SCHILLING, D. 2013. Reliable housekeeping gene combination for quantitative PCR of lymph nodes in patients with prostate cancer. *Anticancer Res*, 33, 5243-8.
- UNIPROT. *UniProtKB-Q9Y5K5 (UCHL5\_HUMAN)* [Online]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y5K5> [Accessed 21.11.2018].
- UNTERGASSER, G., MADERSBACHER, S. & BERGER, P. 2005. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol*, 40, 121-8.
- VANDER GRIEND, D. J., ANTONY, L., DALRYMPLE, S. L., XU, Y., CHRISTENSEN, S. B., DENMEADE, S. R. & ISAACS, J. T. 2009. Amino acid containing thapsigargin analogues deplete androgen receptor protein via synthesis inhibition and induce the death of prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 8, 1340-9.
- VAUPEL, P. & MULTHOFF, G. 2021. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol*, 599, 1745-1757.
- VAZ, C. V., ALVES, M. G., MARQUES, R., MOREIRA, P. I., OLIVEIRA, P. F., MAIA, C. J. & SOCORRO, S. 2012. Androgen-responsive and nonresponsive prostate cancer cells present a distinct glycolytic metabolism profile. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 2077-84.
- VAZ, C. V., MARQUES, R., ALVES, M. G., OLIVEIRA, P. F., CAVACO, J. E., MAIA, C. J. & SOCORRO, S. 2016. Androgens enhance the glycolytic metabolism and lactate export in prostate cancer cells by modulating the expression of GLUT1, GLUT3, PFK, LDH and MCT4 genes. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142, 5-16.

- WADOSKY, K. M., SHOURIDEH, M., GOODRICH, D. W. & KOOCHEKPOUR, S. 2019. Riluzole induces AR degradation via endoplasmic reticulum stress pathway in androgen-dependent and castration-resistant prostate cancer cells. *Prostate*, 79, 140-150.
- WANG, J., XU, W., WANG, B., LIN, G., WEI, Y., ABUDUREXITI, M., ZHU, W., LIU, C., QIN, X., DAI, B., WAN, F., ZHANG, H., ZHU, Y. & YE, D. 2020. GLUT1 is an AR target contributing to tumor growth and glycolysis in castration-resistant and enzalutamide-resistant prostate cancers. *Cancer Lett*, 485, 45-55.
- WANG, M. C., VALENZUELA, L. A., MURPHY, G. P. & CHU, T. M. 2017. Purification of a Human Prostate Specific Antigen. *J Urol*, 197, S148-s152.
- WARBURG, O., GAWEHN, K., GEISLER, A. W., SCHRODER, W., GEWITZ, H. S. & VOLKER, W. 1958. [Partial anaerobiosis and radiation-sensitivity of cancer cells]. *Arch Biochem Biophys*, 78, 573-86.
- WEIGAND, C. 2009. Zentraler Grenzwertsatz. *Statistik mit und ohne Zufall: Eine anwendungsorientierte Einführung*. Heidelberg: Physica-Verlag HD.
- WILLIAMS, S. A., XU, Y., DE MARZO, A. M., ISAACS, J. T. & DENMEADE, S. R. 2010. Prostate-specific antigen (PSA) is activated by KLK2 in prostate cancer ex vivo models and in prostate-targeted PSA/KLK2 double transgenic mice. *Prostate*, 70, 788-96.
- WINTER, J., KUNZE, R., VEIT, N., KUERPIG, S., MEISENHEIMER, M., KRAUS, D., GLASSMANN, A. & PROBSTMEIER, R. 2023. Targeting of Glucose Transport and the NAD Pathway in Neuroendocrine Tumor (NET) Cells Reveals New Treatment Options. *Cancers (Basel)*, 15.
- WOOD, T. E., DALILI, S., SIMPSON, C. D., HURREN, R., MAO, X., SAIZ, F. S., GRONDA, M., EBERHARD, Y., MINDEN, M. D., BILAN, P. J., KLIP, A., BATEY, R. A. & SCHIMMER, A. D. 2008. A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death. *Mol Cancer Ther*, 7, 3546-55.

- XIAN, Z. Y., LIU, J. M., CHEN, Q. K., CHEN, H. Z., YE, C. J., XUE, J., YANG, H. Q., LI, J. L., LIU, X. F. & KUANG, S. J. 2015. Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. *Tumour Biol*, 36, 8093-100.
- XIAO, H., WANG, J., YAN, W., CUI, Y., CHEN, Z., GAO, X., WEN, X. & CHEN, J. 2018. GLUT1 regulates cell glycolysis and proliferation in prostate cancer. *Prostate*, 78, 86-94.
- XIE, W., GUO, H., ZHANG, J., HU, L., WU, Y. & WANG, X. 2021. Comprehensive Analysis of the Relationship Between Metabolic Reprogramming and Immune Function in Prostate Cancer. *Onco Targets Ther*, 14, 3251-3266.
- YI, H., HAN, Y., LI, Q., LIN, R., ZHANG, J., YANG, Y., WANG, X. & ZHANG, L. 2023. Prognostic impact of the combination of HIF-1 $\alpha$  and GLUT1 in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, 26, 404.
- YOUNES, M., BROWN, R. W., MODY, D. R., FERNANDEZ, L. & LAUCIRICA, R. 1995. GLUT1 expression in human breast carcinoma: correlation with known prognostic markers. *Anticancer Res*, 15, 2895-8.
- ZHAO, H., MA, T. F., LIN, J., LIU, L. L., SUN, W. J., GUO, L. X., WANG, S. Q., OTECKO, N. O. & ZHANG, Y. P. 2018. Identification of valid reference genes for mRNA and microRNA normalisation in prostate cancer cell lines. *Sci Rep*, 8, 1949.
- ZÜRICH, U. 2018. *Methodenberatung - t-Test für abhängige Stichproben* [Online]. Available: [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/unterschiede/zentral/ttestabh.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/ttestabh.html) [Accessed].
- ZÜRICH, U. 2019. *Methodenberatung: t-Test für unabhängige Stichproben* [Online]. Available: [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss/unterschiede/zentral/ttestunabh.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/unterschiede/zentral/ttestunabh.html) [Accessed 09.12.2019].

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Einfluss des Androgenrezeptors auf Metabolismus-assoziierte Gene von Prostatakarzinomzellen“

selbstständig verfasst und sämtliche wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen und Quellen und verwendete Hilfsmittel entsprechend gekennzeichnet habe.

Die Konzeption der vorliegenden Arbeit entstand unter Leitung des ärztlichen Direktors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen Professor Dr. I. Tsauro in Zusammenarbeit mit meinem habilitierten Betreuer Prof. Dr. Tilman Todenhöfer aus der Studienpraxis Urologie in Nürtingen und dem Leiter des wissenschaftlichen Labors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen, Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter, welcher als wissenschaftlicher Betreuer fungierte.

Bei der Organisation der Frischgewebeproben half mir Ursula Kühs. Sie half mir ebenfalls zu Beginn durch Anleitung bei der Herstellung und Färbung der Gewebeschnitte zur histologischen Auswertung. Die histologische Auswertung zur Bestimmung der Histologie am Ort wurde ausschließlich von Dr. Marcus Scharpf durchgeführt.

Bei der RNA-Isolierung, dem cDNA-Umschrieb, sowie der PCR hat mich Carmen Wandel angeleitet und zu Beginn auch tatkräftig unterstützt.

Bei dem Download der passenden Daten aus der TCGA-Datenbank unterstützte mich Prof. Dr. Tilman Todenhöfer.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse geschah gemeinsam mit Prof. Dr. Todenhöfer und Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Kuppington, den

Hendrik Bührmann

## 8 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. I. Tsauro, der mir neben dem Thema auch die Mittel und den Arbeitsplatz überließ.

Herrn Professor Dr. med. T. Todenhöfer danke ich für die gute Zusammenarbeit während der Planung, Forschungsarbeit und Datenauswertung, sowie für den Feinschliff der Dissertation und die immer schnelle Unterstützung bei kurzfristig aufgetretenen Unklarheiten.

Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter danke ich für die kompetente organisatorische und wissenschaftliche Unterstützung, die er neben seinem meist stressigen Arbeitsalltag zur Verfügung stellte. Ebenfalls danke ich ihm für das Korrekturlesen meiner frühen Manuskripte.

Dem Team des Labors der Klinik für Urologie Tübingen danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Logistik der Gerätschaften, die Überlassung des Arbeitsplatzes und die netten Gespräche. Insbesondere Frau Carmen Wandel und Frau Ursula Kühs möchte ich sehr für die Zusammenarbeit im Labor danken. Ihre Fachkenntnisse, ständige Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung haben mir die Laborarbeit um ein Vielfaches erleichtert.

Herrn Dr. Marcus Scharpf danke ich für die sorgfältige histopathologische Begutachtung meiner Gewebeproben und den Zugang zum pathologischen Archiv.

Fortwährend danke ich meiner Familie für die dauerhafte Unterstützung und den stetigen Rückhalt in allen Lebenslagen.



