

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Urologie
Direktor: Prof. Dr. Felix K.-H. Chun

**Bedeutung von sE-Cadherin für die Progression des
Prostatakarzinoms in vitro**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Veronika Kolb (geb. Muschta)

aus
Karamursa, Kasachstan

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Roman Blaheta
Korreferent:	Prof. Dr. Florian Richard Greten
Tag der mündlichen Prüfung:	25.04.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Hintergrund der Arbeit	9
1.2 Die Anatomie der Prostata	10
1.3 Das Prostatakarzinom	11
1.3.1 Ätiologie und Epidemiologie	12
1.3.2 Früherkennung und die Rolle des PSA.....	13
1.3.3 Staging	15
1.3.4 Grading.....	17
1.3.5 Weitere diagnostische Mittel	18
1.3.6 Therapie	19
1.4 Metastasierung von Krebs.....	20
1.5 Integrine	21
1.6 E-Cadherin und Krebs.....	21
1.6.1 E-Cadherin- Spaltung	22
1.7 Biomarker.....	24
1.7.1 sE-Cadherin als Biomarker.....	25
1.8 Zielsetzung.....	27
2 Material und Geräte	28
3 Methoden	34
3.1 Zelllinien	34
3.2 Zellkulturarbeiten.....	36
3.2.1 Splitting (Umsetzen konfluenter Zellen)	36
3.2.2 Einfrieren der Zellen	36
3.2.3 Auftauen der Zellen	37
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	37
3.3 Zellbehandlung für die Zellzyklus-Analyse, Adhäsion, Migration und FACS-Analyse	38
3.4 Proliferationsversuche und Analyse des Tumorwachstums in vitro.....	38
3.4.1 MTT - Assay	38
3.4.2 Zellzyklus-Analyse	40
3.5 Analyse des Adhäsions- und Motilitätsverhaltens	41
3.5.1 Adhäsion an EZM-Proteinen.....	41

3.5.2	Chemotaxis.....	42
3.5.3	FACScan- Analyse von Integrinen.....	44
3.6	Proteinisolierung	45
3.7	Proteinkonzentrationsbestimmung	45
3.8	Gelelektrophorese.....	46
3.9	Western-Blot	47
3.10	Stripping.....	48
3.11	Blockade-Studie.....	48
3.12	Statistik	49
4	Ergebnisse	50
4.1	MTT-Assay.....	50
4.2	Etablierung der sE-Cadherin-Konzentration für nachfolgende Versuche 51	
4.3	Zellzyklus-Analyse.....	51
4.4	Adhäsion auf extrazellulären Matrixproteinen (EZM-Proteinen) und Chemotaxis.....	54
4.4.1	Adhäsion.....	54
4.4.2	Chemotaxis.....	55
4.5	FACS-Analyse zur Expression des oberflächlichen Integrin-Profiles	58
4.6	Western Blot zur Expression von Signal- und Integrin-Proteinen.....	61
4.7	Blockade relevanter Integrine.....	62
5	Diskussion.....	64
5.1	Einfluss des sE-Cadherins auf die Zellzahl und das Tumorwachstum	65
5.2	Einflüsse von sE-Cadherin auf den Zellzyklus	70
5.3	Auswirkung von sE-Cadherin auf die Adhäsion an EZM-Proteinen und das chemotaktische Verhalten (Migration).....	71
5.4	Auswirkung von sE-Cadherin auf die Integrine	74
6	Zusammenfassung / Summary	80
6.1	Zusammenfassung.....	80
6.2	Summary.....	82
7	Literatur.....	84
8	Publikation.....	93
9	Schriftliche Erklärung	94

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Prostata (Thüroff 2015) [5]	10
Abbildung 2: E-Cadherin Spaltung und Signalwege (nach Hu et al.)	24
Abbildung 3: Zelllinien	35
Abbildung 4: MTT-Pipettierschema	40
Abbildung 5: Aufbau einer Boyden Kammer im Rahmen der Chemotaxis- Versuche.	44
Abbildung 6: Grafische Darstellung der Ergebnisse des MTT-Assay für die drei Zelllinien (PC3, DU145 und LNCaP) unter Behandlung mit sE-Cadherin (0,1-5 µg/ml) versus unbehandelte Kontrolle. Versuchsanzahl (n)= 6.	50
Abbildung 7: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse der Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP. Versuchsanzahl (n)= 6.	53
Abbildung 8: Grafische Darstellung des adhäsiven Verhaltens von PC3 DU145 und LNCaP auf EZM. Versuchsanzahl (n)=6.	55
Abbildung 9: Chemotaxis-Versuch von PC3 und DU145. Versuchsanzahl (n)= 6.	56
Abbildung 100: Übersichtsbild zu den Chemotaxis- und Adhäsionsversuchen von PC3 und DU145. Versuchsanzahl (n)=6.	57
Abbildung 11: Durchflusszytometrie der Oberflächenexpression von alpha- und beta-Integrinen der PC3-Zelllinie. Versuchsanzahl (n)= 5.	59
Abbildung 12: Durchflusszytometrie der Oberflächenexpression von alpha- und beta-Integrinen der DU145-Zelllinie. Versuchsanzahl (n)= 6.	60
Abbildung 13: Übersichtsbild zur Auswirkung der sE-Cadherin-Behandlung auf das Basis- Integrinprofil der Zelllinien PC3 und DU145. Versuchsanzahl (n)=6... 61	
Abbildung 14: Western Blot Analyse der Aktivität ausgewählter Integrine sowie Signalproteine der Zelllinien PC3 und DU145. Versuchsanzahl (n)=3.	62
Abbildung 15: Adhäsion auf Kollagen-G und Chemotaxis der getesteten PKZ- Zelllinien nach Blockade der Integrine alpha3 und beta1	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM (Tumor Node Metastasis) – Klassifikation des PCa [45]	16
Tabelle 2: Risikogruppen bei lokalisiertem und lokal fortgeschrittenem PCa nach D'Amico [46]	17
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial und Geräte	28
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	29
Tabelle 5: Zusammensetzung der Gele	30
Tabelle 6: Pufferlösungen für SDS-Polyacrylamide-Gel Elektrophorese, Western-Blot, Immunofärbung und Stripping	30
Tabelle 7: Zellzyklus Proteine, Primär- und Sekundärantikörper, mit Herkunft und Verdünnung	31
Tabelle 8: Lysispuffer	31
Tabelle 9: Durchfluss-Zytometrie: Integrinuntertypen, Primär und Isotyp-Antikörper, mit Herkunft, Verdünnung und Menge	33

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Akt	Serin/Threonin-Kinase
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
Androgen-Rezeptor	<i>AR</i>
AS	<i>Active Surveillance</i>
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca²⁺	Calcium
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Deoxyribonucleic Acid
DRU	Digitalrektale Untersuchung
EAU	European Association of Urology
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> = Durchflusszytometrie
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i>
g	Gramm
GS	Gleason-Score
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin)- Ethansulfonsäure
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HDAC1	Histon- Deacetylase-Gen
IGF-R1	<i>insulin-like growth factor receptor 1</i>
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
ISUP	International Society of Urological Pathology
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
KLRG1	<i>killer cell lektin-like receptor G1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mg²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
ml	Milliliter

MTT	3-[4,5- <i>dimethylthiazol-2-yl</i>]-2,5- <i>diphenyl tetrazolium bromide</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
l	Liter
pAkt	Phosphorylierte Serin/Threonin-Kinase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCa	Prostatakarzinom
pFAK	<i>Phosphorylated focal adhesion kinase</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKZ	Prostatakarzinomzellen
PSA	Prostataspezifisches Antigen
TNM	Tumor Node Metastasis
TRUS	transrektale Sonografie
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der Arbeit

In Europa verursachen Krebserkrankungen etwa 20% der Todesfälle und belegen somit nach den Herz-Kreislaufkrankungen (50%) den zweiten Platz [1] in der Todesursachenstatistik. Dabei ist das Prostatakarzinom (PCa) unter den urologischen Malignomen aus vielerlei Hinsicht von besonderer Bedeutung. Es ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes und die dritthäufigste Todesursache unter den Tumorerkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland [2]. Zudem ist die Inzidenz des PCa in allen Ländern Europas steigend [3].

Vor diesem Hintergrund ist eine zuverlässige Detektion mit einem möglichst hohen diagnostischen Potential von großer Wichtigkeit. Zur urologischen Prostatakarzinom-Vorsorge gehören in der Regel die Kontrolle des prostataspezifischen Antigens (PSA) sowie die digital rektale Untersuchung (DRU) [4]. Die diagnostische Qualität muss dabei kritisch betrachtet werden, konkret hinsichtlich Überdiagnostik und Übertherapie (siehe 1.3.2).

Die Darstellung tumorspezifischer Proteine als potenzielle Biomarker könnte, ergänzend zum PSA-Wert, präzisere diagnostische Aussagen über den zu erwartenden Krankheitsverlauf erlauben. Die Therapie ließe sich entsprechend präziser anpassen. Angestrebt wird ein patientenadaptiertes Behandlungsregime, um die Mortalitätsrate des PCa zu senken und zugleich Übertherapien zu minimieren.

Spezifische Biomarker sind bislang weder definiert noch etabliert. Basierend auf einer klinischen Studie an PCa-Patienten von Tsaur et al. [5] hatte die vorliegende Dissertation zum Ziel, die Bedeutung des Serumproteins sE-Cadherin für das Wachstum und die metastatische Progression von Prostatakarzinomzellen am in vitro Modell zu evaluieren.

1.2 Die Anatomie der Prostata

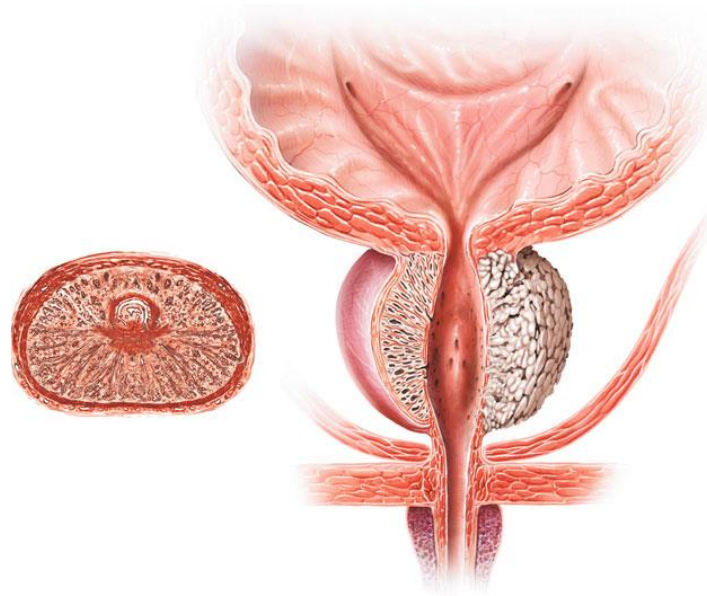


Abbildung 1: Anatomie der Prostata (Thüroff 2015) [6]

Physiologisch gleicht die gesunde Morphologie der Vorsteherdrüse (Prostata) in etwa einer Kastanie [7]. Ihr Gewicht beläuft sich bei einem gesunden jungen Mann auf etwa 15-20 g. Mit ihrer breiten Basis befindet sie sich subperitoneal direkt unterhalb des Diaphragma urogenitale und umschließt gänzlich die Harnröhre (Urethra). Der Apex läuft spitz nach kaudal in Richtung des Beckenbodens zu [8]. Von ventral wird die Prostata vom Os pubis begrenzt, während sie dorsal dem Rektum anliegt [9]. Zahlreiche ihrer Drüsenausgänge münden am Samenhügel (Colliculus seminalis) in die Pars prostatica der Urethra.

Nach McNeal et al. gliedert sich die Prostata topographisch in ihre drei Zonen. Von medial nach lateral betrachtet sind es die keilförmige Innenzone, die Übergangszone und die periphere Zone [8]. Während sich die benigne Prostatahyperplasie (BPH) überwiegend auf die Innenzone beschränkt, bildet sich das PCa vermehrt in der peripheren Zone [6-8].

Eine Schicht aus gefäßreichem Fett- und Bindegewebe, in der sich der periprostatistische Venenplexus befindet, umgibt die Prostata. Über den Plexus venosus prostaticus erfolgt der venöse Abfluss in die Vv. iliacae intrenae [8]. Die arterielle Versorgung ist durch A. vesicalis inferior und A. rectalis media, beides Äste der A. iliaca interna, gewährleistet [6].

Der Lymphabfluss richtet sich größtenteils nach der Gefäßversorgung. Die Lymphe gelangt von der Prostata zuerst über die obturatorischen und iliakalen Lymphknoten zu der Lymphknotenstation im Bereich der A. iliaca communis, der V. iliaca communis sowie den präsakralen Lymphknoten. Von den genannten Lymphknotenstationen erfolgt der weitere Abfluss über die paraaortalen, parakavalen und interaortokavalen Lymphknotengruppen [6].

Die Prostata hat eine sekretorische Funktion, welche endokrinologisch durch das Hormon Dihydrotestosteron (DHT) gesteuert wird. Auf diese Weise wird ein beträchtlicher Anteil der Samenflüssigkeit von der Prostata produziert (30%). Durch das Enzym saure Phosphatase erhält das Prostatasekret einen sauren pH-Wert (ca. 6,4) [9].

Die nervale Versorgung der Prostata ist von großer Bedeutung bei der Entwicklung des PCa, da dieses sich bei einem organüberschreitenden Wachstum meist entlang der Perineuralscheiden ausbreitet. Die sogenannten Nn. cavernosi kommen aus einem verzweigten Nervengeflecht, dem Plexus pelvicus. Dieser beinhaltet sympathische und parasympathische Anteile und zieht nach kaudal in Richtung des Hilum penis. Diese Nerven dienen der Erektionsfunktion des Mannes [6].

1.3 Das Prostatakarzinom

Beim PCa handelt es sich um eine maligne Entartung der Prostata.

In diesem Abschnitt sollen epidemiologische Daten, aktuelle diagnostische Verfahren sowie derzeitige Therapieansätze näher beleuchtet werden, um die Bedeutung des PCa zu erfassen.

Das PCa wächst sehr langsam, vorerst innerhalb der Drüse, bis es die Kapsel gänzlich durchbricht und metastasiert [10]. Es entsteht in ca. 75% der Fälle in der peripheren Zone. Adenokarzinome nehmen histologisch gesehen den überwiegenden Teil des PCa ein [6].

1.3.1 Ätiologie und Epidemiologie

Ätiologie

Bisherige Erkenntnisse zur Ätiologie des PCa konnten noch keine eindeutigen Antworten liefern. Zu den bisweilen etablierten Risikofaktoren des PCa zählen das hohe Alter und die Abstammung von bestimmten Ethnien [11]. Ein weiterer und bedeutender Risikofaktor, im Laufe des Lebens an PCa zu erkranken, ist auf genetische Ursachen zurückzuführen. So konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass für Brüder von Patienten mit einem diagnostizierten niedrig differenzierten PCa ein erhöhtes Risiko besteht, an demselben zu erkranken [12].

Diesem Aspekt wurde darüber hinaus in Zwillingsstudien nachgegangen. So kam man zu der Erkenntnis, dass bei der Erkrankung eines zweieiigen Zwillings an PCa, für den gesunden Zwilling ein im Vergleich zur Gesamtbevölkerung zweifach höheres Risiko bestand, ein PCa zu entwickeln [13]. Weitere Arbeiten haben belegen können, dass bestimmte Genabschnitte und deren Aktivierung zur PCa – Entstehung maßgeblich beitragen [14]. In diesem Zusammenhang wurden etwa 100 der sogenannten *risk loci* ermittelt, die schätzungsweise etwa 33 % des familiären Risikos repräsentieren [15]. Zudem konnten Hemminki et al. zeigen, dass das Alter bei Diagnosestellung des PCa bei Männern mit familiärer Vorgeschichte unter 55 Jahren lag [16]. Im Vergleich dazu wird bei der Mehrheit der Männer (> 85%) das PCa erst nach dem 65. Lebensjahr diagnostiziert [17]. Neben der genetischen Ätiologie scheinen exogene Faktoren, wie diätetische Ursachen und Entzündungen der Prostata einen Einfluss auf die Entwicklung eines PCa zu haben [18]. In einigen Arbeiten konnte festgestellt werden, dass besonders der Verzehr von fettreicher und proteinreicher sowie gemüsearmer Nahrung maßgeblich das PCa-Risiko steigert [19, 20]. Insgesamt besteht jedoch kein Konsens darüber, ob eine bestimmte Ernährungsweise als Ursache für das PCa anzusehen ist, sodass diesbezüglich weitere Studien benötigt werden [21]. Ein hoher sozioökonomischer Status scheint ebenfalls als Risikofaktor für das PCa zu gelten, eine Ursache, die im Zusammenhang mit einem westlichen Lebensstil steht [22].

Epidemiologie

Das PCa gehört zu den häufigsten Krebsentitäten des männlichen Geschlechts in den Industriestaaten [23]. Weltweit steht das PCa auf dem zweiten Platz der Krebserkrankungen des Mannes [24]. Im Jahr 2015 belief sich die weltweite Inzidenz auf etwa 1,6 Millionen Fälle und insgesamt 366.000 Männer starben daran [25]. Europaweit konnte die höchste Inzidenzrate (>200/100 000) in Nord- und Westeuropa verzeichnet werden [3]. Laut des Robert Koch-Instituts waren für 2016 bundesweit ca. 66.900 Neuerkrankungen prognostiziert. Etwa 12.000 Männer in Deutschland versterben jährlich am PCa [26]. Zwischen den 1970er und den 2000er Jahren stieg die globale Inzidenz stetig an, bis sie nun ein Plateau erreicht hat. Diesem Sachverhalt wird die Einführung des PSA-Screenings in vielen Ländern und einer erhöhten Lebenserwartung zugeschrieben [27, 28]. Die Mortalität durch das PCa hat europaweit in den letzten Jahrzehnten abgenommen [29], möglicherweise dadurch bedingt, dass in der heutigen Zeit eine merkliche Verbesserung in der Behandlung stattfindet [30]. Allerdings herrschen weltweit enorme Schwankungen bezüglich der Inzidenz. So zählen asiatische Länder wie China zu den Gebieten mit der niedrigsten Inzidenz. Wohingegen die höchste Inzidenz in Skandinavien und Nordamerika (USA) besteht [17, 31]. Die höchsten Mortalitätsraten werden vor allem in afrikanischen Ländern gemeldet [32].

Weniger als 20 % der Patienten mit einem diagnostiziertem PCa versterben an ihrer Erkrankung [33]. Die Chancen auf eine kurative Behandlung stehen bei einem lokal begrenzten PCa in einem frühen Stadium sehr gut [34]. Ganz anders dagegen die Prognose bei Patienten, bei denen ein fortgeschrittenes PCa festgestellt wurde.

1.3.2 Früherkennung und die Rolle des PSA

Ziel einer jeden Früherkennung ist es, bei asymptomatischen Patienten aggressive Tumore aufzuspüren, bevor diese die Möglichkeit zur Metastasierung bekommen. Multizentrische Studien verweisen darauf, dass die PCa-bedingte Mortalität durch das Screening entweder gesenkt oder nicht

signifikant beeinflusst wird [35, 36]. So stellt dieses Thema eine Kontroverse dar und stößt auf Uneinigkeiten zwischen den Experten.

Bisher besteht in Deutschland bei gesetzlich krankenversicherten Patienten ab dem 45. Lebensjahr die Möglichkeit zur jährlichen Krebsvorsorgeuntersuchung bestehend aus Anamnese, Tastuntersuchung der Prostata und gegebenenfalls spezieller Bildgebung. Zusätzlich bedarf es bei auffälligen Befunden im weiteren Verlauf einer Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA).

Die Serin-Protease PSA wurde zum ersten Mal 1971 von Hara et al. in der Samenflüssigkeit nachgewiesen [37]. Etwa 10 Jahre später folgten erste quantitative Messungen des PSA-Wertes im Blut [38]. Andere Bezeichnungen für das PSA sind Kallikrein-3 und Semenogelase, welche jedoch im klinischen Alltag weniger gebräuchlich sind. Im menschlichen Körper wird das PSA vom drüsigen Anteil der Prostata produziert und hat die Aufgabe, die Samenflüssigkeit zu verflüssigen [39]. Darüber hinaus handelt es sich beim PSA um ein organspezifisches Protein, welches nicht nur beim PCa, sondern ebenso im Serum gesunder Männer nachgewiesen werden kann. So lassen sich bei gesunden Patienten im Schnitt PSA-Konzentrationen von weniger als 4 ng/ml ermitteln [40]. Im Rahmen von Veränderungen der Prostata, wie BPH (benigne Prostatahyperplasie) oder PCa, aber auch bei Entzündungen und Traumata der Prostata können weitaus höhere PSA-Konzentrationen im Blut erreicht werden. Diese Erkenntnis zeigt, dass verschiedene Pathologien der Prostata den PSA-Wert beeinflussen können und dieser somit nicht tumorspezifisch ist. Dennoch belegen mehrere Studien, dass ein erhöhter PSA-Wert mit einem größeren PCa-Risiko vergesellschaftet ist [41-43]. Aufgrund dessen stellt das PSA heutzutage den wohl wichtigsten und am meisten verbreiteten Biomarker zur Detektion des PCa dar [44]. Laut der S3-Leitlinie wird bei Verdacht auf PCa oder auf Wunsch des Patienten der PSA-Wert bestimmt. Um die Indikation einer Biopsie rechtfertigen zu können, werden häufig die Dynamik des PSA-Anstiegs sowie altersadaptierte PSA-Werte herangezogen (S3). Dabei erscheinen Anstiegswerte über 0,75 ng/ml pro Jahr als suspekt (S3).

Die Schattenseite des PSA-Screenings wird durch Überdiagnostik und damit verbundener Übertherapie ersichtlich. Die Bedeutung der Überdiagnostik besteht darin, dass Karzinome erfasst werden, die die Lebenserwartung des

Patienten kaum beeinflussen würden. Somit unterziehen sich folglich viele Patienten unnötigen operativen Eingriffen, obwohl sie aufgrund der langen Latenzzeit des PCa bis zum Lebensende völlig symptomlos geblieben wären [4]. Randomisiert kontrollierte Studien haben nachgewiesen, dass durch das PSA-Screening mit oder ohne DRU die PCa spezifische Mortalität nicht signifikant gesenkt wird [45]. Zusammenfassend ist der Nutzen einer massenhaften Früherkennung mittels PSA-Screening im Hinblick auf die Senkung der Sterblichkeit, aber auch der verursachten Kosten, als nicht eindeutig vorteilhaft anzusehen [35].

1.3.3 Staging

Wie für viele andere Karzinome, gibt es auch für das PCa ein Klassifikationssystem, mit dessen Hilfe das Karzinom einem bestimmten Stadium zugeordnet wird. Die Bestimmung des Tumorstadiums ist erforderlich, um darauf abgestimmte Behandlungsformen einleiten zu können und Aussagen bezüglich der Prognose zu formulieren. Um die Tumorgröße und -lokalisierung zu bestimmen, wird die sogenannte TNM (Tumor Node Metastasis)-Klassifikation (s. Tab. 1) herangezogen [46]. Eine weitere Möglichkeit zur Einteilung von klinisch lokalisiertem PCa ist die D'Amico-Klassifikation. Diese beruht auf einer dreiteiligen Gliederung, anhand derer sich das Risiko eines Rezidivs bei einem lokalisiertem PCa abschätzen lässt. Der D'Amico-Score setzt sich zusammen aus dem Gleason-Score (siehe unten), dem T-Stadium und dem PSA-Wert (s. Tab. 2) [47, 48].

T: Tumorgröße bzw. -ausdehnung

N: Von Tumorzellen befallene Lymphknoten

M: Metastasierung

Tabelle 1: TNM (Tumor Node Metastasis) – Klassifikation des PCa [46]

T – Primärtumor	
Tx: Primärtumor nicht beurteilbar	
T0: Kein Nachweis eines Primärtumors	
T1: Klinisch unauffälliger Tumor, der weder tastbar noch sichtbar ist	
T1a	Histologischer Nachweis von Tumorzellen in weniger als 5% des Resektats
T1b	Histologischer Nachweis von Tumorzellen in mehr als 5% des Resektats
T1c	Nadelbiopsische Tumorsicherung (z.B. aufgrund von erhöhten PSA-Level)
T2: Tumor nur auf Prostata beschränkt	
T2a	Tumor auf die Hälfte eines Lappens oder auf weniger begrenzt
T2b	Tumor auf mehr als die Hälfte eines Lappens begrenzt, kein Befall beider Lappen
T2c	Tumor involviert beide Lappen
T3: Tumor durchbricht die prostatistische Kapsel	
T3a	Uni- oder bilaterale extrakapsuläre Ausbreitung, einschließlich der mikroskopischen Involvierung des Blasenhalses
T3b	Infiltration der Samenblase(n)
T4: Tumor ist fixiert oder befällt weitere angrenzende Strukturen (Sphinkter externus, Rektum, Mm. levatores ani und/oder Beckenwand)	
N – Regionale Lymphknoten	
Nx: Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar	
N0: Keine Metastasen in regionalen Lymphknoten	
N1: Regionale Lymphknotenmetastasen	
M – Fernmetastasen	
Mx: Fernmetastasierung nicht beurteilbar	

M0: Keine Fernmetastasen	
M1: Fernmetastasen	
M1a	in nicht-regionale Lymphknoten
M1b	in Knochen
M1c	in andere Lokalisationen

Table 2: Risikogruppen bei lokalisiertem und lokal fortgeschrittenem PCa nach D'Amico [47]

Niedriges Risiko	Intermediäres Risiko	Hohes Risiko	
PSA < 10 ng/mL und Gleason-Score < 7 und cT1-2a	PSA 10-20 ng/mL oder Gleason-Score 7 oder cT2b	PSA > 20 ng/mL oder Gleason- Score > 7 oder cT2c	jedes PSA jeder Gleason- Score cT3-4 oder cN+
Lokal begrenzt		Lokal fortgeschritten	

c- klinisches Stadium

1.3.4 Grading

Das Grading (histologische Einteilung) dient zur Einstufung der Aggressivität und des Differenzierungsgrades eines Karzinoms. Beim PCa gelingt dies mithilfe des Gleason-Scores (GS), welcher 1966 eingeführt wurde [49]. Das im Rahmen einer Biopsie entnommene Prostatagewebe wird pathologisch untersucht und der Entdifferenzierungsgrad ermittelt. Die Zellen können fünf verschiedenen histologischen Wachstumsmustern (Graden) zugeordnet werden. Diesen Mustern werden jeweils die Punkte 1 bis 5 zugeordnet. Darüber hinaus gibt es einen Unterschied in der Bestimmung des GS einer Stanzbiopsie und einer Prostatektomie. Bei Biopsien wird der GS aus dem häufigsten und dem entdifferenziertesten Muster gebildet, während er sich bei der Prostatektomie aus dem häufigsten und dem zweithäufigsten

Wachstumsmuster ergibt [50]. In beiden Fällen muss ein Muster mehr als 5% des Biopsats repräsentieren. Es kann ein Minimalwert von 2 (1+1) und ein Maximalwert von 10 (5+5) erreicht werden. Allgemein gilt, je höher die errechnete Zahl des GS, desto ungünstiger die Prognose des Patienten [51]. Nach aktuellen Leitlinien der European Association of Urology (EAU) erfolgt das Grading des PCa nach einer Abwandlung des GS durch die „International Society of Urological Pathology“ (ISUP) [52].

1.3.5 Weitere diagnostische Mittel

Digital-rektale Untersuchung

Die am wenigsten invasive und für das Gesundheitssystem günstigste Untersuchung im Rahmen der PCa-Früherkennung stellt die digital-rektale Untersuchung (DRU) dar. Ab dem 45. Lebensjahr haben gesetzlich-krankenversicherte Männer die Option, sich dieser Untersuchung kostenfrei zu unterziehen. Bei bestehendem familiärem Risiko kann die Tastuntersuchung der Prostata bereits ab dem 40. Lebensjahr erfolgen [53]. Das Ziel der DRU ist es, morphologische Veränderungen der Prostata, wie z.B. oberflächlich gelegene Tumore, vom Rektum aus zu ertasten. So empfiehlt die neue S3-Leitlinie zur Früherkennung des PCa die Durchführung der DRU unabhängig vom PSA-Wert [53]. Laut einer Metaanalyse von Hoogendam et al. hat die DRU eine geringe Sensitivität (ca. 60%). Die Spezifität mit 94% sowie der negativ prädiktive Wert mit 99% dagegen ist sehr hoch [54]. Dies bedeutet, dass bei einem unauffälligen Tastbefund mit hoher Wahrscheinlichkeit kein PCa vorliegt. Ist die DRU jedoch auffällig, so besteht eine 28%ige Wahrscheinlichkeit, dass ein PCa vorhanden ist (positiv prädiktiver Wert). Die genaue Charakterisierung eines positiven DRU- Befundes wurde in den eingeschlossenen Studien nicht explizit beschrieben, was als großer Nachteil gesehen werden kann.

Prostatabiopsie

Ergibt sich im Rahmen der DRU oder Bildgebung ein auffälliger Befund, so besteht die Indikation zu einer Probeentnahme der Prostata (Biopsie). Die Biopsie kann dabei sowohl palpatorisch, als auch ultraschallkontrolliert

ausgeführt werden. Eine transrektale Sonografie (TRUS) wird meist im Vorfeld zusätzlich zur DRU durchgeführt. Mit der transrektalen Sonografie kann zum Beispiel auch das Prostatavolumen bestimmt werden, um adäquate Aussagen hinsichtlich erhöhter PSA-Werte treffen zu können. Der Zugang zur Prostata kann entweder durch den Damm (transperineal) oder durch das Rektum (transrektal) gewählt werden [55]. Bei der Prostatastanzbiopsie werden etwa 10 bis 12 Stanzzyylinder aus verdächtigen Arealen entnommen [56]. Grundsätzlich beträgt der positiv prädiktive Wert einer Stanzbiopsie etwa 52% [53].

MRT

Als eine weitere Möglichkeit in der primären Diagnostik des PCa hat sich die Magnetresonanztomographie (MRT) der Prostata etabliert. Diese Bildgebung kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn trotz eines vorherigen negativen Biopsie-Befundes weiterhin der Verdacht auf ein PCa besteht [57]. Um ein sicheres und aussagekräftiges Ergebnis des MRTs gewährleisten zu können, müssen gewisse technische Standards eingehalten werden [53]. Zudem spielt die Erfahrung des Radiologen eine wichtige Rolle [58]. Diese Art der Bildgebung wird durch bisherige Studien als fortschrittlich in Bezug auf die Entdeckung asymptomatischer Karzinome angesehen. Darüber hinaus kann dem Patienten durch dieses Verfahren wiederholtes Biopsieren erspart werden [59]. Andererseits können weitere notwendige Probeentnahmen MRT-gesteuert gezielter ausgeführt werden, um die Detektionsraten zu verbessern. So haben Engehausen et al. mittels der MRT-gesteuerten Biopsie im Vergleich zur TRUS-gesteuerten Biopsie 10% mehr Karzinome erfassen können [60]. Aktuell beschäftigen sich mehrere Studien mit der Fragestellung, ob anhand der MRT-Diagnostik entschieden werden kann, für welche Patienten mit erhöhten PSA-Werten eine Biopsie indiziert ist [61, 62].

1.3.6 Therapie

Nachdem die Diagnose eines PCa gesichert und das Tumorstadium bestimmt wurde, kann mit der Therapieplanung begonnen werden. Die Therapieoptionen sollten zusammen mit dem Patienten und in einem multidisziplinären Team besprochen werden, sodass eine patientenadaptierte Behandlung erfolgen

kann. Die Ausdehnung des Primärtumors sowie der Differenzierungsgrad zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind wichtige Faktoren, von denen die Überlebenszeit des Patienten abhängt. Handelt es sich anfänglich um ein lokal begrenztes PCa, so kann ein kurativer Therapieansatz verfolgt werden. Dieser umfasst die Prostatektomie, die Radiotherapie, bestehend aus Radiatio oder Brachytherapie und aktive Überwachung (engl. Active Surveillance =AS) [48]. Die letztere Therapieform dient vor allem der Vermeidung einer Übertherapie. Die Entscheidung zur AS kann vielerlei Gründe haben, wie zum Beispiel sehr langsames Tumorstadium oder schwerwiegendere Komorbiditäten sowie Zweitkarzinome. Dem Patienten sollen auf diese Weise mögliche Nebenwirkungen erspart werden [63]. Langzeitergebnisse hinsichtlich der 10-Jahres-Überlebensrate bei AS zeigen, dass 96 bis 100% der Patienten noch leben [64]. Anhand bestimmter Einschlusskriterien kann entschieden werden, ob die AS indiziert ist. Dazu gehören Gleason-Score ≤ 6 , ≤ 2 positive Stanzungen, $\leq 50\%$ Karzinomanteile pro Stanzzyylinder sowie ein von PSA ≤ 10 ng/ml [65]. Ist das PCa nicht mehr kurativ behandelbar, so kann laut der S3-Leitlinie eine palliative Therapie mittels Watchful Waiting und der Androgendepression eingeleitet werden [53]. Die Strategie des bloßen Abwartens wird vor allem bei Patienten angewandt, bei denen die voraussichtliche Lebenserwartung weniger als 10 Jahren beträgt.

In einer Studie von Bill-Axelsson et al. wurde verglichen, ob eine radikale Prostatektomie dem Watchful Waiting bei einem lokal begrenzten PCa überlegen ist. Man kam zu dem Ergebnis, dass durch die radikale Prostatektomie ein Überlebensvorteil sowie eine Senkung des Metastasierungsrisikos gegeben ist [66].

1.4 Metastasierung von Krebs

Krebszellen haben je nach ihrer Aggressivität das Bestreben den Primärtumor zu verlassen und an andere Orte im Organismus zu gelangen. Diesen komplexen Vorgang bezeichnet man in der Onkologie als Metastasierung. Er setzt sich aus verschiedenen aufeinander folgenden Stadien zusammen. Im ersten Stadium besteht ein erhöhtes Bestreben der Tumorzellen zur Auflösung von interzellulären Kontakten im Primärtumor sowie eine Zunahme der

Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Matrix (EZM). Folglich wird den Tumorzellen das Herauslösen aus dem Zellverband ermöglicht. Ursächlich für diese Prozesse ist die Degradierung bestimmter Matrixproteine, welche durch vermehrte Sezernierung von Enzymen gestattet wird. Verstärkt wird der oben genannte Vorgang durch die Zunahme der Motilität sowie des Migrationsverhaltens der Tumorzellen. Die Modulation des Aktin-Zytoskelettes ist hierbei entscheidend an der Migration beteiligt. Bei der Lokomotion der Zelle auf der EZM sind bestimmte Integrine involviert. Um die Lymph- oder Blutgefäße zu erreichen, bedienen sich die Tumorzellen einer erhöhten Chemotaxis, d.h. der gerichteten Zellbewegung entlang eines Konzentrationsgradienten. Auf diese Weise können sie in das Gefäßsystem disseminieren. Im nächsten Schritt müssen die im Blut zirkulierenden Zellen wieder an das Endothel adhären, um das Gefäßsystem verlassen zu können und das Zielorgan zu erreichen. Die Extravasation metastatischer Tumorzellen ist ein komplexer Prozess, bei dem Adhäsionsmoleküle wie Selektine, Mitglieder der Immunglobulinfamilie, Integrine, CD44 und andere beteiligt sind [67].

1.5 Integrine

Seit der Erstbeschreibung des Integrinrezeptors vor 31 Jahren durch Hynes et al., gilt diese Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle zur am besten erforschten Rezeptorgruppe der Zelladhäsion [68]. Morphologisch gesehen sind Integrine heterodimere Komplexe, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Sie wirken als Mediatoren der Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix und Basalmembran und ermöglichen es der Tumorzelle, an andere Orte zu migrieren und invasiv zu wirken [69]. Die Expression spezifischer Integrin-Typen korreliert in bestimmten Krebsarten mit dem Tumorprogress [70].

1.6 E-Cadherin und Krebs

Das 120-kDa schwere E(*epithelial*)-Cadherin ist ein Typ-I transmembranäres Glykoprotein und gehört zur Familie der calciumabhängigen Zelladhäsionsmoleküle (CAM) [71]. Unter physiologischen Bedingungen ist es vor allem in Adhäsionsverbindungen der Zellen, wie den Adherens Junctions

vorzufinden [72, 73]. Es ist nicht nur ein elementarer Bestandteil der Zell-Zell-Kontakte, sondern findet seine Funktion zugleich in der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie, der Steuerung koordinierter Zellbewegungen und der strukturellen und funktionellen Zellpolarität in Epithelien [74].

Das E-Cadherin setzt sich zusammen aus einer großen extrazellulären Domäne, gefolgt von einem transmembranären Abschnitt und einer zytoplasmatischen Domäne. Dabei besitzt die extrazelluläre Domäne die Fähigkeit, Calcium (Ca^{2+}) zu binden und auf diese Weise die homophile Adhäsion zu anderen Cadherinen zu ermöglichen [75]. Die zytoplasmatische Domäne interagiert über Catenine (α -, β -, γ - und p120-Catenine) mit dem Aktin-Zytoskelett sowie weiteren Signalproteinen [72, 76, 77]. Die Variation in der Struktur des E-Cadherins und dessen Interaktion mit dem Zytoskelett bietet eine vielfältige Plattform für komplexe biologische Prozesse, wie der Zelladhäsionen bei der Organogenese, aber auch bei der Metastasierungsszenarie von Tumoren [78]. Aktuelle Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen E-Cadherin und der Krebsentstehung besagen, dass Krebszellen verschiedene Mechanismen entwickelt haben, die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion aufzuheben. Im Rahmen der Metastasierung durchlaufen Epithelzellen den Prozess der sogenannten epithelial-mesenchymale Transition (EMT), welche mit einer zunehmenden Entdifferenzierung und damit vermehrter Aggressivität des Tumors einhergeht [79]. Auf diese Weise können die entarteten Tumorzellen den Gewebeverband verlassen und somit den Metastasierungsprozess einleiten [78, 79]. Zu den bisher bekannten Mechanismen des E-Cadherin-Verlustes zählen inaktivierende Mutationen, Stilllegung in der Genexpression, Proteolyse und proteosomaler Abbau sowie Verschiebung des Expressionsgleichgewichts in Richtung nicht epithelialer Cadherine (N-Cadherine) [80, 81].

1.6.1 E-Cadherin- Spaltung

Krebszellen haben verschiedene Wege entwickelt, die adhäsiven Kontakte, die sie im Zellverband halten, aufzulösen. Dieser Prozess der extrazellulären Spaltung wird auch als *cell shedding* oder *ectodomain shedding* (engl. abwerfen) bezeichnet und trägt beispielsweise auch im Rahmen der

Embryogenese für die Verformung des entstehenden Organismus bei [82]. Übertragen auf die Onkologie und den Prozess der malignen Entartung, wird auf diese Weise den Tumorzellen ein entscheidender Teil ihrer onkogenen Eigenschaften verliehen.

Die proteolytische Spaltung des E-Cadherins kann entweder am N-terminalen Ende, auf der extrazellulären Seite, oder am C-terminalen Anteil, auf der zytoplasmatischen Seite des Proteins, erfolgen. Damsky et al. beschrieben als erste Arbeitsgruppe ein 80-kDa schweres Fragment, welches die abgespaltene Ektodomäne des Proteins E-Cadherin darstellt [83]. In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass das sogenannte sE-Cadherin (*soluble E-Cadherin*) zum N-Terminus des E-Cadherin gehört und ursächlich für die Trennung von Zell-Zell-Kontakten ist [84]. Am Spaltungsprozess auf der extrazellulären Seite ist vor allem die α -Sekretase, ein Eiweiß-spaltendes Enzym, beteiligt. Verschiedene weitere Proteasen, wie Matrix-Metalloproteinasen (= MMP; MMP-3, 7, 9 und MT1-MMP), A-Disintegrin und Metalloproteasen (ADAM 10 und ADAM 15), Plasmin sowie Kallikrein 7 dienen als Katalysatoren dieses Vorgangs [85, 86]. Nach der Abspaltung der E-Cadherin-Ektodomäne verbleibt ein 37-kDa schweres C-terminales Fragment, welches durch Caspasen und Calpain weiterhin ins Zytosol abgespalten werden kann [87, 88]. Auf diese Weise wird die Translokation dieses C-terminalen Fragments in den Zellkern ermöglicht. Dieser Vorgang führt schließlich zum gänzlichen Abbau von E-Cadherin und damit zum Verlust von Adherens Junctions in den Zellkontakten [89]. Durch die Abspaltung der zytoplasmatischen Domäne des E-Cadherins wird β -Catenin nicht länger gebunden und kann folglich den Wnt/ β -Catenin Signalweg aktivieren (s. **Abb. 1**). Aufgrund dessen wird in einer Feedbackschleife die weitere Expression des E-Cadherin inhibiert und die Metastasierung der Zelle wird somit ermöglicht [90, 91].

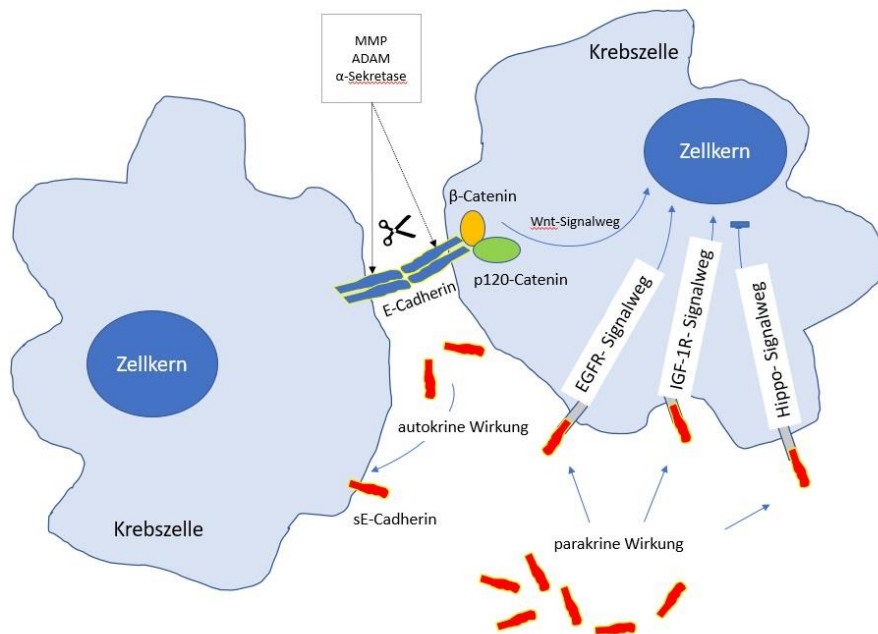


Abbildung 2: E-Cadherin Spaltung und Signalwege (modifiziert nach Hu et al.)[92]

1.7 Biomarker

Biomarker stellen in der Medizin messbare Parameter dar, die über biologische Eigenschaften verfügen. Auf diese Weise können krankhafte Prozesse im menschlichen Körper frühzeitig und objektiv detektiert werden.

Aufgrund falsch-positiver Resultate des PSA-Screenings stiegen die Raten für Überdiagnose und Übertherapie maßgeblich, mit entsprechend massiven Beeinträchtigungen der betroffenen Patienten sowie negativen Auswirkungen auf die Gesundheitsökonomie [93]. Neue Biomarker sollen die mangelnde Spezifität des PSA wieder aufwiegen, um besonders aggressive PCa frühzeitig detektieren zu können. Auf diese Weise sollen künftig präzisere und auf den Patienten individuell abgestimmte Therapieentscheidungen getroffen werden.

In klinischen Studien ist die Evaluation einiger neuer Biomarker und deren Validität in Bezug auf das PCa bereits erhoben worden. Dabei konnte dem sE(soluble epithelial)-Cadherin als einem möglichen Biomarker eine bedeutsame Signifikanz beigemessen werden [5].

1.7.1 sE-Cadherin als Biomarker

Das sE-Cadherin ist etwa 80-kDa schwer und stellt die abgespaltene Ektodomäne des Proteins E-Cadherin dar (s.1.4) [83]. Für gewöhnlich werden durchgehend geringe Mengen des sE-Cadherins aus normalen Epithelzellen freigesetzt [94]. Kuefer et al. ermittelten bei gesunden Probanden im Durchschnitt Blut-sE-Cadherin Konzentrationen von etwa $6 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ [94]. Signifikant höhere Werte des sE-Cadherins sind in Blutproben von Krebspatienten mit unterschiedlichen Krebsarten zu verzeichnen [86]. Darüber hinaus gibt es eine Korrelation zwischen den erhöhten sE-Cadherin-Konzentrationen und einem höheren histopathologischen Tumorgrad, dem Wiederauftreten von Metastasen sowie einer geringeren Überlebensrate [95]. Interessanterweise bewirkte eine chirurgische Intervention bei PCa-Patienten, dargestellt in der Arbeit von Iacopino et al., eine maßgebliche Erniedrigung des sE-Cadherin-Spiegels [96].

Weitere bekannte nicht kanzerogene Konditionen, die zu erhöhten sE-Cadherin-Spiegeln führen, sind Infektionen und oxidativer Stress [97].

Bisherige Erkenntnisse in der Krebsforschung

In der aktuellen Übersichtsarbeit von Hu et al. sind die bisher bekannten Erkenntnisse über den Wirkmechanismus des sE-Cadherins zusammengetragen [92]. So werden aktuellen Annahmen zufolge im sE-Cadherin-angereicherten Tumormikromilieu spezifische biologische Mechanismen initiiert. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die autokrine sowie die parakrine Wirkung, die günstige Verhältnisse für die Progression eines Karzinoms schafft (s. **Abb. 1**) [92]. Nach dem heutigen Wissensstand sind einige Signalwege involviert, die vom sE-Cadherin beeinflusst werden. Besonders nennenswert ist dabei die Aktivierung der EGFR-Familie (*epidermal growth factor receptor*) [98]. Es gibt Rückschlüsse, dass Krebszellen sogar vermehrt sE-Cadherin generieren, um dieses als einen simultanen Liganden für den EGFR zu nutzen [99]. Durch diesen entkoppelten Mechanismus werden den Krebszellen progressive Vorgänge wie Invasion, Migration und Proliferation ermöglicht [100].

Weitere Arbeiten haben sich mit der Wechselwirkung zwischen sE-Cadherin und dem *insulin-like growth factor receptor 1* (IGF-R1) beschäftigt. Dabei wirkt sE-Cadherin aktivierend auf den IGF-1R-Signalweg [101]. Diese Rezeptoren spielen nicht nur eine entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel und Wachstum, sondern werden ebenfalls in Verbindung mit der Kanzerogenese gebracht [102]. McCulloch et al. haben diesbezüglich belegen können, dass durch die Aktivierung des IGF-1R gleichzeitig eine Hochregulierung von MMP und ADAM 10 (s. 1.4.1) stattfindet. Folglich wird vermehrt sE-Cadherin freigesetzt und so eine positive Rückkoppelungs-Schleife initiiert [103].

Eine hemmende Wirkung scheint sE-Cadherin hingegen auf dem Hippo-Signalweg zu haben [104]. Erstmals entdeckt wurde dieser Signalweg in der Taufliege *Drosophila*. Ihm kommt die Aufgabe zu, die Organgröße zu kontrollieren [105]. Dabei bedient er sich biologischen Vorgängen wie der Zellproliferationshemmung und der Initiierung des programmierten Zelltods [105]. Kommt es zu einer Hemmung des Hippo-Signalwegs, so wird die wachstumshemmende Wirkung aufgehoben und das Organ kann unkontrolliert wachsen.

Melis et al. konnten zudem zeigen, dass sE-Cadherin eine Wechselwirkung mit Immunzellen eingeht [106]. Dabei fungiert es als inhibierender Ligand des *killer cell lectin-like receptor G1* (KLRG1) und hindert natürliche Killerzellen am Erkennen von entarteten Zellen.

1.8 Zielsetzung

Die Bestimmung des PSA-Werts hat sich bei der Früherkennung des PCa ohne Zweifel viele Jahrzehnte als sehr hilfreich erwiesen. Dennoch ist diese Methode des medizinischen Managements des PCa nicht zufriedenstellend. Es bedarf sensitiver und spezifischer Biomarker, mithilfe derer präzisere prognostische Vorhersagen zur malignen Erkrankung sowie zur Beurteilung des Therapieansprechens getroffen werden können.

In vorausgegangenen Studien konnte dem sE-Cadherin eine signifikante Bedeutung als potenzieller Biomarker beigemessen werden [5].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals die physiologische sowie pathologische Relevanz dieses Proteins am Prostata-Zellkulturmodell in vitro unter Verwendung der Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP zu evaluieren.

2 Material und Geräte

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial und Geräte

Material	Firma
C-Chip Zählkammern	Fa. Digital Bio, DHC-N01
Elektrophorese und Blottingstation	Bio Rad, Power Pac HC
ELISA	Tecan, infinite M200
ELISA Programm	Magellan Version 6.5
Entwicklungskammer	Fusion FX7 Peqlab
Entwicklungsprogramm	Fusion
Evaluierungsprogramm	Systat Software SigmaPlot 11.0
FACS-Gerät	Becton Dickinson (Heidelberg) FACSCalibur
FACS-Röhrchen + Filter: 5 ml Polystyrene Rundboden-Röhrchen	Fa. BD Falcon, REF No.: 352235
Falcons/Cellstar-Röhrchen, 15ml	Fa. Greiner bio-one, Cat.No.: 188271
Falcons, 50 ml	Fa. Greiner bio-one, Cat.No.: 227261
Inkubator	Heracell 240i Thermo Scientific
Insulinspritze (1 ml)	Fa. Becton, Dickinson, USA. REF: 324827
Mikroskop	Zeiss, ID 03
Mikroskop/Foto	Zeiss, Observer Z1/AxioCam MRm
Pipettierhilfe	Pipetus, Fa. Hirschmann Laborgeräte
Pipettenspitzen	Fa. Costar, 5 ml stripette: Cat.No.: 4487, 10 ml stripette: Cat.No.: 4488
Pipettenspitze	Fa. StarLab, Bevelled Filter Tip (1.000 µl Cat.No.: S1126-7810, 200 µl Cat.No.: S1120-880, 100 µl Cat.No.: S1120-1840, 20 µl Cat.No.: S1120-1810, 10 µl Cat.No.: S1121- 3810)
1,5 ml-Reaktionsröhrchen	Eppendorf
Rührer	Yellow line, yellow line Mag HS7
Schwenktisch	Stuart, see-saw rocker SSL4
Thermoblock	Biometra, TB1
Twinkle LB 970	Berthold Technologies
Wasserbad	GRW 720-04 Fritz Gössner
Werkbank	Antair BSK
6-Well-Platte	Sarstedt, REF 83.3920.300
24-Well-Platte	Falcon, REF 351147
96-Well-Platte	Sarstedt, REF 83.3924.300
Zentrifuge	Zentrifuge 5402, Fa. Eppendorf
Zentrifuge	Rotina 380 R, Fa. Hettich
Zellkulturflaschen	Sarstedt, REF 83.3910.302

Table 4: Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Firma
Accutase (100 ml)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cat. No.: L11-007
Calcein	AAT Bioquest. Cat#: 220220
Cell Proliferations Kit 1 (MTT)	Roche, REF: 11465007001
Cycle Test Plus	Fa. BD, Cat.No.: 340242 (Pufferlösung, Solution A, B und C)
Coomassie Plus Protein Assay Reagenz (950 ml)	Thermo scientific, Prod # 1856210
DMSO	Fa. Sigma-Aldrich, BCBP4426V
Fötale Kälber Serum (100 ml) (FBS)	Fa. Invitrogen, REF 10500-056
Fibronectin	Human plasma, Lot Nr.: 4202006
Gentamicin Sulfat (10 ml, 50 mg Gentamicin per ml)	Fa. Bio Whittaker, Cat.No.: 17-518Z
GlutaMAX 100x (100 ml)	Fa. Invitrogen, REF: 35050-038
Glutaraldehyd 25% (1L)	Fa. Merck, 8206031000
HEPES Puffer 1M (100 ml)	Fa. Sigma-Aldrich, H0887
Kollagen G (4mg/ml)	Fa. Biochrom, L7213
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (500 ml)	Gibco by life technologies, REF14190-094
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (500 ml)	Fa. Sigma-Aldrich, D8662
Penicillin (5.000 U/ml) – Streptomycin (5.000µg/ml) (100 ml) (P/S)	Fa. Sigma-Aldrich, P4458
RPMI (500 ml)	Fa. Sigma-Aldrich, R8758
Tryptanblau 0,4% (100 ml)	Fa. Invitrogen, 15250

Zellkulturmedien:

500 ml RPMI Grundmedium:

430 ml RPMI 1640 Medium

50 ml FBS (= 10%)

10 ml HEPES-Puffer(= 2%)

5 ml P/S (= 1%)

5 ml GlutaMAX (= 1%)

5 ml GlutaMAX (= 1%)

Tabelle 5: Zusammensetzung der Gele

Lösung	Trenngel				Sammelgel
	7%	8%	10%	12%	4%
Aqua dest.	3,9 ml	3,5 ml	2,6 ml	1,75 ml	5,4 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid A	2,3 ml	2,6 ml	3,2 ml	3,9 ml	1,3 ml
Bisacryl B	1,1 ml	1,6 ml	1,6 ml	1,8 ml	0,6 ml
10% APDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	20 µl

Tabelle 6: Pufferlösungen für SDS-Polyacrylamide-Gel Elektrophorese, Western-Blot, Immunofärbung und Stripping

Lösung	Inhalt	Menge
Antikörperlösung	Blotpuffer	90 ml
	BSA	5 g in 100 ml Blotpuffer
Blot-Puffer	10x Towbinpuffer	100 ml
	Tween 20	5 ml
	Destilliertes Wasser	895 ml
Blocklösung	1x Towbinpuffer	100 ml
	Milchpulver	10 g
10x Elpho-Puffer (pH 8,3)	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	Destilliertes Wasser	1 l
1x Elpho-Puffer	10 x Elphopuffer	100 ml
	Destilliertes Wasser	900 ml
10x Transfer-Puffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	Destilliertes Wasser	1 l
1x Transfer-Puffer	10x Transferpuffer	100 ml
	Methanol	200 ml
	Destilliertes Wasser	700 ml
10x Towbin-Puffer	Tris	12,1 g
	NaCl	90 g
	Destilliertes Wasser	1 l
1x Towbin-Puffer	10x Towbinpuffer	100 ml
	Destilliertes Wasser	900 ml

Tabelle 7: Zellzyklus Proteine, Primär- und Sekundärantikörper, mit Herkunft und Verdünnung

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verdünnung
β-Aktin (Maus IgG1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
pAkt /p-Ser 472/473 (Maus IgG1)	104A282	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
FAK (Maus IgG1)	77	125	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
pFAK (pY397) (Maus IgG1)	18	125	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
ILK (Maus IgG1)	3	50	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Sekundärantikörper			Herkunft	Verdünnung
Ziege-anti- Maus HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000
Ziege-anti-Hase HRP			Chemicon	1:5.000

Tabelle 8: Lysispuffer

Chemikalie	Konzentration	Lösemittel	Lagerung	Herkunft
EDTA	0,1 M (29,22 g/l), pH7,4	H ₂ O		Fa. Sigma; Kat#ED455
NaCl				Fa. Merck
Na-deoxycholat	10% (g/v)	H ₂ O		Fa. Sigma; Kat#D6750
NaF	0,2 M (8,398 g/l)	H ₂ O	RT	Fa. Sigma; Kat#1504
Tergitol NP40	10% (v/v)	H ₂ O	RT	Fa. Sigma; Kat#127087- 87-0
Tris-base				Fa. USB
Phosphatase Inhibitoren	Konzentration	Lösemittel	Lagerung	Herkunft
Na-orthovanadat	0.2 M (36.78 g/l)	H ₂ O	-20°C	Fa. Sigma; Kat#S6508
Protease inhibitor	Konzentration	Lösemittel	Lagerung	Herkunft
Leupeptin	1 mg/ml	H ₂ O	-20°C	Fa. Sigma; Kat#2023
Pepstatin A	1 mg/ml	Methanol	-20°C	Fa. Sigma; Kat#P5318
Phenylmethylsulfo- nylfluorid (PMSF)	0,2 M (34,84 g/l)	Isopropanol	RT	Fa. Sigma; Kat#P7626
Aproptin	1 mg/ml	H ₂ O	-20°C	Fa. Sigma;

Stocklösungen der Protease-Inhibitoren herstellen:

Leupeptin: 10mg in 10ml A. dest. lösen, Konzentration: 1mg/ml, aliquotieren à 1 ml, Lagerung bei -20°C

Aprotinin: 10mg in 10ml A. dest. lösen, Konzentration: 1mg/ml, aliquotieren à 1 ml, Lagerung bei -20°C

Pepstatin: 5 mg in 5 ml Methanol lösen, Konzentration: 1 mg/ml, aliquotieren à 1 ml, Lagerung bei -20°C

PMSF: 200 mM Stocklösung. in Isopropanol ansetzen, Lagerung bei Raumtemperatur: 3,48 g PMSF (MW:174,2) mit Isopropanol auf 100 ml auffüllen.

Stocklösungen der Phosphatase-Inhibitoren herstellen:

Na₃VO₄: 200 mM Lösung herstellen (MW:183,9)
3,678 g (Endvolumen 100 ml) einwiegen, in A. dest. lösen, pH-Wert auf 10,0 (gelblich) einstellen. Die Lösung kochen bis sie farblos wird (ca. 10 min.). Auf Raumtemperatur abkühlen, pH wieder auf 10,0 einstellen, die Lösung noch mal kochen bis sie farblos wird. pH prüfen, ggf. auf 10,0 einstellen. Bei Gelbfärbung wieder kochen, abkühlen und pH einstellen. Die aktivierte Natrium-orthovanadate-Lsg. à 10 ml aliquotieren und bei -20°C lagern.

NaF: 200 mM Lösung herstellen (MW:41,99)
0,84 g (Endvolumen 100 ml) einwiegen, mit A. dest. auf 100 ml auffüllen, aliquotieren à 10 ml, Lagerung bei -20°C.

Ansetzen von 1L Lysis-Puffer:

- 7,9 g Tris-base in 750 ml Aqua dest. auflösen
- 9 g NaCl zugeben und rühren
- Wenn die Substanzen vollständig gelöst sind, pH-Wert mit HCL auf 7,4 einstellen
- 100 ml einer 10%igen NP-40 Lösung zugeben, alternativ 10% Triton-X100 (10ml Triton-X100 in 90 ml Aqua dest.)
- 25 ml 10% Na-deoxycholate (Ansatz: 0,3 g in 30 ml Aqua dest.) zugeben und rühren bis die Lösung klar ist
- 10 ml 100mM EDTA-Lösung zugeben, alternativ: 2ml einer 0,5M EDTA-Lösung von Gibco
- 1 ml Aprotinin (1mg/ml) zugeben
- 1 ml Leupeptin (1mg/ml) zugeben
- 1 ml Pepstatin (1mg/ml Methanol) zugeben
- 5 ml 200 mM Na₃VO₄ –Lösung zugeben
- 5 ml 200 mM NAF-Lösung zugeben
- Mit Aqua dest. auf 1L auffüllen.
- Puffer in 50 ml-Röhrchen aliquotieren, Lagerung bei -20°C
- 1,5 ml Aliquots in 1,8 ml Cryotubes, Lagerung bei -20°C

PMSF: 7,5 µl der 200 mM PMSF-Stocklösung auf 1,5 ml Lysis-Puffer, erst vor Gebrauch zugeben. Endkonzentration: 1mM

Tabelle 9: Durchfluss-Zytometrie: Integrinuntertypen, Primär und Isotyp- Antikörper, mit Herkunft, Verdünnung und Menge

Primärantikörper	Klon	Herkunft	Verdünnung	Menge
CD49a-PE (Integrin alpha1, Maus IgG1)	SR84	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD49b-PE (Integrin alpha2, Maus IgG2a)	12F1-H6	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD49c-PE (Integrin alpha3, Maus IgG1)	C3 II.1	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD49d-PE (Integrin alpha4, Maus IgG1)	9F10	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl

CD49e-PE (Integrin alpha5, MausIgG1)	IIA1	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD49f-PE (Integrin alpha6, Ratte IgG2a)	GoH3	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD29 R-PE (Integrin beta1, Maus IgG1)	MAR4	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD61 R-PE (Integrin beta3, Maus IgG1)	VI-PL2	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD104 R-PE (Integrin beta4, Ratte IgG2b)	439-9B	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
Isotyp	Klon	Herkunft	Verdünnung	Menge
Maus IgG1 R-PE	MOPC-21	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
Maus IgG2a R-PE	G155-178	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
Ratte IgG2b R-PE	R35-38	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl

3 Methoden

3.1 Zelllinien

Die Versuche erfolgten mit den drei PCa-Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP. Alle Zelllinien stammen aus der Tumorzellbank der American Type Culture Collection (ATCC). Im Folgenden werden die Eigenschaften jener Zellen erläutert.

PC3

Die PC3-Zelllinie gehört zu den Androgen-resistenten Zelltyp und sezerniert kein PSA. 1979 erfolgte die erstmalige Charakterisierung dieser Zellen aus Knochenmetastasen eines 62-jährigen Patienten [107]. PC3 besitzen das größte Metastasierungspotential und entsprechen somit dem histologisch fortgeschrittenen PCa [108]. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 33 h [109].

DU145

Der DU145-Zelltyp wurde aus einer im Gehirn lokalisierten Metastase eines 69-jährigen Patienten mit PCa isoliert [110]. Diese Zellen sind Androgen-resistent und sezernieren kein PSA [111]. Verglichen mit PC3 ist das Metastasierungspotential geringer. Diese Zellen wachsen in einem einschichtigen Zellverband und haben eine Verdopplungszeit von etwa 29 h.

LNCaP

Die LNCaP-Zellen stammen aus einer supraclavikulär gelegenen, linksseitigen Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Patienten mit der Diagnose eines prostatistischen Adenokarzinoms. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 60 h [112]. Das Wachstum ist durch eine nestartige Anordnung und fehlende Konfluenz charakterisiert. Dieser Zelltyp ist Androgen-sensitiv und sezerniert PSA.

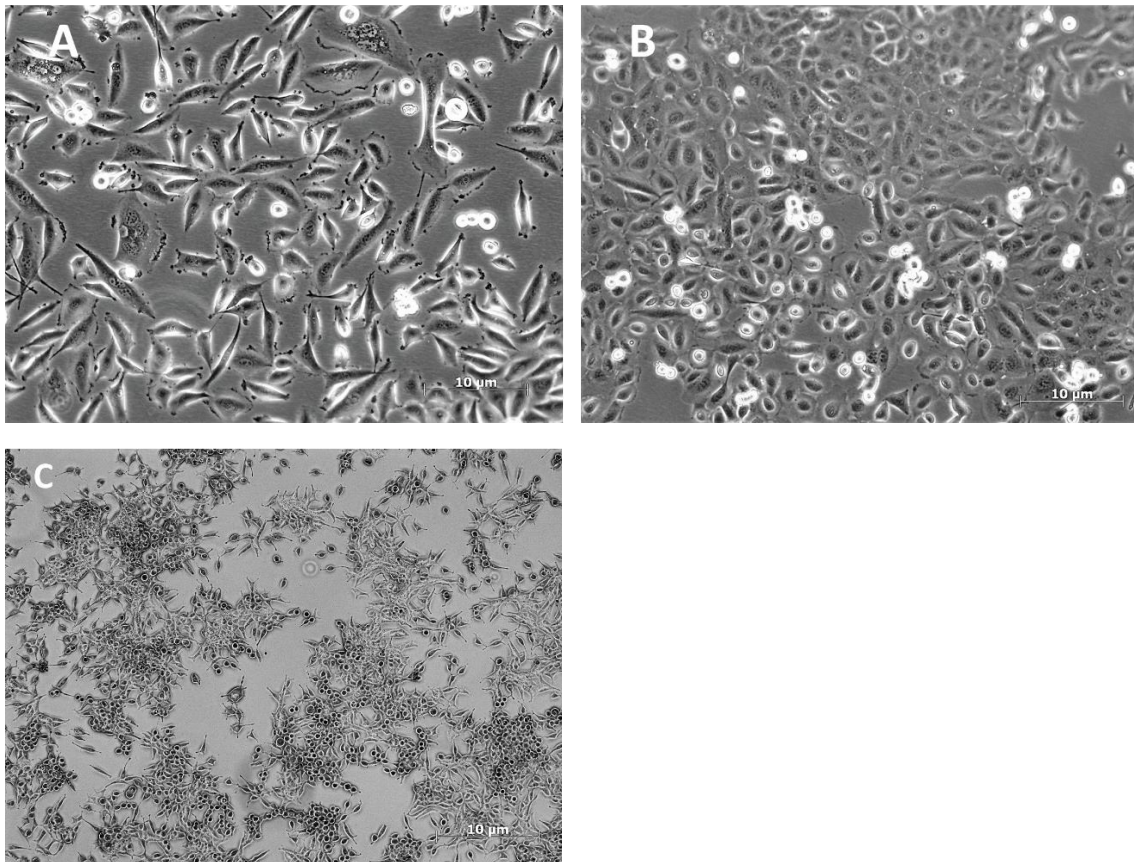


Abbildung 3: Zelllinien: A=PC3, B=DU145, C= LNCaP

3.2 Zellkulturarbeiten

3.2.1 Splitting (Umsetzen konfluenter Zellen)

Im Vorfeld wurde die Konfluenz der Prostatakarzinomzellen (PKZ) unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Es wurde bei einer Konfluenz von 80 - 90 % passagiert. Die folgenden Arbeiten fanden alle unter der sterilen Bank statt. Zunächst wurde das verbrauchte Medium entfernt und die adhärenierten Zellen, je nach Größe der Kulturflasche (hier 25 cm²), mit 3 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen. Danach wurde auf die PKZ 1 ml Accutase gegeben und anschließend für ca. 3 min bei 37° C inkubiert, mit dem Ziel, die Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Nach dem Ablösen wurden die Zellen wieder in Nährmedium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche in Verhältnissen von 1:2 bis 1:20 überführt. Die Inkubation der Kulturflaschen erfolgte im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellkulturen wurden nur bis Passage 30 geführt.

3.2.2 Einfrieren der Zellen

Die Kryokonservierung der Zelllinien dient dazu, diese auf langfristige Sicht aufzubewahren. Es wurden spezielle Kryotubes verwendet, die vor dem Einfrieren beschriftet wurden. Das Einfriermedium wurde auf Eis hergestellt und setzte sich zusammen aus 70 % RPMI1640-Medium (ohne Zusätze), 20 % FBS und 10 % DMSO. Das Reagenz DMSO verhinderte in seiner Funktion als Gefrierschutzmittel die Kristallbildung in den Zellen während des Einfrierprozesses. Vorerst wurden die Zellen in der Zellkulturflasche abgelöst (s. 3.2.1). Die Zellen wurden in Nährmedium aufgenommen und anschließend in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt sowie 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde auf Eis in das Einfriermedium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und zu je 1 ml in die Kryotubes überführt. Um ein schonendes Einfrieren der Zellen in 1° C - Schritten zu gewährleisten, wurden die Kryotubes zunächst in eine Kryobox

sortiert und bei -80° C gelagert. Anschließend konnten die Kryotubes zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196° C) gelagert werden.

3.2.3 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen wurden die Kryotubes zügig im Wasserbad bei 37° C erwärmt. Danach wurde die nicht gänzlich aufgetaute Zellsuspension in 10 ml Nährmedium aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im nächsten Schritt erfolgte eine fünf-minütige Zentrifugation bei 1.050 rpm und 4° C. Der Überstand mit dem toxisch wirkendem DMSO wurde verworfen, das verbliebene Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und in 25 cm²-Kulturflaschen umgesetzt. Anschließend wurden die Kulturflaschen im Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellzahl war ein wichtiger Bestandteil vieler Versuche. Hierzu wurden die Zellen nach erfolgter Ablösung (s. 3.2.1) und einer Zentrifugation von 5 min bei 1.050 rpm sowie Verwerfen des Überstandes, in 1 ml Nährmedium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Es wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl des Farbstoffs Trypanblau (0,4%ige Lösung) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und gründlich gevortext. Weitere 10 µl des Trypanblau-Zellgemisches (Verhältnis 1:10) wurden auf eine Neubauerkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop konnten die Zellen in den vier Quadranten der Kammer ausgezählt werden. Dabei wurden die nicht vitalen Zellen dunkel angefärbt, da sie den Farbstoff aufgenommen haben. Die vitalen Zellen blieben hell. Das Verhältnis von vitalen zu nicht vitalen Zellen wurde notiert, um Aussagen über die Zellvitalität treffen zu können. Die tatsächliche Gesamtzahl der Zellen konnte mit der untenstehenden Formel errechnet werden.

$$G = n \times 10^4 \times F$$

G = Gesamtzahl der Zellen

n = Zellzahldurchschnitt

F = 10 (Verdünnungsfaktor in
Trypanblau)

Abhängig von einer zuvor definierten Zellzahl für die verschiedenen Versuche, konnte die dafür benötigte Menge der Zellsuspension mit Hilfe einer Gleichung berechnet werden.

3.3 Zellbehandlung für die Zellzyklus-Analyse, Adhäsion, Migration und FACS-Analyse

Nach dem Ablösen der Zellen wie in 3.2.1 beschrieben wurden die PKZ in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet mit Nährmedium resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Darin wurde eine sE-Cadherin-Konzentration mit humanem rekombinanten sE-Cadherin von 5 µg/ml geschaffen. Auf diese Weise wurde pro Zellreihe jeweils eine Behandlung und eine Kontrolle ohne sE-Cadherin angesetzt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 4 Stunden bei 37° C im Brutschrank in einem Thermocycler inkubiert. Danach wurden die Behandlungen und Kontrollen in 25 cm²- Kulturflaschen umgesetzt und mit frischem Nährmedium versorgt. Am nächsten Tag konnte der Versuch erfolgen.

3.4 Proliferationsversuche und Analyse des Tumorwachstums in vitro

3.4.1 MTT - Assay

Der MTT- (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) Assay wurde erstmals im Jahr 1983 als eine verlässliche Methode zur Bestimmung der metabolischen Zellaktivität von Mosmann et. al. [113] beschrieben. Die Grundlage des Versuchs besteht darin, dass das gelbfarbene wasserlösliche MTT infolge einer Reduktion in das unlösliche lilafarbene Formazan umgesetzt wird. Der Anteil lebender Zellen wurde durch das umgewandelte Formazan repräsentiert und konnte auf diese Weise gemessen werden.

Die Proliferation der PKZ im sE-Cadherin-haltigem Milieu mit unterschiedlichen Konzentrationen sollte mit PKZ im Nährmedium als Kontrolle verglichen werden. In diesem Versuch wurden die Zellkulturen wie in Abschnitt (3.2.1)

beschrieben abgelöst, und anschließend die Zellzahl sowie die Zellvitalität bestimmt (s.3.2.4).

Ein essenzieller Schritt war die Erstellung einer Eichkurve, mit welcher die Ergebnisse der nachfolgenden Messungen verrechnet werden konnten. Dazu wurde die Zellzahl auf $32 \cdot 10^5$ in 2 ml Nährmedium eingestellt. In weiteren Schritten wurden jeweils 1 ml der vorherigen Zellsuspension mit je 1 ml Nährmedium verdünnt, sodass eine Verdünnungsreihe von $16 \cdot 10^5$ bis $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml entstand. Die Triplikate einer Verdünnung wurden jeweils zu 100 µl in einer 96 Well-Platte pipettiert. Parallel wurde auch ein Triplikat mit Nährmedium als Nullkontrolle aufgetragen. In jedes well wurde 10 µl MTT-Reagenz hinzugegeben und die Platte vier Stunden bei 37° C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Solibolisierungspuffer und die anschließende Inkubation über Nacht. Am nächsten Tag wurde wie am Tecan infinite M200 die Eichkurve gemessen und abgespeichert.

Es wurde wie in 3.2.4 beschrieben eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml für die Kontrolle und die einzelnen sE-Cadherin-Konzentrationen eingestellt und diese jeweils zu 100 µl in Triplikaten ausplattiert.

Das sE-Cadherin, welches ursprünglich in der Konzentration von 500 µg/ml vorlag, wurde für den MTT-Test in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml und 10,0 µg/ml angesetzt. Für den Leerwert wurden Triplikate mit 100 µl Nährmedium vorgelegt.

Insgesamt wurden drei 96-Well-Platten nach einem bestimmten Pipettierschema angelegt und jeweils für 24, 48 und 72 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. An den resultierenden Zeitpunkten wurden entsprechend 10 µl MMT-Reagenz hinzugefügt. Jeweils nach einer vierstündigen Inkubation erfolgte die Zugabe von 100 µl Solibolisierungspuffer und die kontinuierliche Inkubation bis zum nächsten Tag. Die sich anschließenden Messungen erfolgten bei 550 nm am ELISA (*Enzymelinked Immunosorbent Assay*) –Gerät gemessen.

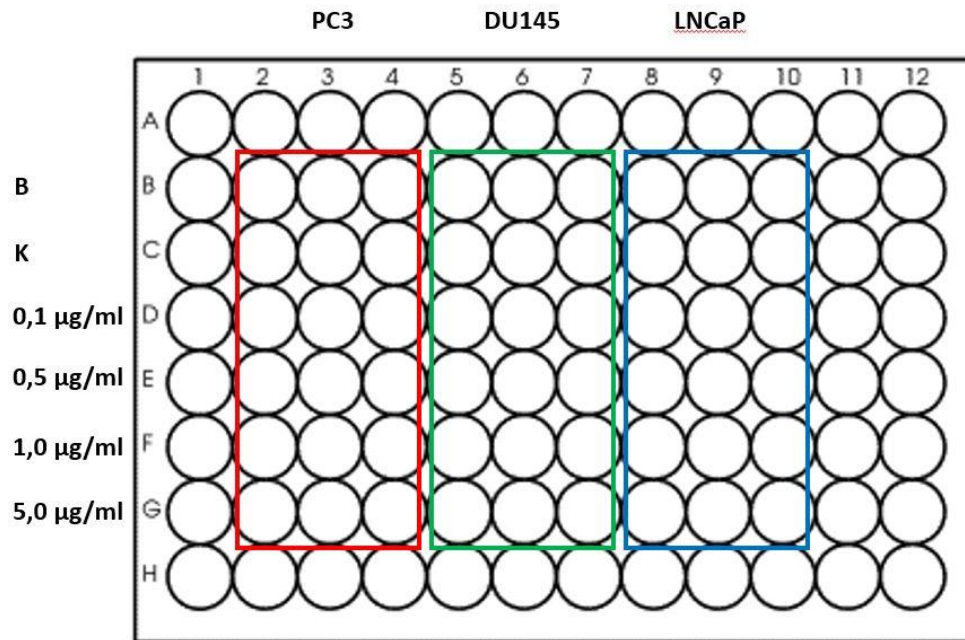


Abbildung 4: MTT-Pipettierschema (B=Blank; K=Kontrolle)

3.4.2 Zellzyklus-Analyse

Der Zellzyklus einer Zelle wird in seine fünf Phasen eingeteilt. Das Ziel dieses Versuchs war es, den Einfluss von sE-Cadherin auf den Zellzyklus der PKZ zu untersuchen.

Mithilfe von Aphidicolin in der Konzentration von 1 µg/ml, welches 24 h auf die Zellen einwirkte, wurden die drei Zelllinien vorerst synchronisiert. Aphidicolin ist ein tetrazyklisches Diterpen und hemmt in eukaryotischen Zellen den Übergang von der G₁ - in die S - Phase [114]. Am darauf folgenden Tag wurden die PKZ zwei Mal mit Nährmedium gewaschen und nochmals für zwei Stunden mit diesem inkubiert.

Nachdem die Behandlung der PKZ wie in Abschnitt 3.3 erfolgte, wurden die Zellen abgelöst, in PBS aufgenommen und bei 4° C und 1050 rpm für 5 min zentrifugiert. Diese Prozedur wurde zwei weitere Male durchgeführt. Die darauffolgenden Schritte wurden mittels CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit durchgeführt. Zunächst wurden die PKZ in 1 ml Pufferlösung aufgenommen. Wie in 3.2.1 beschrieben, wurde die Zellzahl bestimmt. Nach dem die Zellzahl auf 5x10⁵ Zellen/ml eingestellt wurde, folgte die Aufnahme in Pufferlösung und eine sich anschließende Zentrifugation für 5 min bei 4° C und 1050 rpm. Der

Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mittels einer Pipette trockengelegt. Die nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zuerst wurde das Pellet vorsichtig in 250 µl der Lösung A (Trypsinpuffer) aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl der Lösung B (Trypsininhibitor und RNase-Puffer) hinzugefügt und wieder vorsichtig resuspendiert. Nach weiteren 10 min wurde auf Eis und im Dunkeln 200 µl der Lösung C (Propidiumiodid) hinzugegeben und dieses Gemisch erneut für 10 min ruhen gelassen.

Die entstandene Zelllösung wurde durch einen Filter der 5 ml FACS-Röhrchen gegeben. Die Messung und die Darstellung der Zellzyklusphasen fanden am FACS-Gerät statt. Die FACS-Röhrchen wurden weiterhin auf Eis gelagert und waren für drei Stunden haltbar.

3.5 Analyse des Adhäsions- und Motilitätsverhaltens

Mittels dieser Versuche konnten essenzielle Schritte der Metastasierung in vitro nachgestellt und untersucht werden. Eine Reihe von Ereignissen begleiten den Vorgang der Metastasierung. Dabei stellt die Interaktion mit den Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) und Wachstumsfaktoren sowie Zytokinen eine wichtige Plattform für die Metastasierungsszenerie dar [115].

3.5.1 Adhäsion an EZM-Proteinen

Anhand dieses Versuchs konnte das Adhäsionsverhalten der PKZ unter dem Einfluss von sE-Cadherin an EZM-Proteinen wie Kollagen oder Fibronectin untersucht werden.

Am Vortag wurde eine 24-Well-Platte mit dem jeweiligen Protein (Kollagen 400 µg/ml oder Fibronectin 100 µg/ml) beschichtet und über Nacht (mindestens drei Stunden) im Kühlschrank ruhen gelassen. Am nächsten Tag wurde die restliche Lösung aus jedem Well vorsichtig am Rand abpipettiert und die Platte drei Mal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Danach erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Blockade mit einem Blockierpuffer (1 % BSA in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}), welcher jeweils zu 1 ml in jedes Well vorsichtig

pipettiert wurde. Nach einer Stunde wurde der Puffer abpipettiert und die Platte nochmals drei Mal mit PBS gewaschen.

Die PKZ wurden wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, behandelt. Das Waschen der Zellen, sowie das Aufnehmen der Zellen zur Calceinfärbung erfolgte mittels Vollmedium.

Die Messmethode mittels Calcein-AM (AM= Acetoxymethalester) wurde erstmals von Wang et al. beschrieben [116]. Der hydrophobe Ester Calcein-AM diffundiert problemlos durch Biomembranen vitaler Zellen und wird intrazellulär durch Esterasen in hydrophiles Calcein umgewandelt. Dieses besitzt die Fähigkeit Komplexe mit zweiwertigen Metallionen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) einzugehen, sodass es die Zelle nicht mehr verlassen kann. Als Fluoreszin-Derivat kann es in der Chelatform durch die Wellenlänge von 494 nm angeregt werden und hat sein Emissionsmaximum bei 520 nm.

Es wurden jeweils 10^5 Zellen/500 μl in die Kavitäten pipettiert und für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit konnte die Adhäsion der PKZ erfolgen. Danach wurde der Überstand mit den nicht adhären Zellen aus jedem Well wieder abpipettiert und die Platte nochmals vorsichtig mit PBS gewaschen. Zur darauffolgenden Messung der Emission am Twinkle LB 970 wurden 500 μl Vollmedium in jedes Well gegeben.

Für die Fixierung und anschließende Zählung der adhären PKZ unter dem Mikroskop, wurde die Platte 10 min bei Raumtemperatur mit 2%igem Glutaraldehyd inkubiert. Nach dem Entfernen des Glutaraldehyds, wurde die Platte mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und 500 μl des PBS in jede Kavität pipettiert. Auf diese Weise war die Platte bei Lagerung im Kühlschrank (4°C) für mehrere Wochen haltbar. Die zusätzliche Auszählung erfolgte bei 200-facher Vergrößerung am Mikroskop.

3.5.2 Chemotaxis

Das Ziel dieses Versuchs bestand darin, das Migrationsverhalten der PKZ im sE-Cadherin-haltigen Milieu einer bestimmten Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen zu erforschen.

Nach der Behandlung wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, wurden die PKZ in serumfreiem Medium aufgenommen, in 15 ml Falcon überführt und 5 min bei

1050 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet mit 1 ml serumfreien Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde anschließend wie in 3.2.4 beschrieben ermittelt. Nach dem die benötigte Zellzahl eingestellt worden ist, wurden die PKZ in 1 ml serumfreien Medium aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Jeweils 1 µl Calcein wurde zu jedem einzelnen Reaktionsgefäß pipettiert, um die Messung am Twinkle LB 970 zu ermöglichen. In eine benötigte Anzahl an Kavitäten einer 24-Well-Platte wurde je 1 ml serumhaltiges Medium vorgelegt. Danach erfolgt der Einsatz von Filtern mit einer Porengröße von 3,0 µm in die Kavitäten. Anschließend wurden 10⁵ Zellen/500 µl auf die Filter pipettiert. Auf diese Weise konnten die Zellen einem Gradienten folgend durch den Filter wandern. Nach einer 24-stündigen Inkubation konnte die Messung der migrierten Zellen durchgeführt werden.

Erfolgte der Versuch in einer 6-Well-Platte wurden die Filter am nächsten Tag zweimal vorsichtig mit PBS+ gewaschen und anschließend in einer neuen 6-Well-Platte, in deren Vertiefungen 2 ml 2 %iges Glutaraldehyd gegeben wurde, für 10 Minuten fixiert. Danach wurden die an der Filterunterseite fixierten Zellen gefärbt. Hierzu wurden die Filter erst seitlich in VE-Wasser gewaschen und anschließend für 10 Minuten in Hämatoxylin gefärbt. Für das Bläuen wurden die Filter in eine Schale mit Leitungswasser gelegt und danach wieder in VE-Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen auf der Oberseite der Filter mit einem Wattestäbchen entfernt und wieder mit VE-Wasser gewaschen. Abschließend wurde die 6-Well-Platte und die darin eingesetzten Filter jeweils mit 2 ml PBS+ befüllt und es erfolgte die optische Auswertung per 200-facher Vergrößerung am Mikroskop.

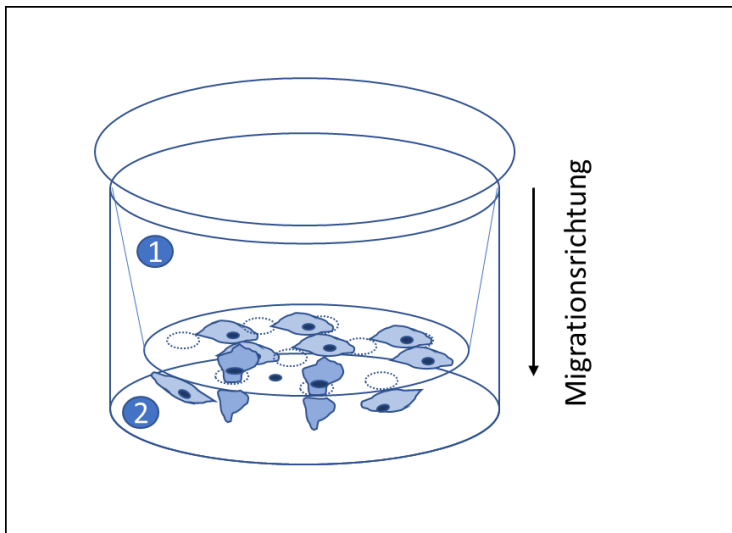


Abbildung 5: Aufbau einer Boyden Kammer im Rahmen der Chemotaxis-Versuche: 1= Insert mit den darin enthaltenen Zellen im nährstoffarmen Medium; 2=Kammer mit nährstoffreichen Medium und den bereits durchgewanderten Zellen. Der Pfeil kennzeichnet die Migrationsrichtung.

3.5.3 FACSscan- Analyse von Integrinen

Die PKZ wurden im Vorfeld wie in Abschnitt 3.3 behandelt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese für fünf Minuten bei 1050 rpm und 4°C zentrifugiert. Um möglichst gute Ergebnisse der FACS-Analyse zu erzielen, war es sehr wichtig, die folgenden Schritte auf Eis durchzuführen. Das zentrifugierte Zellpellet wurde in 2 ml FACS-Puffer, bestehend aus PBS und 0,5% BSA aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in weitere 12 ml FACS-Puffer aufgenommen und jeweils 1 ml, der Zellsuspension in FACS-Röhrchen pipettiert. Dabei wurde im Vorfeld festgelegt welche Integrin-Typen nachgewiesen werden sollten. Im nächsten Schritt wurden die befüllten Röhrchen erneut zentrifugiert und der Überstand gänzlich verworfen. Nun konnten etwa 10 µl des jeweiligen Antikörpers zum Nachweis bestimmter Integrine mit dem Zellpellet vorsichtig resuspendiert werden. Nach einer 1-stündigen Inkubation des Antikörper-Zellgemischs im Kühlschrank, konnten zwei weitere Waschschrte mittels 2 ml FACS-Puffer erfolgen. Diese dienten dem Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern. Für die Messung wurde das Zellpellet in 250- 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Detektion der Integrin-Isotypen erfolgte am FACS-Gerät (*fluorescence activated cell sorting*)

3.6 Proteinisolierung

Die Proteine der PKZ mussten im Vorfeld isoliert werden, um den Western-Blot durchführen zu können. Einen Tag zuvor wurde die Zellbehandlung wie in Abschnitt 3.3 durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die PKZ abgelöst und mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und in 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1.040 rpm. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet je nach Menge in 100 bis 500 μl Lysispuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Weiterhin wurden die lysierten Zellsuspensionen mithilfe einer Insulin-Spritze wiederholt resuspendiert (ca. 7 x), bis das Lysat schaumig wurde. Danach wurden weitere Eppendorfgefäße befüllt und für 10 Minuten bei 4°C sowie 10000 rpm zentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Proteine von den sonstigen Zellbestandteilen getrennt und befanden sich im Überstand. Dieser wurde vorsichtig abpipettiert und in Cryotubes überführt. Um Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden ca. 3 μl der Proteinlösung in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Die Lagerung der isolierten Proteine erfolgte bei -80°C .

3.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Coomassie-Methode (Bradford-Test). Dabei können photometrisch Proteinkonzentrationen im Bereich von $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden [117].

Zuvor werden 3 μl der Proteinlösung zu 57 μl Aqua dest. gegeben, sodass ein Verdünnungsverhältnis von 1:20 entsteht. Etwa 10 μl werden in Form von Triplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Als Leerwert diente Aqua dest., welches ebenfalls zu je 10 μl aufgetragen wurden. Zu jedem Well wurden 300 μl Coomassie-Brillant-Blau hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schwenkgerät. Schließlich wurde die Extinktion am ELISA-Gerät bei 595 nm gemessen und mithilfe einer zuvor erstellten Eichkurve die endgültige Proteinkonzentration errechnet.

3.8 Gelelektrophorese

Das Verfahren der Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren wie DNA (Deoxyribonucleic Acid) und RNA (Ribonucleic Acid). In den eigenen Versuchen diente diese Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Verschiedene Gelzusammensetzungen der Glycingele wurden hierfür benötigt. Die genaue Zusammensetzung des 4%-igen Sammelgels und des 7 bis 12%-igen Trenngels sind Tab. 5 zu entnehmen. Im Vorfeld wurde wie in Punkt 3.5.4 die Proteinisolierung durchgeführt.

Bei der Gelherstellung wurden zuerst 7 ml des Trenngels in eine Gelkammer pipettiert. Danach wurden etwa 200 µl des Alkohols Isobutanol hinzugegeben. Diese Schicht sollte als Schutz vor möglichen Luftblasen dienen. Die Polymerisationsdauer betrug bei Raumtemperatur etwa 15 min. Das verbliebene Isobutanol wurde mit Aqua dest. vorsichtig weggespült und überschüssiges Wasser mithilfe von Filterpapier trockengelegt.

Nach diesem Prozedere wurde die restliche Gelkammer mit Sammelgel ausgefüllt. Anschließend wurde ein Gelkamm in die Gelkammer eingesetzt und diente als Formhalter für die Geltaschen

Nachdem das Sammelgel ebenfalls auspolymerisiert war, wurde der Gelkamm entfernt und die Taschen mit Aqua dest. ausgespült, um überschüssige Gelreste zu entfernen. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x Elpho-Puffer gefüllt und die Taschen mit 5 µl Marker (peqGOLD Protein Marker IV) beladen. Vor der Beladung der Taschen mit 50 µg Protein, wurden die Proben mit einer 1 zu 1 Mischung aus Laemmlipuffer und Mercaptoethanol (19 Teile Laemmlipuffer, 1 Teil Mercaptoethanol) gemischt und zur Denaturierung für 5 Minuten bei 95°C im Thermoblock erhitzt.

Die anschließende Elektrophorese durch das Sammelgel wurde unter einer Spannung von 80 V für etwa 45 min durchgeführt, nach optischer Kontrolle wurde die Auftrennung durch das Trenngel bei 120 V weitergeführt. Die Auftrennung der Proteine war nach etwa einer weiteren Stunde beendet. Die Gele konnten nun für das Western Blotting verwendet werden.

3.9 Western-Blot

Die Western Blot-Methode findet in der Proteindetektion Verwendung. Hierbei werden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Zu Beginn wurde die Nitrozellulosemembran, sowie das Blotting-Papier und die Schwammtücher für mindestens 15 Minuten in 1x Transfer-Puffer eingelegt. Für das Blotten wurde das Gel in einer Gelkammer auf zwei Blotting-Papiere und ein Schwammtuch gelegt und darauf wiederum die Membran. Zur Entfernung von Luftblasen, die die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran verhindern könnten, wurden diese unter leichtem Druck mit deiner Pipette „herausgerollt“. Im Anschluss wurden wiederum zwei Blotting-Papiere und ein Schwammtuch auf die Membran gelegt und so das „Sandwich“ komplettiert. Die geschlossene Gelkammer wurde in eine Apparatur eingespannt, die zum Schutz vor Überhitzung mit einem Eispack beladen wurde, und mit 1x Transferpuffer gefüllt. Das Übertragen der Proteine auf die Membran dauerte bei einer Spannung von 100 V eine Stunde. Die sich nun auf der Membran befindlichen Proteine konnten im Anschluss für Immunfärbungen mit spezifischen Antikörpern verwendet werden.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blotten kurz mit 1x Towbinpuffer gewaschen und um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran mit Milchpulver geblockt (1g/10ml). Nach einer Stunde auf dem Schwenktisch wurde die Blockierlösung verworfen und die Membran kurz mit 1x Blotpuffer gewaschen, um das restliche Milchpulver zu entfernen. Danach wurde der entsprechende Antikörper auf die Membran gegeben, Verdünnung siehe Tabelle 6. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden die Antikörper wieder zurück in die 15 ml Falcongefäße gefüllt, so dass sie wiederverwendet werden konnten. Die Membran wurde je dreimal für 15 Minuten mit 1x Blotpuffer gewaschen und im Anschluss der entsprechende Sekundärantikörper und das Markerenzym, Horseradishperoxidase (HRP) auf die Membran gegeben. Nach 30 Minuten wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 15 Minuten mit 1x Blotpuffer gewaschen und für fünf Minuten in destilliertes Wasser gelegt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die

Membran für eine Minute mit 1 ml einer 1:1 Mischung der Detektionsreagenz 1 und 2 inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in eine Plastikhülle und diese dann in die Entwicklereinheit Fusion FX7 gelegt. Die Entwicklung dauerte abhängig vom zu ermittelnden Antikörper zwischen zehn Sekunden und einer Minute. Als Ladekontrolle wurde die Detektion von β -Aktin durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit 1x Towbinpuffer gewaschen und für 30 Minuten mit einer 1x Antikörper-Stripping-Lösung behandelt. Abermals wurde die Membran im Anschluss dreimal für jeweils zehn Minuten mit 1x Towbinpuffer gewaschen und dann konnte die Membran wie beschrieben wiederverwendet werden, startend mit dem Blockieren.

3.10 Stripping

Die Nitrozellulosemembranen wurden in den erfolgten Versuchen mindestens zweimal verwendet. Das erste Mal diente dem Nachweis der gewünschten Proteine und ein zweites Mal für den β -Aktin Nachweis. So konnte die Übereinstimmung der eingesetzten Proteinmengen überprüft werden. Der erste Schritt diente der Ablösung der gebundenen Antikörper an die Nitrozellulosemembran. Dafür wurde jede Membran dreimal 10 min lang mit Towbin-Puffer (s. Tab. 6) gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit je 10 ml Antibody Stripping Solution. Anschließend wurde erneut dreimal mit Towbin-Puffer je 10 min gewaschen. Danach konnte eine erneute Blockade mit β -Aktin erfolgen.

3.11 Blockade-Studie

Um Rückschlüsse über die Funktion der Oberflächenintegrine in den Tumorzellen treffen zu können, erfolgte die Blockade relevanter Integrin-Subtypen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. Die im Vorfeld durchgeführten Experimente bezüglich des Integrin-Expressionsprofils sowie die Veränderungen dessen nach sE-Cadherin-Behandlung dienten der Selektion bestimmter Integrine. Die Auswahl der Integrine erfolgte aus den Ergebnissen der FACS-Analyse. Nach dem die Integrine blockiert wurden,

erfolgte die Überprüfung der chemotaktischen Eigenschaften und die der Adhäsion auf Kollagen G. Die Integrin- Blockade erfolgte in Eppendorfgefäßen, je nach Versuch, entweder in serumfreiem oder serumhaltigem Medium und einer Konzentration von 10 µg/ml blockierendem Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen in die Kollagen-beschichteten Wells oder auf die Filter pipettiert. Die restlichen Schritte und die Auswertung erfolgten wie in den Abschnitten 3.5.1 und 3.5.2.

3.12 Statistik

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden der Mittelwert und die +/- – Standardabweichung ermittelt. Sämtliche Versuche wurden mindestens zwei- bis fünfmal wiederholt, um Zufälle auszuschließen. Die Überprüfung auf statistische Signifikanz wurde Anhand des „Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Tests“ durchgeführt. Mithilfe dieses Tests kann man zwei unabhängige Gruppen ohne Normalverteilung untersuchen. Da biologische Phänomene selten der Gauß-Verteilung folgen, bietet es sich an diesen Test zu verwenden. Weiterhin wurde der Student´s t-Test angewendet, um die Auswertung der Western Blot-Ergebnisse zu ermöglichen. Es bestand eine Signifikanz, wenn ein p-Wert von 0,05 oder niedriger erreicht wurde.

4 Ergebnisse

4.1 MTT-Assay

Mithilfe des MTT- Assay konnte die Wirkung des sE-Cadherin in verschiedenen Konzentrationen auf die drei Prostatakarzinomzelllinien beurteilt werden. Dabei dienten Zellen, die keine Behandlung mit sE-Cadherin erhielten, als Kontrolle.

In der **Abbildung 6** sind die Ergebnisse des MTT-Assay dargestellt. Zu erkennen ist ein konstanter Anstieg der Zellzahl in allen Zelllinien über 24, 48 und 72 h. Insbesondere anhand der LNCaP-Zelllinie wird ersichtlich, dass mit steigender sE-Cadherin Konzentration (0 $\mu\text{g/ml}$ bis 5,0 $\mu\text{g/ml}$) über 72 h die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle prozentual gesehen abnimmt. Der gleiche Effekt kann auch bei den Zelllinien PC3 und DU145 nach einer Inkubation von 48 h beobachtet werden. Auffällig ist bei den letzteren Zelllinien, dass es nach 72 h zu einer umgekehrten Wachstumskurve kommt. Bei den sE-Cadherin Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1,0 $\mu\text{g/ml}$ steigt die Zellzahl verglichen mit der Kontrolle.

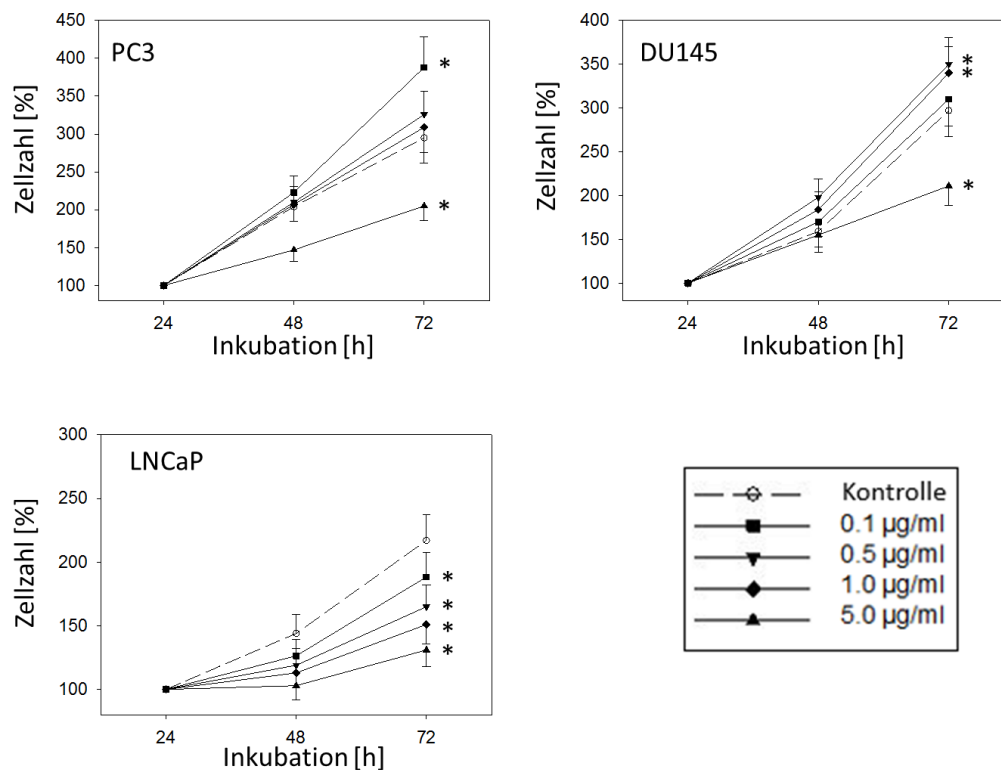


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Ergebnisse des MTT-Assay für die drei Zelllinien (PC3, DU145 und LNCaP) unter Behandlung mit sE-Cadherin (0,1-5 $\mu\text{g/ml}$) versus unbehandelte Kontrolle. Die X-Achse repräsentiert die Inkubationszeit in Stunden (h), die Y-Achse zeigt die prozentuale Zellzahl. * kennzeichnet die Signifikanz. Versuchsanzahl (n)= 6.

4.2 Etablierung der sE-Cadherin-Konzentration für nachfolgende Versuche

Zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration für die nachfolgenden Versuche erfolgten die Behandlung der PKZ der ersten Versuche probatorisch mit den sE-Cadherin Konzentrationen von 0,1 µ/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml und 5 µg/ml. Es hat sich gezeigt, dass die Behandlung mit der Konzentration von 5,0 µg/ml die stabilsten Ergebnisse erbracht hat, ohne apoptotische sowie zelltoxische Mechanismen überwiegen zu lassen.

Darüber hinaus wurde bereits 1996 von der Arbeitsgruppe Pittard et al. im Serum gesunder Probanden eine sE-Cadherin Konzentration von 3,21 mg/ml festgestellt [118]. Auf ähnliche Werte stießen auch Kuefer et al. [94].

Nachfolgende Versuche wie die Zellzyklus-Analyse, Adhäsion und Chemotaxis sowie FACS-Analyse erfolgten deshalb in der Konzentration von 5 µg/ml.

4.3 Zellzyklus-Analyse

Während des Zellwachstums werden innerhalb der Zelle verschiedene Stadien des Zellzyklus durchlaufen. Diese werden eingeteilt in G0/G1-, S- und G2/M-Phase. Der Zellzyklus stellt somit ein wichtiges Steuerelement der Zellproliferation dar. Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen eine Übersicht zum Wirkmechanismus von sE-Cadherin in der Konzentration von 5 µg/ml auf den Zellzyklus von PKZ (s. **Abb. 7** Grafiken **A** und **B**).

Die anfänglichen Zellzyklus-Analysen wurden an nicht synchronisierten Zellen durchgeführt (s. **Abb. 7 A**). Bei der aufgeführten Kontrolle von nicht synchronisierten PC3-Zellen befanden sich 50% der Zellen in der G0/G1-, 16,3 % in der G2/M- und 33,7 % der PC3-Zellen in der S-Phase.

Die Phaseneinteilung der unsynchronisierten DU145-Zellen, die als Kontrollen fungierten, ergab 40,3 % in G0/G1-, 20,7 % in G2/M- und 39 % der DU145-Zellen in der S-Phase.

Bei der Kontrolle der nicht synchronisierten LNCaP befanden sich 62,7 % in der G0/G1-, 9,3 in der G2/M- und 28 % in der S-Phase.

Bei allen unsynchronisierten PKZ konnten unter der Behandlung mit sE-Cadherin lediglich geringfügige Verschiebungen der einzelnen Phasen ermittelt werden, die als nicht signifikant einzustufen waren.

Aufgrund dessen wurden weitere Versuche der Zellzyklus-Analyse unter Synchronisation der PKZ durchgeführt. Ziel der Synchronisation war es, alle Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase anzuhalten (Übergang von G1- zu S-Phase), um anschließend alle Zellen synchron in die nächste Phase übergehen zu lassen. Damit konnten interne Schwankungen des Zellzyklus weitgehend aufgehoben werden, um die Effekte des sE-Cadherins besser beurteilen zu können.

Bei allen PCA-Zellen kam es unter sE-Cadherin zur signifikanten Zunahme der G0/G1- Phase (s.. **Abb. 7 B**). Bei den Zelllinien DU145 und LNCaP ist die G2/M-Phase überwiegend konstant geblieben, während die S-Phase anteilig abnahm. Die Zelllinie PC3 zeigte nach Behandlung mit sE-Cadherin einen weitgehend konstanten Anteil der Zellen in der S-Phase, während die G2/M-Phase von 22,1% (Kontrolle) auf 9,1 % abfiel.

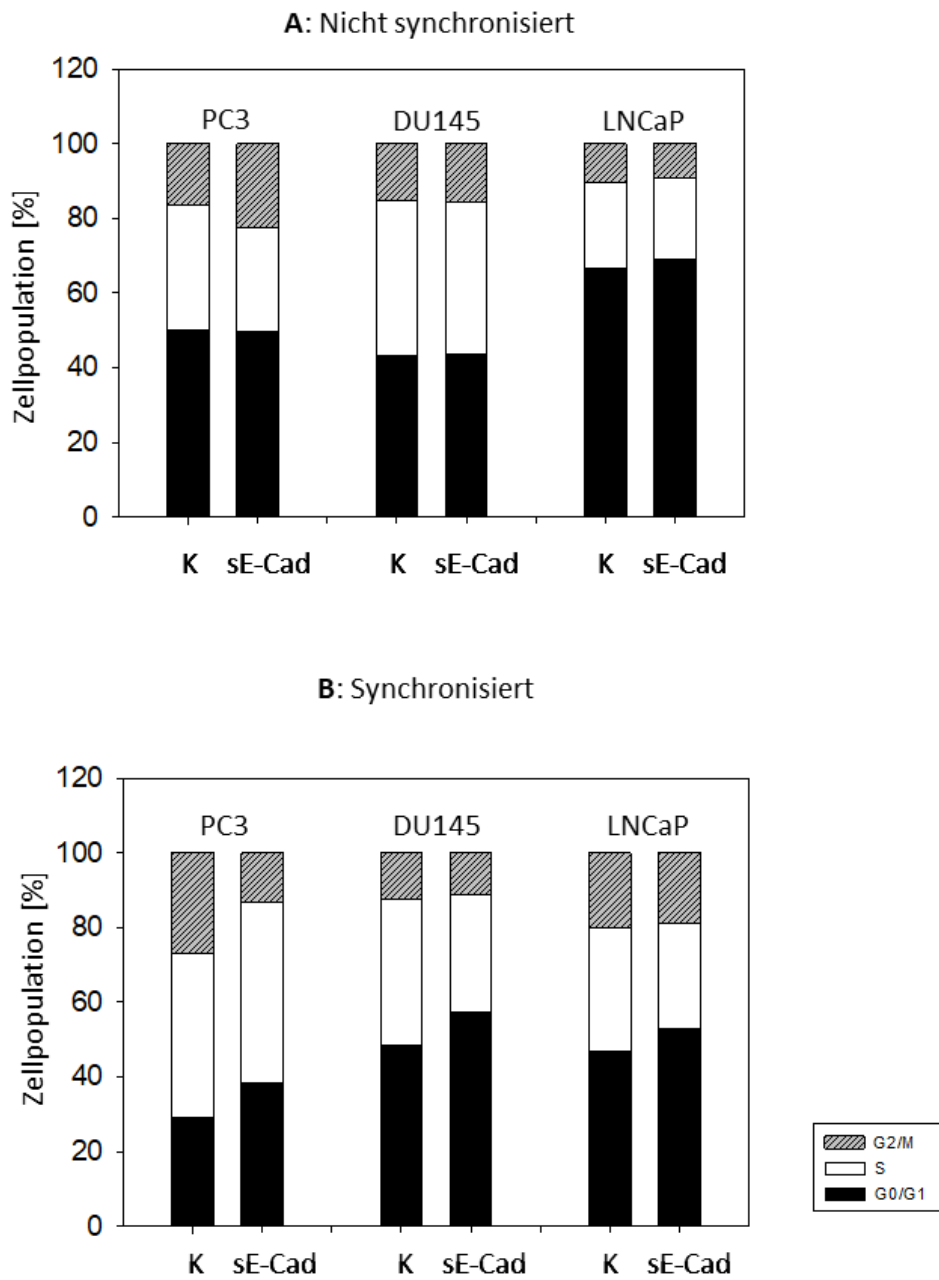


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse der Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP, A: nicht synchronisiert; B: synchronisiert. Auf der X-Achse sind jeweils Kontrolle (K) vs. sE-Cadherin-Behandlung (sE-Cad) mit 5 $\mu\text{g/ml}$ der drei Zelllinien dargestellt. Die Y-Achse repräsentiert die Zellpopulation in Prozent (%). Versuchsanzahl (n)= 6.

4.4 Adhäsion auf extrazellulären Matrixproteinen (EZM-Proteinen) und Chemotaxis

Mithilfe der Versuche wie Adhäsion an EZM und Chemotaxis konnten grundlegende Schritte der Metastasierung der verschiedenen PKZ in vitro imitiert werden. Darüber hinaus sollte die Wirkung von sE-Cadherin in der Konzentration von 5 µg/ml auf das Adhäsions- bzw. Chemotaxis-Verhalten untersucht werden.

Die Versuche wurden mit den Zelllinien PC3 und DU145 durchgeführt. Die Versuchsreihen mit LNCaP erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse. Aufgrund der sensiblen Reaktionen auf Veränderungen der Zellumgebung, erwiesen sich die durchgeführten Versuche mit LNCaP als sehr schwierig.

4.4.1 Adhäsion

Die PKZ wurden wie unter 3.3 beschrieben behandelt und auf Kollagen-G- sowie Fibronectin- beschichteten Kavitäten ausplattiert. In diesem Versuch kamen zwei Verfahren der Zellzahlermittlung zum Einsatz. Einerseits erfolgte die Auszählung der Zellen unter einem Lichtmikroskop und Zuhilfenahme eines Zähllokkulars. Die zweite Methode wurde durch die Färbung mit Calcein-AM ermöglicht (s. 3.5.1)

Einen ausführlicheren Überblick zum Adhäsionsverhalten aller PCa-Zelllinien nach sE-Cadherin-Behandlung gibt **Abb. 8**. In dieser Grafik wurden die Auszählmethode und Calcein-AM-Messung einander gegenübergestellt und evaluiert. Interessanterweise konnte bei der Adhäsion von PC3 und DU145 an Kollagen-G und anschließender Calcein-AM-Messung eine Abnahme adhärenter Zellen gezeigt werden. Die bereits beschriebene Reduktion der Anzahl adhärenter PKZ an Fibronectin konnte durch die Calcein-AM-Messung bestätigt werden. Lediglich die Zelllinie der LNCaP erbrachte bei dem Adhäsionsversuchen an Kollagen-G und Calcein-AM-Messung keine signifikante Ab- oder Zunahme der adhärenter Zellen.

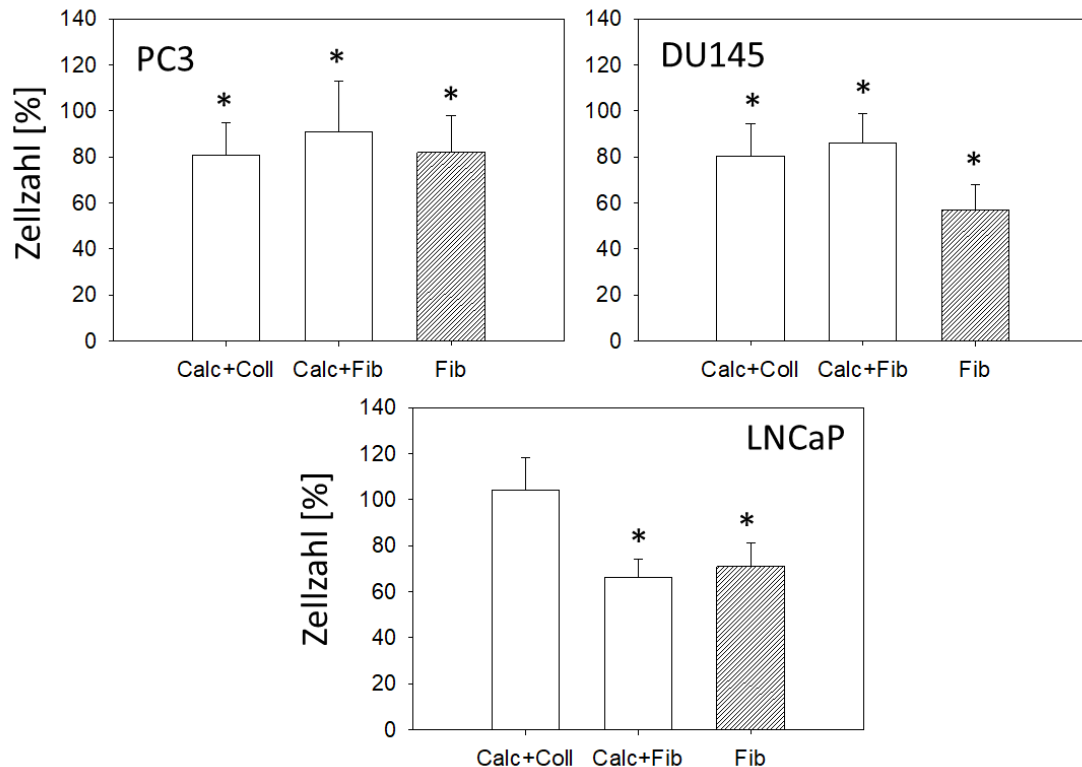


Abbildung 8: Grafische Darstellung des adhäsiven Verhaltens von PC3, DU145 und LNCaP auf EZM nach sE-Cadherin-Behandlung. EZM beinhaltet Kollagen-G (Coll) in der Konzentration von 400 µg/ml und Fibronectin (Fib) in der Konzentration von 100 µg/ml, repräsentativ als Säulendiagramm. Y-Achse stellt die Zellzahl in % dar. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Bestimmung adhärenter Zellen durch Calcein-AM-Färbung (=Calc+Coll bzw. Calc+Fib) sowie durch Zellauszählung an fünf verschiedenen Stellen nur bei Interaktion mit Fibronectin (=Fib) bei 200-facher Vergrößerung. * kennzeichnet jeweils die Signifikanz. Versuchsanzahl (n)=6.

4.4.2 Chemotaxis

Als Chemotaxis wird die gerichtete Zellbewegung entlang eines Konzentrationsgefälles zum Ort der höheren Nährstoffkonzentration definiert. Im Rahmen der Metastasierung von Karzinomen bahnen sich die Tumorzellen ihren Weg zu den mit Nährstoffen beladenen Blutgefäßen. Die Versuche wurden nach dem Prinzip des Zweikammer-Systems, der sogenannten Boyden-Kammer durchgeführt (s. 3.5.2). In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Chemotaxis-Versuche zusammengestellt.

Wie in **Abb. 9** ersichtlich, konnte gezeigt werden, dass PKZ im sE-Cadherin-angereicherten Milieu zu signifikant höheren chemotaktischen Verhalten neigen, als die unbehandelte Kontrollzellreihe. Die Versuche mit der Ziellinie LNCaP erbrachten leider keine verwertbaren Ergebnisse und sind deshalb in der nachfolgenden Abb. nicht weiter aufgeführt.

Reproduktiv konnte die signifikante Zunahme des chemotaktischen Verhaltens der beiden o.g. Zelllinien unter sE-Cadherin Behandlung in multiplen Zählungen bestätigt werden (s. **Abb. 9**). Die Zelllinie PC3 zeigte hierbei verglichen mit DU145 eine größere Zunahme des chemotaktischen Verhaltens.

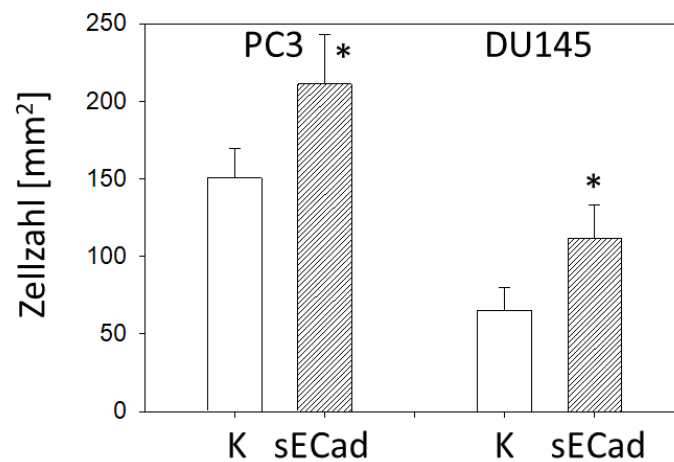


Abbildung 9: Chemotaxis-Versuch von PC3 und DU145. X-Achse beinhaltet die Kontrolle sowie sE-Cad-Behandlung. Y-Achse stellt die Zellzahl in mm² dar. Auszählung am Filter an fünf verschiedenen Stellen bei 200-facher Vergrößerung. * kennzeichnet die Signifikanz. Versuchszahl (n)= 6.

Abb. 10 gibt einen guten Gesamtüberblick zu den Ergebnissen der Chemotaxis und Adhäsion auf EZM. Es konnte gezeigt werden, dass zwei der drei Zelllinien (PC3 und DU145) ähnlich auf die Behandlung mit sE-Cadherin der Konzentration von 5 µg/ml reagiert haben. In allen repetitiven Versuchen zur Chemotaxis der genannten Zelllinien kam es zur signifikanten Zunahme der Zellzahl am Ort der höheren Lockstoffkonzentration. Diese wurde bei den PC3-Zellen um 76 % gesteigert und bei DU145-Zellen um rund 49 %.

Weiterhin kann man eine deutliche Abnahme des adhärenenten Verhaltens der PKZ unter Behandlung mit sE-Cadherin im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Dieser Trend bezieht sich sowohl auf die Adhäsion auf Kollagen als auch auf Fibronektin.

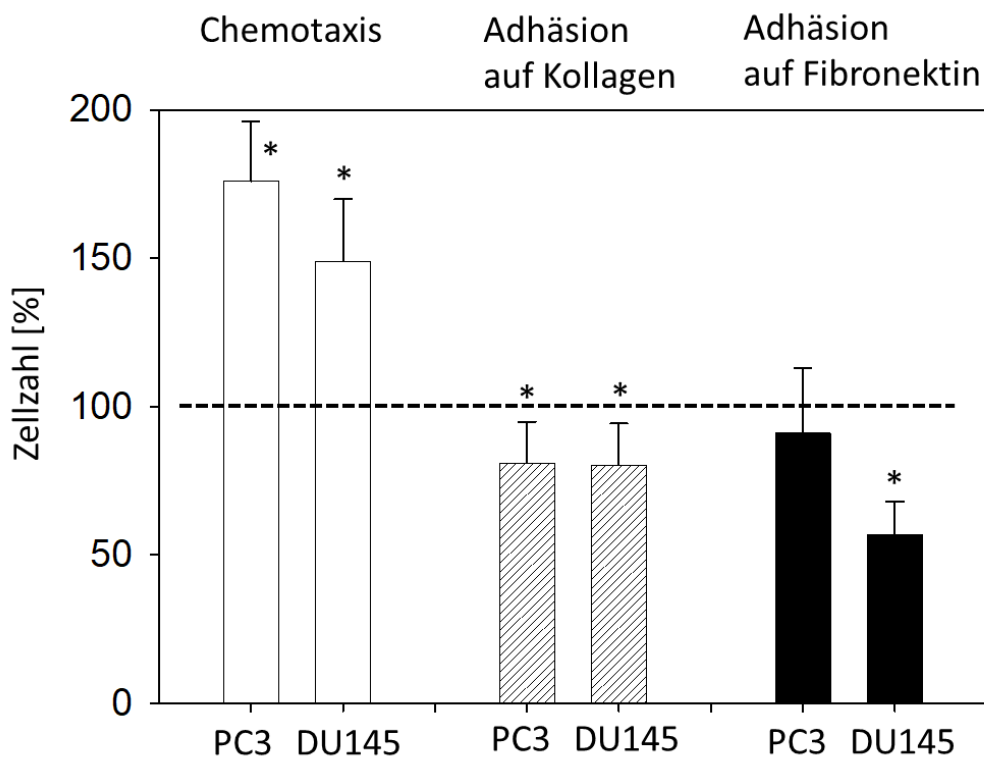


Abbildung 10: Übersichtsbild zu den Chemotaxis- und Adhäsionsversuchen von PC3 und DU145: X-Achse repräsentiert die Zellzahl in %. Auf der Y-Achse sind die vergleichend die o.g. Zelllinien aufgeführt. Ergebnisse der Adhäsion untergliedert in Kollagen-G in der Konzentration von 400 µg/ml und Fibronektin in der Konzentration von 100 µg/ml. Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt. * kennzeichnet die Signifikanz. Versuchszahl (n)=6.

4.5 FACS-Analyse zur Expression des oberflächlichen Integrin-Profiles

Integrine gehören in die Kategorie der transmembranären Proteine und stellen ein wichtiges Modul der Adhäsion an EZM-Proteinen dar [119]. Mithilfe der FACS-Analyse am Durchflusszytometer war es möglich das native Expressionsprofil der verschiedenen Integrintypen der PKZ darzustellen. Hierbei wurden die ursprünglichen Expressionsmuster der Oberflächen-Integrine mit denen nach sE-Cadherin-Behandlung verglichen. Mithilfe der durchgeführten Versuche konnten Rückschlüsse über die Mechanismen der Adhäsion und Chemotaxis gezogen werden. Das Integrinprofil wurde in Form von Histogrammen dargestellt (s. **Abb. 11** und **12**).

In den nachfolgend gezeigten **Abbildungen 11** und **12** sind die ursprünglichen Integrinprofile der beiden Zelllinien PC3 sowie DU145 dargestellt. Sowohl bei PC3 als auch bei DU145 lässt sich das Oberflächenexpressionsprofil der Integrine $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ sowie $\beta 4$ gut abbilden. Integrine wie $\alpha 1$, $\alpha 4$ und $\beta 3$ ließen sich in beiden Zelllinien nur sehr schwach oder gar nicht mittels FACS-Analyse nachweisen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei PC3-Zellen die Integrine $\alpha 2$ und $\beta 1$ stark an der Oberfläche exprimiert sind. Bei den gleichen Zellen waren weniger stark $\alpha 3$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ exprimiert, wobei $\alpha 5$ am schwächsten exprimiert wurde. Von den untersuchten Oberflächenintegrinen bei den DU145-Zellen waren $\alpha 3$ und $\beta 1$ am stärksten an der Zelloberfläche präsentiert. Weniger stark war $\alpha 2$ und nur schwach $\alpha 5$, $\alpha 6$ sowie $\beta 4$ an der Oberfläche der DU145-Zellen nachweisbar.

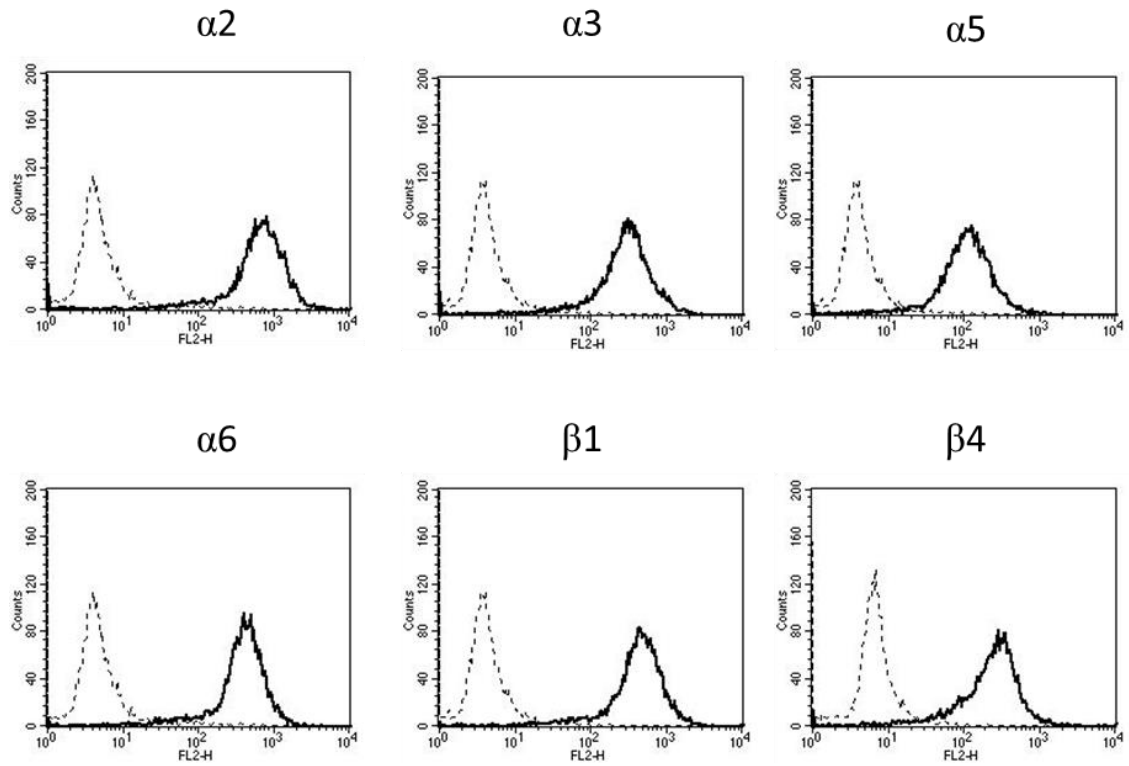


Abbildung 11: Durchflusszytometrie der Oberflächenexpression von alpha- und beta-Integrinen der PC3-Zelllinie. X-Achse stellt die relative logarithmische Verteilung der Fluoreszenzintensität für die Integrine $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ sowie $\beta 1$ und $\beta 4$. Auf der Y-Achse ist die relative Zellzahl aufgetragen (Counts). Gestrichelte Linie: Isotypen IgG1-PE und IgG2a-PE sowie IgG2b. Durchgezogene Linie: Kontrolle. Versuchszahl (n)= 5. Es wurden jeweils 10.000 Zellen gezählt.

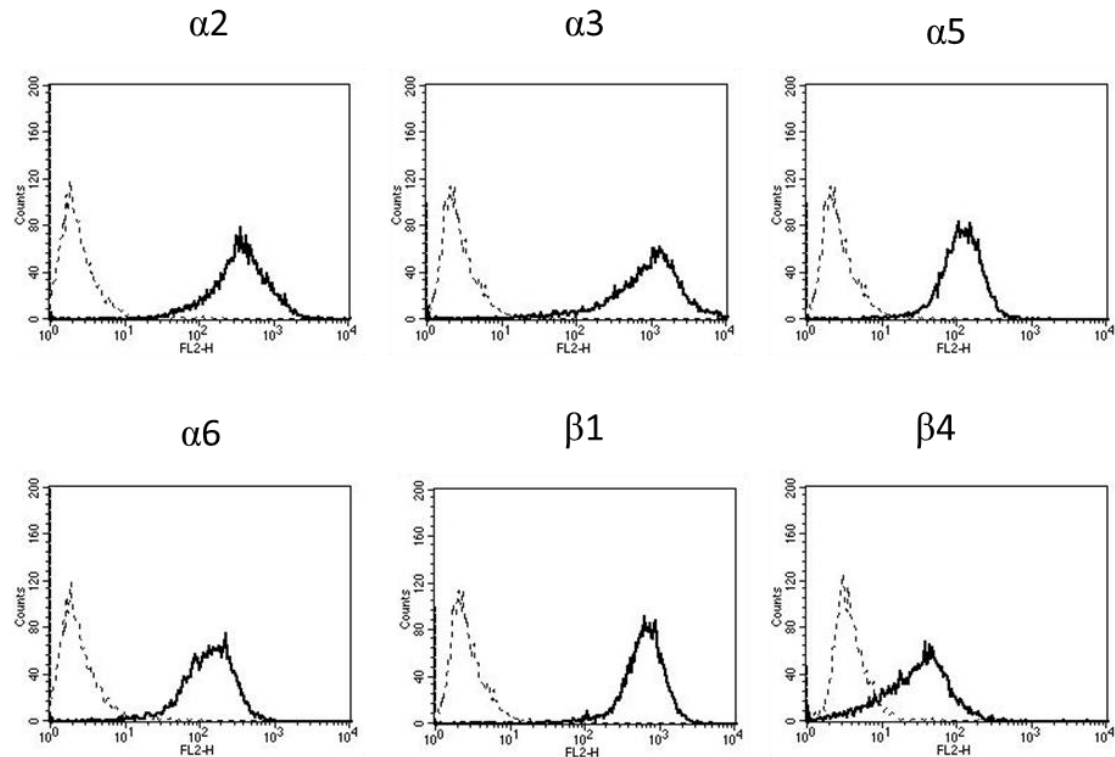


Abbildung 12: Durchflusszytometrie der Oberflächenexpression von alpha- und beta-Integrinen der DU145-Zelllinie. X-Achse stellt die relative logarithmische Verteilung der Fluoreszenzintensität für die Integrine $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ sowie $\beta 1$ und $\beta 4$. Auf der Y-Achse ist die relative Zellzahl aufgetragen (Counts). Gestrichelte Linie: Isotypen IgG1-PE und IgG2a-PE sowie IgG2b. Durchgezogene Linie: Kontrolle. Versuchszahl (n)= 6. Es wurden jeweils 10.000 Zellen gezählt.

In **Abb. 13** zeigen sich die Veränderungen des oberflächlichen Integrinprofils der beiden Zelllinien PC3 und DU145 nach sE-Cadherin-Behandlung in der Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$. Interessanterweise kam es in beiden Zelllinien zu signifikanten Modulationen im Expressionsmuster von den Integrinsubtypen $\alpha 3$ und $\beta 1$. Während der Integrinsubtyp $\alpha 3$ in beiden Zelllinien signifikant vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert wurde, gab es Unterschiede in der Expression von Integrinsubtyp $\beta 1$. So kam es nach sE-Cadherin-Behandlung in der Zelllinie PC3 zur Abnahme von $\beta 1$. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Zunahme der Oberflächenexpression von $\beta 1$ bei der Zelllinie DU145 beobachtet werden. Darüber hinaus blieben gewisse Integrinsubtypen wie $\alpha 1$, $\alpha 4$ und $\beta 3$ auch nach sE-Cadherin-Behandlung an der Oberfläche im Vergleich zum ursprünglichen Oberflächenexpressionsprofil nicht detektierbar. Die Integrine $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ wurden weiterhin exprimiert, jedoch quantitativ kaum signifikant verändert.

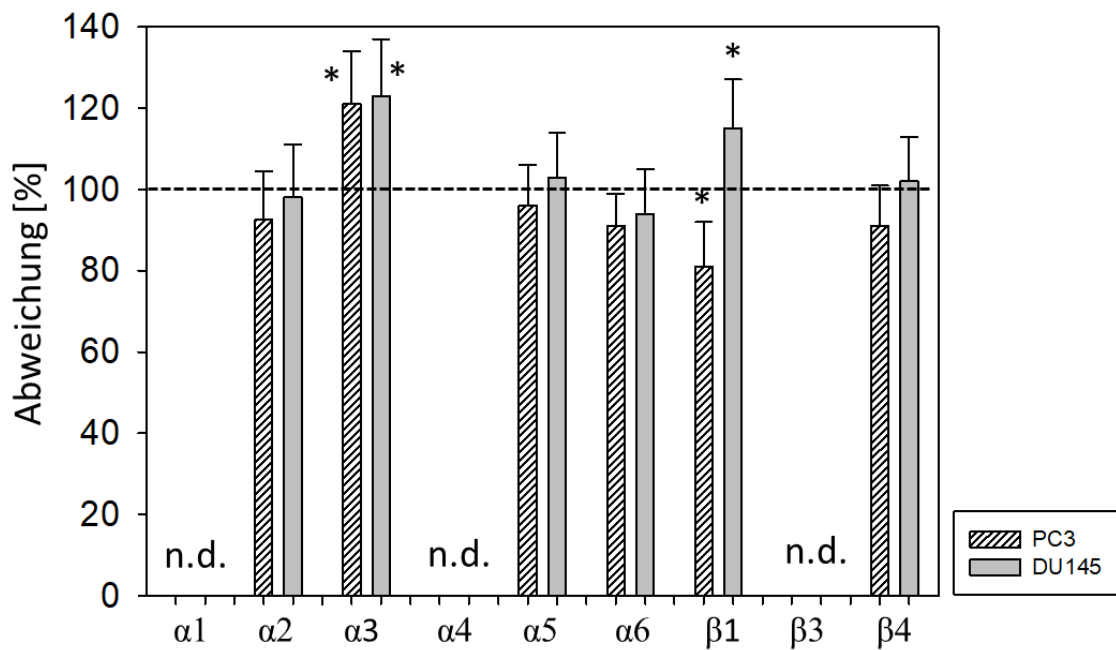


Abbildung 13: Übersichtsbild zur Auswirkung der sE-Cadherin-Behandlung auf das Basis-Integrinprofil der Zelllinien PC3 und DU145. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. X-Achse repräsentiert die Oberflächenexpression der verschiedenen Integrine. Y-Achse stellt die prozentuale Abweichung von der Kontrolle dar. n.d. steht für sehr schwache oder keine Detektion. * kennzeichnet die Signifikanz. Versuchszahl (n)=6

4.6 Western Blot zur Expression von Signal- und Integrin-Proteinen

Mithilfe des Western Blot konnten Rückschlüsse gemacht werden, ob sE-Cadherin in der Konzentration von 5 µg/ml Einfluss auf die Quantität bestimmter Signalproteine sowie Integrine der Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3 hat. Die entsprechenden Veränderungen sind in **Abb. 14** dargestellt. Es wurden insbesondere die Aktivitätszustände relevanter Signalproteine wie ILK (*Integrin-linked Kinase*), FAK (*Focal adhesion Kinase*), phosphoryliertes bzw. aktiviertes pFAK, pAkt (phosphorylierte Protein-Kinase B) sowie der Integrine α3 und β1 untersucht. Unter sE-Cadherin-Behandlung kam es bei DU145 zur Expressionshemmung der Integrine α3 und β1. Zudem zeigte sich eine Suppression von ILK und FAK im Vergleich zur Kontrolle. pFAK konnte bei DU145 nach sE-Cadherin-Behandlung vermehrt detektiert werden. Bei PC3 kam es nach sE-Cadherin-Behandlung der Zellen zu einer Zunahme von α3, FAK, pFAK, wohingegen β1 und ILK unter sE-Cadherin abnahmen. pAkt blieb

bei beiden Zelllinien nicht signifikant beeinflusst (jeweils verglichen mit den entsprechenden Kontrollreihen).

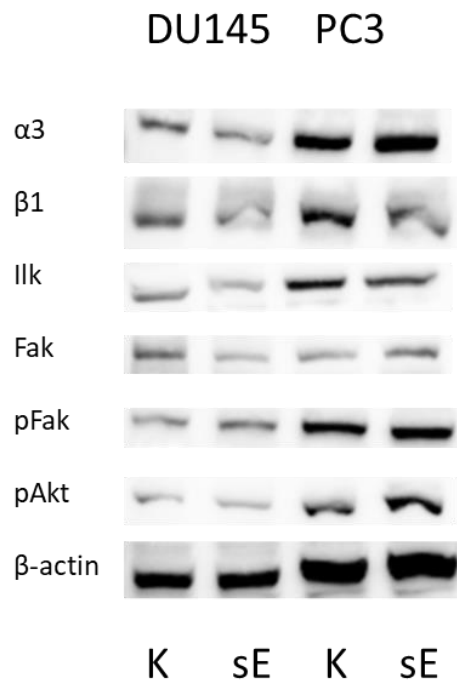


Abbildung 14: Western Blot Analyse der Aktivität ausgewählter Integrine sowie Signalproteine der Zelllinien PC3 und DU145. Die Behandlung der Zelllinien erfolgte im Vorfeld für 4 h im Thermocycler bei 37°C im Brutschrank mit einer sE-Cadherin-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$. ILK = Integrin-linked Kinase, FAK =Focal Adhesion Kinase, pFAK = phosphoryliertes FAK. Das Haushaltsprotein β -Aktin diente als Kontrolle. Es wurde 50 μg Protein pro Probe eingesetzt. Versuchszahl (n)=3.

4.7 Blockade relevanter Integrine

Mithilfe von Blockadestudien konnten wichtige Aussagen über die funktionelle Relevanz von spezifischen Oberflächenintegriren getroffen werden. Im Vorfeld wurden Experimente wie im Abschnitt 4.5 und den **Abb. 11** und **12** dargestellt durchgeführt. Dabei fiel das Augenmerk auf zwei der sechs Integrinsubtypen, welche signifikante Expressionsänderungen nach sE-Cadherin-Behandlung erfuhren, so dass $\alpha 3$ und $\beta 1$ in den folgenden Studien blockiert wurden. Die Ergebnisse der daraufhin durchgeführten Adhäsions- und Chemotaxisversuche sind in **Abb. 15** dargestellt. Unter der Blockade der Integrine $\alpha 3$ und $\beta 1$ kam es bei beiden Zelllinien zur signifikanten Abnahme der Adhäsion auf Kollagen-G. In Chemotaxis-Versuchen und der vorherigen Integrin-Blockade von $\alpha 3$ und $\beta 1$, zeigte sich eine Abnahme des chemotaktischen Verhaltens bei den DU145-

Zellen sowie bei $\beta 1$ und bei PC3-Zellen. Durch die alleinige Blockade von $\alpha 3$ konnte eine Zunahme der Chemotaxis der Zelllinie PC3 bewirkt werden.

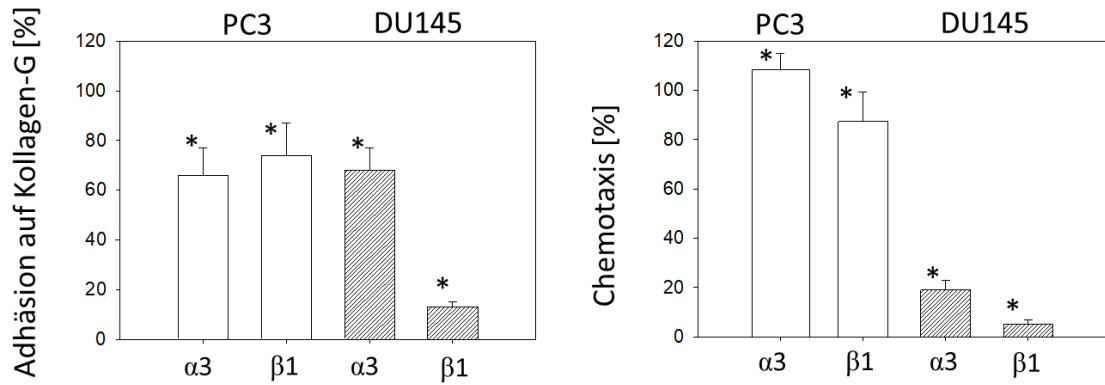


Abbildung 15: Adhäsion auf Kollagen-G und Chemotaxis der getesteten PKZ-Zelllinien nach Blockade der Integrine alpha3 und beta1. Die unbehandelte Kontrolle wird auf 100% gesetzt. Auf der X-Achse sind die blockierten Integrine aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Unterschiede im Vgl. zur Kontrolle in %. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten aus $n = 4$. * zeigt Signifikanzen.

5 Diskussion

Die Zielsetzung dieser experimentellen Arbeit bestand darin, die Wirkmechanismen von sE-Cadherin auf das Zellverhalten von Prostatakarzinomzellen (PKZ) PC3, DU145 und LNCaP zu evaluieren. Unter der Annahme, dass sE-Cadherin als möglicher Biomarker in erhöhten Konzentrationen im Tumormikromilieu vorliegt, wurde postuliert, dass es auch kanzerogene Effekte auf PKZ zu haben scheint.

Anhand verschiedener in vitro Modelle sollte nachfolgend untersucht werden, inwieweit sE-Cadherin mit der Kanzerogenese des PCa assoziiert ist.

Da in der Literatur bislang keine allgemeine sE-Cadherin-Konzentration beim PCa bekannt ist, dienten die ersten Experimente zur Bestimmung der optimalen sE-Cadherin-Arbeitskonzentration, welche für alle nachfolgenden Versuche eingesetzt werden sollte.

In der vorangegangenen Arbeit von Tsauro et al. zeigte sich als zentrales Ergebnis eine signifikante Erhöhung der sE-Cadherin-Konzentration im Serum von Prostatakarzinom-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Eine direkte Korrelation zwischen dem bisherigen Biomarker PSA und sE-Cadherin konnte allerdings nicht bestätigt werden. Mit Hilfe von sE-Cadherin konnten jedoch besonders aggressive Tumoren nach einer radikalen Prostatektomie mit einem Gleason-Score ≥ 7 (hohes Risiko des lokal fortgeschrittenen PCa) präziser als mit dem PSA-Wert detektiert werden. Es bestand weiterhin im Gegenteil zu anderen Studien eine negative Korrelation zwischen sE-Cadherin-Konzentration und dem Gleason-Score [120].

In den eigenen Versuchen konnte belegt werden, dass sE-Cadherin in den besagten PKZ eine Hemmung des Tumorwachstums herbeiführt und gleichzeitig eine Zunahme der Motilität sowie der Invasivität fördert. Offensichtlich scheint sE-Cadherin einen Switch von der Proliferation zur Metastasierung zu verursachen. Die proliferative Aktivität wird hierbei zugunsten der Bewegungsfähigkeit supprimiert, welche wiederum aktiviert wird. Möglicherweise dient sE-Cadherin somit als Disseminations-Promotor des PCa. Weiterhin lassen die ermittelten Resultate vermuten, dass die Wirkung des sE-Cadherins im Organismus in ein komplexes System eingebettet ist, in dem unterschiedliche Zellpopulationen wie zum Beispiel Immun- und

Bindegewebszellen mit den Tumorzellen interagieren. So kann das in-vitro-Modell nur einen Teil der in vivo Prozesse der Kanzerogenese abbilden. Das natürliche Tumormikromilieu kann somit in vitro nur teilweise nachgebildet werden. Im Nachfolgenden sollen die Ergebnisse im Detail vorgestellt und diskutiert werden.

5.1 Einfluss des sE-Cadherins auf die Zellzahl und das Tumorwachstum

In der Literatur sind bereits verschiedene Signal-Mechanismen beschrieben, welche durch eine erhöhte sE-Cadherin Konzentrationen im Tumor-Mikromilieu in Gang gesetzt werden. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Annahme, dass sE-Cadherin durch seine onkogenen Eigenschaften die Zellzahl bzw. das Tumorwachstum beeinflusst. Man geht davon aus, dass im Rahmen der malignen Entartung, das von Tumorzellen abgespaltene sE-Cadherin im Tumormikromilieu biologisch aktiv wirkt und folglich auch das Tumorwachstum auf molekularer Ebene maßgeblich beeinflusst wird [121].

Mithilfe des durchgeführten MTT-Assays wurde im Rahmen dieser Dissertation das Tumorwachstum von drei PCa-Zelllinien unter Einfluss von sE-Cadherin evaluiert. Hierbei konnten signifikante Veränderungen in der Zellzahl beobachtet werden. Erstaunlicherweise modulierte sE-Cadherin das Tumorwachstum der einzelnen PCa-Zelllinien unterschiedlich. So zeigte sich insbesondere eine konzentrationsabhängige und wachstumshemmende Wirkung des sE-Cadherins auf die Androgen-sensitive Zelllinie LNCaP, mit einer maximalen Suppression unter 5 µg/ml sE-Cadherin. Die Zellzahl der beiden Androgen-resistenten Zellreihen PC3 und DU145 hingegen erhöhte sich in Gegenwart einer niedrigen sE-Cadherin-Konzentrationen von 0,1-1,0 µg/ml. Bei PC3-Zellen resultierte diesbezüglich die Applikation von 0,1 µg/ml sE-Cadherin in einer signifikanten Zellzahlzunahme, bei DU145-Zellen galt der gleiche Effekt für 0,5 und 1,0 µg/ml sE-Cadherin, jeweils verglichen zur unbehandelten Kontrollzellreihe (**Abbildung 6**). Lediglich 5 µg/ml sE-Cadherin löste eine signifikante Abnahme der PC3 und DU145- Zellen aus. Gleichzeitig kam es unter dieser Konzentration zum Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase,

was im Einklang mit der durch einen hohen sE-Cadherin-Spiegel verursachten wachstumshemmenden Wirkung steht.

Das unterschiedliche Ansprechen zwischen Androgen-sensitiven und Androgen-resistenten Zellen sowie das konzentrations-abhängige Umschalten zwischen Wachstumserhöhung und Wachstumshemmung der Androgen-resistenten Zellen ist unklar und kann nur spekulativ diskutiert werden.

Möglicherweise ist die Wirkung von sE-Cadherin mit dem Differenzierungsgrad der einzelnen Zelllinien assoziiert. Während die Androgen-sensitiven LNCaP-Zellen als gut differenziert gelten, ist der zellspezifische Differenzierungsgrad der beiden Androgen-resistenten Zelllinien PC3 und DU145 weniger ausgeprägt [122]. Denkbar ist, dass die Interaktion von sE-Cadherin mit dem Liganden je nach Zelltyp und Differenzierungsgrad ein diverses Wachstumssignal vermitteln kann. Weitere zellvergleichende Untersuchungen mittels exogenem sE-Cadherin in den Konzentrationen zwischen 0,1 – 5,0 µg/ml erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Tsauro et al. an zwei unterschiedlichen Zelllinien des Nierenzellkarzinoms [123]. Die Behandlung der beiden Nierenzellkarzinomzelllinien A498 und Caki1 mit den genannten sE-Cadherin-Konzentrationen führte zu einer Abnahme der Zellzahl in MTT-Versuchen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Dieses Ergebnis steht zumindest partiell im Konsens mit den eigenen Wachstumsexperimenten. Unterschiedliches Ansprechen der Nierenzellkarzinomtypen im Sinne einer konzentrationsabhängigen Wachstumsregulation konnte von Tsauro et al. jedoch nicht verzeichnet werden. Tatsächlich handelt es sich bei Caki1 und A498 um gut differenzierte Zelllinien des Nierenzellkarzinoms [124]. Dieses Ergebnis unterstützt somit die Hypothese des variablen, vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen abhängigen Einflusses von sE-Cadherin auf das Tumorstadium. Die hier vorgestellten Daten beziehen sich auf eine maximale sE-Cadherin-Konzentration von 5 µg/ml. In Pilotexperimenten unter Verwendung einer sE-Cadherin Konzentration von 10 µg/ml zeigte sich in den MTT-Analysen ein starker Abfall der Zellzahl unter den Ausgangswert der initial eingestellten Zellen von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Auf weitere Versuche mit 10 µg/ml sE-Cadherin wurde daher verzichtet. Der beobachtete Zellverlust ist möglicherweise auf die drastische Zunahme apoptotischer bzw. nekrotischer Effekte zurückzuführen. Interessanterweise konnte im Rahmen von Apoptose-Versuchen an

Epithelzellen der Niere des nicht tumorösen Typs MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) und der invasiven Zellform (MSV-MDCK) von Inge et al. gezeigt werden, dass sich sE-Cadherin in einer Konzentration von 10 µg/ml anti-apoptotisch auf die Nierenepithelzellen im serumfreien Medium auswirkt [125]. sE-Cadherin schien dabei seine anti-apoptotische Wirkung über membrangebundenes E-Cadherin zu verursachen. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass der anti-apoptotische Effekt von der Menge des membrangebundenen E-Cadherins abhängig ist. Somit können diese Erkenntnisse nicht analog auf die eigenen Versuche mit PKZ übertragen werden, da es womöglich quantitative Unterschiede bezüglich des membrangebundenen E-Cadherins gibt. Weiterhin können aufgrund des unterschiedlichen Versuchsaufbaus die anti-apoptotischen Eigenschaften des sE-Cadherins nicht analog auf die Wirkung im Zusammenhang mit PKZ übertragen werden. Insgesamt bedarf es somit weiterer Versuche, die die Wirkung des sE-Cadherins in höheren Konzentrationen (> 5 µg/ml) auf die Apoptose der PKZ genauer untersuchen.

Die unter niedriger sE-Cadherin-Konzentration (< 5 µg/ml) beobachtete Wachstumszunahme der Tumorzellen wurde bereits in mehreren vorangegangenen Arbeiten analog zu den Ergebnissen mit Androgen-resistenten PKZ (PC3 und DU145) gezeigt [92]. Bezüglich der wachstumsfördernden Wirkung des sE-Cadherins gibt es aktueller Literatur zufolge verschiedene Möglichkeiten, intrazelluläre Signalwege zu aktivieren, welche sich förderlich auf die Zellproliferation auswirken. Einer davon besteht in der Aktivierung enzymgekoppelter membranständiger Rezeptoren. Die nachfolgend entfachten Signalwegkaskaden führen wiederum zu einer Modulierung der Information auf Zellkernebene und damit zu einer Steigerung proliferationsfördernder Mechanismen. sE-Cadherin vermag bisherigen Annahmen zu Folge, auf autokrinem bzw. parakrinem Weg Rezeptoren auf Membranoberflächen zu aktivieren [75]. Eine in diesem Zusammenhang wichtige Rezeptorfamilie, die eine zentrale Rolle hinsichtlich der Zellproliferation sowie des Zellwachstums spielt, ist die Familie des *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Der EGFR ist in der Literatur auch unter dem Namen *human epidermal growth factor-1* (HER1) bekannt. Zu den weiteren Mitgliedern dieser Rezeptorfamilie gehören beispielsweise HER2 (ErbB2) und HER3 (ErbB3)

sowie HER4 (ErbB4) [126]. Spezifische Liganden bewirken eine Homo- oder Heterodimerisierung dieser Rezeptoren, sodass es nachfolgend zu einer aktivierenden Phosphorylierung des Rezeptors sowie weiterer Substrate und damit zur rezeptorvermittelten Signalübertragung ins Zytosol kommt [127]. Interaktionen zwischen der extrazellulären Domäne des *full-length* E-Cadherins und dem EGFR sind bereits beschrieben, welche zu einer Phosphorylierung, Dimerisierung und Autophosphorylierung und damit zur Aktivierung von intrazellulären Kinasen führen [128]. Explizite wachstumsfördernde Eigenschaften des sE-Cadherins im Zusammenhang mit EGFR wurden durch die Arbeitsgruppe von Najy et al. Anhand von Versuchen mit Brustkrebszellen (MCF-7) demonstriert [98]. Es konnte gezeigt werden, dass proteolytisch generiertes sE-Cadherin zu einer direkten Aktivierung des HER2 sowie HER3 führt. Eine ähnliche sE-Cadherin-Wirkung auf das Tumorstadium wurde auch durch die Arbeitsgruppe von Brouxon et al. belegt. Ihre Experimente erfolgten an HER2-positiven Brustkrebszellen. Anders als in den eigenen Versuchen zeigte sich ein proliferationssteigernder Effekt bei Behandlungen mit höheren sE-Cadherin-Konzentration von 10 und 20 µg/ml. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass sE-Cadherin die Proliferation überwiegend durch die Wachstumsrezeptoren HER1 and HER2 steuert [129]. Zusätzlich konnte das gesteigerte Tumorstadium der Brustkrebszellen weiter potenziert werden, wenn sE-Cadherin zusammen mit dem Liganden EGF (*epidermal growth factor*) appliziert wurde. Insbesondere Androgen-refraktäre Prostatakarzinome stellen eine Herausforderung in der urologischen Krebsforschung dar, da sie mitunter über Mechanismen verfügen, sich einer Androgen-unabhängigen Proliferation z.B. EGF-vermittelt zu bedienen [130, 131]. Ob die proliferative Wirkung des sE-Cadherins auf die PKZ, welche in den eigenen Versuchen bei den Androgen-resistenten Zelllinien teils ersichtlich war, EGFR-vermittelt abläuft, ist ein hypothetischer Ansatz und sollte durch weitere Experimente verifiziert werden.

Als weiterer Diskussionspunkt stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der konzentrationsabhängigen Auswirkung des sE-Cadherins auf die Zellzahl hinsichtlich des Androgen-Rezeptors (AR) im PCa gibt. Eine direkte Aktivierung des AR durch sE-Cadherin ist in der Literatur bislang nicht

beschrieben. Dieser Gedankenansatz beruht auf einer reinen Hypothese und es bedarf somit weiterer Experimente, um diese zu belegen.

Die eigenen Western-Blot-Ergebnisse zeigten keine signifikante Zunahme des Proteingehaltes von phosphoryliertem Akt (Serin/Threonin-Kinase) nach sE-Cadherin-Behandlung bei den Zelllinie PC3 und DU145. In seiner phosphorylierten Form gilt Akt als aktiviert. pAkt gilt als Bestandteil des im Mittelpunkt der Zellphysiologie stehenden PI3K/Akt- (Phosphoinositid-3-Kinase/Akt) Signalwegs, welcher wiederum eine große Rolle für die Regulation von Zellgröße, -proliferation und -motilität spielt. Eine Beeinflussung dieses Signalweges über pAkt führt in der Klinik zu vermehrter Proliferation, Tumorwachstum und Überleben vieler Tumorarten durch Hemmung der Apoptose [132]. Das Integrin-assoziierte Signalprotein FAK führt die Signale von EGFR und Integrinen zusammen und fördert die Zellmigration [133]. Generell gilt die entgegengesetzte Regulation von Tumorwachstum und Invasion als bekanntes Phänomen in der onkologischen Forschung [134]. Ganz nach dem Prinzip „der wandernden Krebszelle“ kommt es im Rahmen der bereits erwähnten EMT zu einem Wachstumsstopp der Krebszellen. Auf diese Weise wird die Tumorzelle gleichzeitig motiler und der Vorgang der Metastasierung kann beginnen [135].

Grundsätzlich scheint die sE-Cadherin-Behandlung diverse Auswirkungen auf das Wachstum der PKZ zu haben. So kann unter bestimmten Umständen das Signal vermittelt werden das Zellwachstum einzustellen, um z.B. motiler und invasiver zu werden oder sogar je nach Differenzierungsgrad der Tumorzelle das Wachstum anzuregen. Dies zeigt die Vielfältigkeit der sE-Cadherin-Wirkung bzgl. der Konzentration auf. Dabei scheint die Wirkung von sE-Cadherin auf das Wachstum, je nach Subentität des Tumors unterschiedlich auszufallen. Um den genauen Mechanismus dieses Phänomens näher zu beleuchten, bedarf es weiterer Experimente.

5.2 Einflüsse von sE-Cadherin auf den Zellzyklus

In diesem Abschnitt sollen die Effekte von sE-Cadherin in der Konzentration von 5 µg/ml auf den Zellzyklus der PKZ diskutiert werden. Der Zellzyklus wird in vier verschiedene Phasen eingeteilt, welche in einer bestimmten Reihenfolge ablaufen. Unmittelbar nach der Mitose (Zellteilung) beginnt die G1-Phase, gefolgt von der S-Phase. Danach kann die Zelle, je nach Bedarf in die G0- (Ruhephase) oder S-Phase (Synthesephase) übergehen. Anschließend erfolgt in Vorbereitung auf die nächste Mitose-Phase die G2-Phase [136].

Die Experimente erfolgten wie in **Abb. 7** dargestellt, sowohl an nicht synchronisierten als auch an synchronisierten PKZ. Ziel der Synchronisation war es, alle Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase anzuhalten (Übergang von G1- zu S-Phase), um anschließend alle Zellen synchron in die nächste Phase übergehen zu lassen. Damit konnten interne Schwankungen des Zellzyklus weitestgehend aufgehoben werden, um die Effekte des sE-Cadherins besser beurteilen zu können. Signifikante biologische Veränderungen des Zellzyklusses der PKZ konnten diesbezüglich nur nach erfolgter Synchronisierung gezeigt werden.

Im sE-Cadherin angereicherten Milieu der höheren Konzentration (5 µg/ml) kam es bei allen PKZ zum prozentualen Anstieg der G0/G1-Phase. Zudem ergab sich bei den Zellreihen DU145 und LNCaP eine prozentuale Abnahme der S-Phase bei konstanter G2/M-Phase. Die Resultate der Zelllinie PC3 wiederum belegen im Gegensatz zu den anderen PKZ eine signifikante Abnahme der G2/M-Phase um 41% bei konstant gebliebener S-Phase.

Die Daten lassen sich dahingehend interpretieren, dass die Tumorzellen unter sE-Cadherin in der G0/G1-Phase arretiert wurden. Diese Beobachtung stützt wiederum die Ergebnisse der Wachstumsexperimente und unterstreicht die antiproliferative Wirkung des sE-Cadherins, zumindest für den Konzentrationsbereich von 5 µg/ml sowie eine Zellbehandlung von 48h und 72h. Der Zellarrest in der G0/G1-Phase ist weiterhin ein mögliches Indiz dafür, dass die Proliferation der PKZ zugunsten ihrer invasiven Eigenschaften abgenommen hat. So wird in dem Review von Kohrman et al. der antiproportionale Zusammenhang zwischen Invasion und dem Zellarrest in der G0/G1-Phase beschrieben [137]. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein G0/G1-Arrest benötigt wird, um die Expression der Histon-

Deacetylase (HDAC1)-Gens zu ermöglichen, welche wiederum von großer Wichtigkeit für den Chromatinumbau und die Zelldifferenzierung ist [138, 139]. Durch die HDA-1 wird die Expression proinvasiver Gene und damit die Tumordinvasion gefördert. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Yano, et al. [140]. Darüber hinaus wird im Rahmen der EMT ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase benötigt [141]. Ähnliche Ergebnisse zwischen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase unter sE-Cadherin-Wirkung in der Konzentration von 5 µg/ml an PKZ sind bislang in der Literatur nicht beschrieben worden.

5.3 Auswirkung von sE-Cadherin auf die Adhäsion an EZM-Proteinen und das chemotaktische Verhalten (Migration)

Der Prozess der Zelladhäsion repräsentiert einen wichtigen Abschnitt im Rahmen der Tumorgenese und -Progression. Hierbei unterscheidet man zwischen der Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix sowie der interzellulären Adhäsion. Um derartige Tumoreigenschaften in vitro zu simulieren, dienen Versuche wie Adhäsions- und Migrations-Assays. Diese Methoden erwiesen sich als sehr valide, um die Schritte der Metastasierung nachzuempfinden. Als extrazelluläre Matrix werden Bestandteile im extra- und interzellulären Raum beschrieben, welche verschiedene Zellen geflechtartig umgeben. Dazu gehören unter anderem Kollagen und Fibronectin [142].

Die Anheftung sowie Ablösung von Tumorzellen an bzw. von den Proteinen der extrazellulären Matrix ist ein entscheidender Bestandteil des Metastasierungsvorgangs, welcher bereits an verschiedenen Tumorentitäten untersucht wurde [143]. Im Rahmen dieser Arbeit war es vorgesehen, dass Adhäsionsverhalten der PKZ an zwei grundlegenden EZM- Bestandteilen (Kollagen und Fibronectin) nach sE-Cadherin-Behandlung in vitro zu evaluieren. In den eigenen Versuchen nahm die Adhäsionsfähigkeit an den EZM-Proteinen bei allen PKZ nach sE-Cadherin-Behandlung signifikant ab (**Abbildung 8** sowie **Abbildung 10**). Es lässt sich somit hypothetisieren, dass die adhäsiven Eigenschaften der PKZ an der EZM abnehmen, um dadurch eine erhöhte Motilität zu erlangen. Tatsächlich belegen die hier vorgestellten Daten eine

Zunahme der chemotaktischen Aktivität in Gegenwart von sE-Cadherin (**Abbildung 9**). Die Abnahme der festen Adhäsion der Tumorzellen an die EZM zugunsten einer erhöhten invasiven Beweglichkeit unter sE-Cadherin-Behandlung lässt sich klinisch mit der metastatischen Tumorausbreitung in Zusammenhang bringen.

Die Frage, durch welche Mechanismen bzw. Signalkaskaden das Adhäsions- und Invasionspotenzial der PKZ nach Behandlung mit sE-Cadherin beeinflusst wird, konnte bislang noch nicht hinreichend beantwortet werden. Weitere Experimente sind einzufordern, die diesen Umstand aufgreifen. Ein plausibler und möglicher Erklärungsansatz für die Abnahme der Zelladhäsion könnte auf den zellinternen Verlust von zellmembrangebundenem E-Cadherin zurückführbar sein, wodurch die interzellulären Kontakte aufgelöst werden [144]. Weiterhin ist die homophile Interaktion von freigesetztem sE-Cadherin mit membranständigem E-Cadherin denkbar, so dass über intrazelluläre Signalverschaltungen eine Abnahme der Adhäsion ausgelöst wird [125]. Es erscheint naheliegend, dass der Verlust von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten die Metastasierungskaskade auslöst. Nicht zuletzt könnte sE-Cadherin in spezifischen Konzentrationen im Tumormikromilieu der PKZ einen Einfluss auf die Gentranskription und Biosynthese spezifischer Integrine ausüben, die regulatorisch in den Prozess der Adhäsion und Invasion eingreifen.

Versuche der Arbeitsgruppe von Zuo et al. belegten anhand von Experimenten an SCC10A-Zellen, die dem Kopf - Hals - Plattenepithelkarzinom (*head and neck squamous cell carcinoma* = HNSCC) zugeordnet sind, dass die externe Stimulation des EGFR mit dem Wachstumsfaktor EGF eine vermehrte sE-Cadherin-Produktion zur Folge hat [145]. Die Behandlung löste zudem eine Abnahme der Zelladhäsion an EZM-Proteinen aus. Interessanterweise war die Induktion dieses Prozesses abhängig von der EGF-Konzentration (und somit auch der sE-Cadherin-Konzentration). Hier finden sich Parallelen zu der eigenen Arbeit, bei der ebenfalls die sE-Cadherin-Konzentration, zumindest in Bezug auf die Androgen-resistenten Tumorzellen, die Art der Adhäsionsbeeinflussung „festlegte“. Die Arbeitsgruppe verweist darüber hinaus auf ein verstärktes Invasions- sowie Migrationsverhalten. Die Produktion des sE-Cadherins konnte in SCC10A auf die enzymatische Spaltung von E-Cadherin als unmittelbare Folge der Aktivierung des ERK-1/2 (*extracellular-*

signal regulated kinases) und PI3K- Signalwegs durch MMP-9 zurückgeführt werden. Das hierbei gebildete und sezernierte sE-Cadherin könnte wiederum in einer Feedbackschleife die Produktion von MMP-9 stimulieren [145].

Die Beobachtung, dass sE-Cadherin die chemotaktische Aktivität der PKZ reguliert, ist von Bedeutung. Ein erhöhtes chemotaktisches Potential der Tumorzellen ist für das invasive Voranschreiten relevant. Als Chemotaxis wird im Allgemeinen die gerichtete Zellbewegung entlang eines Stoffgradienten zum Ort der höheren Nährstoffkonzentration definiert. Die Assoziation zwischen chemotaktischer Motilität und Metastasierung in das Zielgewebe ist beschrieben [146]. Die Motilität ist die wesentliche Bedingung der Tumorzellen, um einen schnelleren und gezielteren Anschluss an das nährstoffreiche Blutgefäßsystem zu bekommen und damit auch an andere Orte des Organismus migrieren zu können. Es muss jedoch hinzugefügt werden, dass bezüglich der Tumorversorgung weitere Prozesse, wie die Angiogenese induziert werden. Dieser Vorgang wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht evaluiert. Die Behandlung der drei PKZ mit 5 µg/ml sE-Cadherin induzierte durchweg eine signifikante Zunahme der Chemotaxis (s. **Abbildung 9** bis **Abbildung 10**). Der beobachtete Effekt war dabei bei der Zelllinie PC3 stärker ausgeprägt als bei der Zelllinie DU145. Analog zu den eigenen Ergebnissen konnten auch Johnson et al. eine erhöhte Zellmigration nach sE-Cadherin-Behandlung von Pankreaskarzinomzellen zeigen [147]. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe von Chunthapong et al. in Versuchen hinsichtlich der Bedeutung des E-Cadherin und seiner parakrinen Wirkung auf DU145-Zellen [148]. Im Vorfeld erfolgte eine Zelltrennung durch Selektion der nativen DU145-Zellen mittels Migrationsversuchen (Zweikammersystem) in einen weniger invasiven Subtyp (DU145-E) und einen invasiveren Subtyp (DU145-F). Mithilfe des Western Blots zeigte sich, dass der Gehalt an E-Cadherin bei dem nativen DU145 sowie der weniger invasiven Form DU145-E weitgehend gleich blieb, während er bei DU145-F signifikant abnahm. Anhand der drei DU145-Gruppen erfolgten weiterhin Migrations-Versuche. Interessanterweise kam es hierbei zu einer Zunahme der Invasion und Migration von DU145-Subtypen, welche verglichen miteinander einen um 10% verminderten E-Cadherin-Gehalt aufwiesen. Simultan konnte ein 80 kDa großes E-Cadherin-Fragment (entsprechend dem sE-Cadherin) im Medium detektiert werden, welches

seinerseits ebenfalls eine Zunahme der Migration und Invasion in E-Cadherin positiven DU145 bewirkte [148]. Passend zu den eigenen Ergebnissen demonstrierten auch Brouxon et al. an UV-Licht induzierten Plattenepithelkarzinomen der Haut, dass sE-Cadherin in der Konzentration von 20 µg/ml durch eine HER (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) - Aktivierung den nachgeschalteten MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) und PI3K/Akt-Signalweg stimuliert und dadurch die Expression proinvasiver MMPs (u.a. MMP-9) gesteigert wird. Folglich konnte eine Zunahme des Migrations- sowie Invasionspotentials bestätigt werden [101]. In Experimenten der Arbeitsgruppe von Teng et al. am oropharyngealen Plattenepithelkarzinom der Zelllinie FaDu konnte gleichfalls eine sE-Cadherin-induzierte Zellmigration in Gegenwart einer Konzentration von 10 und 20 µg/ml beobachtet werden [149].

Weitere Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten (Brust-, Ovarial- und Prostatakarzinom) belegen ebenfalls eine Steigerung des Migrationspotentials nach Behandlung der Tumorzellen mit sE-Cadherin [150, 151].

Anhand der eigenen sowie der publizierten Daten lässt sich somit schlussfolgern, dass sE-Cadherin womöglich durch die geschilderten Mechanismen und Signalwege maßgeblich die Zelladhäsion bei gleichzeitigem Anstieg der Chemotaxis der PKZ herunterreguliert. Dies kann klinisch als Voranschreiten des Tumors zu einer aggressiveren Form angesehen werden.

5.4 Auswirkung von sE-Cadherin auf die Integrine

Membrangebundene Zelladhäsionsmoleküle der Integrin-Familie gehören zu den entscheidenden Regulatoren der Adhäsion, Invasion, Migration sowie der EMT und sind maßgeblich in den Metastasierungsprozess verschiedener Krebsarten involviert [152]. Obwohl einige mit den Integrinen verknüpfte Signalwege bereits umfassend erforscht sind, wirft ihr exakter Funktionsmechanismus noch zahlreiche Fragen auf. Integrine befinden sich auf allen Zellen des Organismus. Aktuell sind 24 Integrinkomplexe beschrieben, die sich aus α - und β - Untereinheiten zusammensetzen [119]. Einigen Quellen zufolge sind die meisten Integrin α - und β - Subtypen beim PCa

herunterreguliert [153]. Die Integrin-Funktionalität wird dem aktuellen Kenntnisstand zufolge sowohl Zelltyp- als auch Liganden-spezifisch definiert. Dabei wird der Funktionsmechanismus der Integrine in ihrer Rolle als Mechanorezeptoren oftmals durch Tumorzellen gezielt im Rahmen der Kanzerogenese umfunktioniert. Die initiale Vorstellung, dass Integrine primär als Adhäsionsmoleküle der EZM dienen, hat somit längst ausgedient. So haben eine Reihe von Studien bereits belegen können, dass eine modifizierte Integrinoberflächenexpression sowie eine damit einhergehende Funktionsänderung auf zellulärer Ebene zum Prostatakarzinomprogress beitragen [154, 155]. Durch die Ergebnisse der eigenen Versuche konnte grundlegend gezeigt werden, dass sich das Oberflächenexpressionsprofil der Integrine zwischen den einzelnen Zelllinien des PCa sehr ähnelt (s. **Abbildungen 11** und **12**). So konnten in allen PCa-Zelllinien Integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 4$ messbar an der Oberfläche exprimiert werden. Die Integrine $\alpha 1$, $\alpha 4$ und $\beta 3$ hingegen waren nicht detektierbar. Die sE-Cadherin-Behandlung der PKZ (PC3 und DU145) in der Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ führte zu einer Veränderung der Oberflächenexpression einiger Integrinsubtypen. So konnte eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression des Integrinsubtyps $\alpha 3$ in beiden Zelllinien beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde $\beta 1$ bei der Zelllinie PC3 verringert und bei DU145 vermehrt an der Oberfläche exprimiert, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen (s. **Abbildung 13**). Die Hochregulierung des Oberflächenintegrins $\alpha 3$ sowie Verringerung von $\beta 1$ bei der Zelllinie PC3 steht darüber hinaus im Konsens mit den Ergebnissen der Proteinbestimmung mittels Western-Blot. Somit besteht die Vermutung, dass bei den PC3-Zellen womöglich eine Hochregulation von $\alpha 3$ sowohl intrazellulär im Rahmen der Proteinbiosynthesenerhöhung als auch zusätzlich im Sinne eines vermehrten Einbaus an der Zellmembran stattgefunden hat. Die Reduktion von $\beta 1$ bei der Zelllinie PC3 ist womöglich ebenfalls sowohl auf die verringerte Proteinbiosynthese als auch auf die Internalisierung durch Endozytose des Integrins von der Zellmembran nach intrazellulär zurückführbar. Bei der Zelllinie DU145 zeigten sich die Integrine $\alpha 3$ und $\beta 1$ in den Western-Blot-Versuchen quantitativ vermindert, wohingegen die Oberflächenexpression beider Integrinsubtypen vermehrt detektierbar war. Im Gegensatz zu PC3-Zellen ist bei den DU145-Zellen womöglich eine

Umverteilung der beiden Integrinsubtypen aus dem Zellinnern zur Zellmembran nach erfolgter sE-Cadherin-Behandlung denkbar.

Da Integrine grundsätzlich nicht intrinsisch proteolytisch wirken können, gibt es verschiedene andere Arten der Integrin-assoziierten Signaltransduktion. Man unterscheidet hierbei zwischen dem *inside-out*- und *outside-in-signaling*. Beim Ersteren wird der intrazellulär gelegene Integrinanteil durch Kinasen aktiviert, was wiederum zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Ligandenbindungsstelle führt. Auf diese Weise kann beispielsweise das Bindungsverhalten an der EZM beeinflusst werden. Bei dem *outside-in-signaling* wird durch Bestandteile der EZM (Fibronektin, Kollagen etc.) die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle aktiviert. Dies kann wiederum zu einer intrazellulären Aktivierung von Signalproteinen wie FAK, der Tyrosinkinase Src oder PI3K sowie weiterer nachgestellter Signalwege führen [156]. Über diese Integrin-assoziierten Signalwege kann die Tumorzelle den Zellzyklus, das Zellüberleben, Proliferation und Migration sowie Zelldifferenzierung steuern.

Die zellspezifische Integrinfunktion der PKZ wurde in dieser Arbeit durch Blockadestudien untersucht. So kam es in den Blockadeversuchen (s. **Abbildung 15**) bei PC3- und DU145-Zellen, trotz des unterschiedlichen postinterventionellen Oberflächenexpressionsprofils und der Integrinquantität bei der separaten Blockade von $\alpha 3$ und $\beta 1$ durch monoklonale Antikörper, jeweils zur Abnahme der Adhäsion an immobilisierten Kollagen-G. Der stärkste adhäsionshemmende Effekt an Kollagen-G zeigte sich bei der Blockade vom Integrinsubtyp $\beta 1$ bei DU145. Bei der Blockade der genannten Integrine und anschließender Versuche zur Chemotaxis ergaben sich jedoch Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. So kam es zu einer signifikanten Zunahme des chemotaktischen Potentials in der Zelllinie PC3 und der alleinigen Blockade des Subtyps $\alpha 3$. Die separate Blockade des Subtyps $\beta 1$ führte hingegen in beiden Zelllinien zur Abnahme der Chemotaxis verglichen mit der Kontrolle. Interessanterweise zeigte sich auch hier der stärkste Effekt der Chemotaxisabnahme bei der Zelllinie DU145 und der Blockade von beiden Subtypen $\alpha 3$ und $\beta 1$.

Die unter sE-Cadherin beobachtete Zunahme der Oberflächenexpression von $\alpha 3$ und $\beta 1$ bei DU145 scheint wohl in unmittelbarem Zusammenhang mit der

Invasionserhöhung (Chemotaxis) zu stehen. Zumindest führte die Blockade von $\beta 1$ in beiden Zelllinien zur Chemotaxis-Abnahme und ist wahrscheinlich somit primär in die Chemotaxis eingebunden. Aber auch $\alpha 3$ ist der Literatur zufolge stark in die Motilität und Invasion eingebunden [157]. Die $\alpha 3$ -Blockade führte in den eigenen Experimenten jedoch nur bei DU145-Zellen zur Chemotaxisabnahme. Warum die Blockade von $\alpha 3$ bei PC3-Zellen die Migration fördert, ist nicht ganz klar und bedarf weiterer Experimente. Die beschriebenen quantitativen Veränderungen der Integrinsubtypen sind scheinbar nicht zwingend an eine Veränderung der Integrinfunktion im gleichen Maße gebunden. So wird in einigen Arbeiten der urologischen Krebsforschung vermutet, dass das native Integrinprofil, welches Zelltyp-spezifisch zu sein scheint, die Reaktion bezüglich der Integrinmodulation festlegt [154, 155]. Wie bereits aus **Abb. 11** und **12** ersichtlich sind die Oberflächenexpressionen der Integrine zwar ähnlich, jedoch zeigen sich deutliche quantitative Unterschiede. Basierend darauf können die Zelllinien DU145 und PC3 durchaus unterschiedlich auf sE-Cadherin im molekularen Sinne bezüglich dessen Beeinflussung des Integrinoberflächenprofils und der Funktionsänderung reagieren.

Insgesamt scheint die sE-Cadherin-bedingte Oberflächenmodifikation des $\beta 1$ -Integrins sowohl bei der Adhäsion an die EZM als auch bei der Migration von PCa involviert zu sein. Die unterschiedliche Regulation dieses Rezeptors in PC3- versus DU145-Zellen erlaubt jedoch keine einheitliche Interpretation der Wirkungsweise. Das Integrin $\beta 1$ gehört zu den Aktivatoren des PI3K/Akt-Weges und spielt prinzipiell eine wichtige Rolle in Migrations- und Adhäsionsereignissen von Tumorzellen [158]. Ähnlich zu den hier präsentierten Resultaten legen Kurozumi et al. eine positive Korrelation zwischen $\beta 1$ -Expression und PC3-Invasion nahe [159]. Zur exakten Analyse der Rolle einzelner Integrin-Subtypen bedarf es jedoch weiterer Nachforschungen.

Unter der sE-Cadherin-Behandlung der PKZ wurden neben der Oberflächenexpression von Integrinen auch Integrin-assoziierte Signalproteine wie ILK und FAK beeinflusst. So führte die Behandlung der PKZ mit 5 $\mu\text{g/ml}$ sE-Cadherin zu einer Herunterregulation von ILK sowohl in DU145- als auch in PC3-Zellen. ILK dient als zwischengeschaltete Kinase und Vermittler der Signaltransduktion zwischen den Aktinfilamenten des Zytoskeletts und den

Bestandteilen der EZM [160]. Der zytoplasmatische Anteil des β 1-Integrins steht darüber hinaus in Assoziation mit ILK [161]. Basierend darauf kann geschlussfolgert werden, dass eine Herunterregulation von ILK womöglich eine reduzierte Integrin-vermittelte Adhäsion der PCa-Tumorzellen an die EZM ausgelöst hat. Die Aussage wird durch die eigenen Adhäsions-Versuchsergebnisse bestätigt. Neben ILK dient auch die Thyrosin-Kinase FAK als ein weiterer wichtiger Vermittler Integrin-assoziiierter Signalwege im Hinblick auf Tumormotilität sowie Tumorstadium. So konnte pFAK bei DU145-Zellen nach sE-Cadherin-Behandlung vermehrt detektiert werden. Auch bei PC3-Zellen kam es nach sE-Cadherin-Behandlung zu einer Zunahme von FAK, pFAK und pAkt. Womöglich ist eine vermehrte Phosphorylierung von FAK zu pFAK eingetreten. FAK ist als Signalprotein vor allem in die Chemotaxis und Migration eingebunden. Insbesondere bei *high-grade* Adenokarzinomen der Prostata und in metastasiertem PCa zeigt sich eine vermehrte FAK-Expression [162]. In-vitro-Studien eines zuvor disseminierten PCa am Mausmodell konnten darüber hinaus eine Interaktion von aktivierten β 1-Integrin mit FAK nachweisen. Hier kam es zur anschließenden Phosphorylierung von FAK und einer PI3-Kinase-vermittelten Akt-Aktivierung [163]. Über den genannten Signalweg wird auch das vermehrte Zellüberleben sowie eine Zunahme der Motilität und Extravasation der Tumorzellen verschiedener Entitäten gewährleistet [164, 165]. Auf welchem Weg sE-Cadherin zu einer Expressionsabnahme von ILK sowie einer Zunahme der FAK-Expression führt und ob es eine direkte Interaktion zwischen β 1 sowie α 3 gibt, ist hierbei nicht klar.

Ein zentraler und interessanter Aspekt dieser Arbeit ist die vermehrte Expression der Integrine α 3 und β 1 bei der PCa-Zelllinie PC3, welche sich nach einer sE-Cadherin-Behandlung messen ließ. Ob dies als direktes Indiz für die Bildung eines spezifischen α 3 β 1-Integrinrezeptors nach sE-Cadherin-Behandlung gewertet werden kann, bleibt dabei ungeklärt. Man könnte jedoch annehmen, dass der α 3 β 1-Integrinrezeptor als möglicher Vermittler der Migration bei den PC3-Zellen dient. Vorausgegangene Studien haben zeigen können, dass humane Prostatakarzinome verschiedene Integrin-Subtypen exprimieren können und verweisen dabei unter anderem auch auf die Ausprägung des α 3 β 1-Integrinrezeptors [166]. Zu den bekannten

Hauptliganden des Integrinrezeptors $\alpha 3\beta 1$ gehören einige Kollagen-Typen wie Typ I und VI sowie Laminin-1 und Fibronectin [167, 168]. Die Rolle des $\alpha 3\beta 1$ -Integrinrezeptors bei der Tumorinvasion und Metastasierung wird aktuell kontrovers diskutiert. So liegen Arbeiten vor, welche eine positive Korrelation zwischen Tumorprogress und vermehrter Expression des $\alpha 3\beta 1$ -Rezeptors zeigen und somit zumindest einen Teil der eigenen Ergebnisse und Hypothesen stützen [169, 170]. Am Magenkarzinom konnten Ura et al. beispielsweise zeigen, dass eine vermehrte Expression des $\alpha 3\beta 1$ -Rezeptors zu einer Zunahme der Fernmetastasierung und der Tumorzellinvasion führt [171]. Analog dazu konnte bei der Behandlung von Brustkrebszellen mit $\alpha 3$ -Integrin-Antikörpern und dem vorherigen Nachweis des $\alpha 3\beta 1$ -Rezeptors eine Abnahme der Migration und Invasion der Krebszellen bewirkt werden [156]. Die eigenen Versuche zeigten im Gegensatz dazu eine Migrationsabnahme nur bei der Blockade von $\beta 1$, nicht jedoch von $\alpha 3$. Ganz im Gegenteil führte die separate $\alpha 3$ Blockade zur Migrationszunahme.

Es ist also davon auszugehen, dass nach sE-Cadherin-Behandlung an dem komplexen Vorgang der Metastasierung des PCa nicht nur ein Integrinsubtype beteiligt ist, sondern dass mehrere Integrine mit den entsprechenden Heterodimeren, involviert sind. Weiterhin lassen sich die Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass sE-Cadherin einen Integrinsubtype nicht nur in seiner Quantität, sondern auch in seiner Funktion zu verändern scheint. Diese Veränderungen haben wiederum einen unterschiedlichen zellspezifischen Einfluss auf die Adhäsion und Chemotaxis des PCa. Insbesondere die sE-Cadherin induzierte Wirkung des Integrinsubtyps $\beta 1$ aber auch partiell $\alpha 3$ ist maßgeblich an den invasiven und motilen Eigenschaften der PKZ beteiligt. Die eigenen Ergebnisse haben gezeigt, dass Integrinrezeptoren nicht nur einen wichtigen prognostischen, sondern auch einen therapeutischen Marker (Targetprotein) darzustellen vermögen.

6 Zusammenfassung / Summary

6.1 Zusammenfassung

Zur bisherigen Basisdiagnostik bei klinischem Verdacht eines PCa wird den aktuellen Leitlinien zufolge, neben einer fundierten Anamnese und körperlicher Untersuchung, die Bestimmung des PSA-Wertes gezählt. Seit nun mehr als zwei Jahrzehnten hat sich die PSA-Bestimmung zur Früherkennung, aber auch der Überwachung von Patienten mit bereits diagnostiziertem PCa bewährt. Ob die Bestimmung des PSA-Wertes die PCa-spezifische Mortalität adäquat widerspiegelt, wird allerdings in zahlreichen Expertenkreisen weiterhin kontrovers diskutiert. Anlässlich dessen soll die Erforschung neuer Biomarker dazu dienen, das Risiko eines aggressiven PCa gezielter zu erfassen und behandeln zu können. Die Arbeitsgruppe von Tsaur et al. hat in vorausgegangenen Studien auf das vielversprechende Potential von sE-Cadherin als möglichen Biomarker beim PCa hingewiesen [92]. Basierend darauf wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich das Serumprotein sE-Cadherin auf PCa-Zelllinien vor allem in Hinblick auf die Metastasierung des PCa am in vitro Modell auswirkt. Die Experimente erfolgten an den beiden Androgen-resistenten Zellen PC3 und DU145 sowie der Androgen-sensitiven Zelllinie LNCaP nach Behandlung mit sE-Cadherin. Unbehandelte Zellen dienten jeweils als Kontrolle. Die ersten Versuche beschäftigten sich damit, eine Arbeitskonzentration des sE-Cadherins zu etablieren, welche nachfolgend für alle weiteren Versuche genutzt werden konnte. Die Arbeitskonzentration von sE-Cadherin wurde auf 5 µg/ml festgelegt. Mithilfe des MTT-Assays wurde nachfolgend das Zellwachstum untersucht. Auswirkungen von sE-Cadherin auf den Zellzyklus der genannten PCa-Zelllinien wurden mithilfe der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS) nach erfolgter Zell-Synchronisation evaluiert. Der Einfluss von sE-Cadherin auf die einzelnen Schritte der Metastasierung wurde durch Migrations- und Invasions- sowie Adhäsions-Versuchen an Zellmatrixproteinen (immobilisiertes Kollagen und Fibronectin) untersucht. Mithilfe der Durchflusszytometrie konnte die Beeinflussung von sE-Cadherin auf die Integrinoberflächenprofile analysiert werden. Zur Evaluation relevanter Signalwege erfolgten Western-Blot-Versuche, in denen der

Expressionsstatus von Integrin-assoziierten Signalproteinen untersucht wurde. Blockade-Studien dienten der Überprüfung der funktionellen Relevanz einzelner Integrine. Die Behandlung der PCa-Zellen mit sE-Cadherin in der Konzentration von 5 µg/ml führte zur signifikanten Abnahme des Tumorwachstums. Die Zellzyklus-Analyse zeigte einen vermehrten Zell-Arrest in der G0/G1-Phase sowie Abnahme der S-Phase. Des Weiteren führte die sE-Cadherin-Applikation bei allen drei PCa-Zelllinien zur Abnahme der Adhäsionsfähigkeit an Kollagen und Fibronectin. Im Gegensatz dazu konnte gleichzeitig eine Erhöhung der chemotaktischen Bewegung beobachtet werden. Unter der sE-Cadherin-Behandlung kam es zur signifikanten Veränderung der Oberflächenprofile der Integrin-Subtypen $\alpha 3$ und $\beta 1$. Dessen physiologische Relevanz konnte in Blockadestudien überprüft werden. Es zeigte sich, dass beide Subtypen, jedoch insbesondere $\beta 1$, in die Adhäsion und Chemotaxis involviert sind. Abschließend kann in Zusammenschau der Experimente und dessen Resultate geschlossen werden, dass sE-Cadherin maßgeblich das Metastasierungspotenzial der verschiedenen Prostatakarzinomzellen steigert, indem es das Zellwachstum stagnieren lässt und gleichzeitig das Herablösen der Tumorzellen von der extrazellulären Matrix sowie den Anschluss an das Blut-/Lymphabflusssystem erleichtert.

6.2 Summary

According to the current guidelines, the determination of the PSA value, in addition to a well-founded anamnesis and physical examination, is counted among the basic diagnostics for clinical suspicion of PCa. For more than two decades now, PSA determination has proven its worth for early detection, but also for monitoring patients with already diagnosed PCa. However, whether the determination of the PSA value adequately reflects the PCa-specific mortality is still controversially discussed in numerous expert circles. In view of this, research into new biomarkers should help to better target and treat the risk of aggressive PCa. The research group of Tsaur et al in previous studies pointed out the promising potential of sE-cadherin as a possible biomarker in PCa [92]. Based on this, the present work investigated the effect of serum protein sE-cadherin on PCa cell lines especially with regard to PCa metastasis using in vitro model. The experiments were performed on the two androgen-resistant cells PC3 and DU145 as well as the androgen-sensitive cell line LNCaP after treatment with sE-cadherin. Untreated cells served as controls in each case. The first experiments were concerned with establishing a working concentration of sE-cadherin, which could subsequently be used for all further experiments. The working concentration of sE-cadherin was set at 5 µg/ml. Cell growth was subsequently investigated using the MTT assay. Effects of sE-cadherin on the cell cycle of the above PCa cell lines were evaluated using fluorescence-activated cell analysis (FACS) after cell synchronization was achieved. The influence of sE-cadherin on each step of metastasis was investigated by migration, invasion and adhesion experiments on cell matrix proteins (immobilized collagen and fibronectin). Flow cytometry was used to analyze the effect of sE-cadherin on integrin surface profiles. Western blot experiments were performed to evaluate relevant signaling pathways by examining the expression status of integrin-associated signaling proteins. Blockade studies served to verify the functional relevance of individual integrins. Treatment of PCa cells with sE-cadherin at the concentration of 5 µg/ml resulted in significant decrease of tumor growth. Cell cycle analysis showed increased cell arrest in G0/G1 phase and decrease in S phase. Furthermore, sE-cadherin application led to a decrease in adhesion ability to collagen and fibronectin in all three PCa

cell lines. In contrast, an increase in chemotactic movement was observed simultaneously. Under sE-cadherin treatment, there was a significant change in the surface profiles of integrin subtypes $\alpha 3$ and $\beta 1$. Its physiological relevance could be verified in blockade studies. Both subtypes, but especially $\beta 1$, were shown to be involved in adhesion and chemotaxis. Finally, in synopsis of the experiments and their results, it can be concluded that sE-cadherin significantly enhances the metastatic potential of various prostate carcinoma cells by stagnating cell growth while facilitating tumor cell detachment from the extracellular matrix and connection to the blood/lymphatic drainage system.

7 Literatur

1. WHO. *Häufigste Todesursachen in Europa: Faktenblatt 2013* [cited 2013 13.03.2013]; Available from: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/185312/Leading-causes-of-death-in-Europe-Fact-Sheet-Ger.pdf?ua=1.
2. Bosetti, C., et al., *Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(10): p. 2657-71.
3. Arnold, M., et al., *Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory*. *Eur J Cancer*, 2015. **51**(9): p. 1164-87.
4. Schroder, F.H., et al., *Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(13): p. 1320-8.
5. Tsauro, I., et al., *sE-cadherin serves as a diagnostic and predictive parameter in prostate cancer patients*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015. **34**: p. 43.
6. Thüroff, J.W., *Operative Anatomie der Prostata*, in *Die Urologie*, M.S. Michel, et al., Editors. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1119-1131.
7. Djavan, B., *Urologie und urologische Chirurgie*. 2006: Facultas.
8. Zamecnik, P. and U. Müller-Lisse, *Prostata und Samenblasen*, in *Urogenitale Bildgebung*. 2011, Springer. p. 179-207.
9. Steger, K., *Anatomische und physiologische Grundlagen der Fertilität und der sexuellen Funktion*, in *Die Urologie*. 2016, Springer. p. 1553-1560.
10. Keck, T. and U.T. Hopt, *Onkologische Chirurgie bei alten Patienten: Risikoassessment, Therapiewahl, Limitationen*. 2016: Springer-Verlag.
11. Bostwick, D.G., et al., *Human prostate cancer risk factors*. *Cancer*, 2004. **101**(S10): p. 2371-2490.
12. Jansson, K.F., et al., *Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer*. *Eur Urol*, 2012. **62**(4): p. 656-61.
13. Hjelmberg, J.B., et al., *The heritability of prostate cancer in the Nordic Twin Study of Cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. **23**(11): p. 2303-10.
14. Amin Al Olama, A., et al., *Multiple novel prostate cancer susceptibility signals identified by fine-mapping of known risk loci among Europeans*. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(19): p. 5589-602.
15. Al Olama, A.A., et al., *A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer*. *Nat Genet*, 2014. **46**(10): p. 1103-9.
16. Hemminki, K., *Familial risk and familial survival in prostate cancer*. *World J Urol*, 2012. **30**(2): p. 143-8.
17. Gronberg, H., *Prostate cancer epidemiology*. *Lancet*, 2003. **361**(9360): p. 859-64.
18. Nelson, W.G., A.M. De Marzo, and W.B. Isaacs, *Prostate cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(4): p. 366-81.
19. Michaud, D.S., et al., *A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer*. *Cancer Causes Control*, 2001. **12**(6): p. 557-67.
20. Whittemore, A.S., et al., *Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(9): p. 652-61.

21. Fabiani, R., et al., *A Western Dietary Pattern Increases Prostate Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Nutrients*, 2016. **8**(10).
22. Lund Nilssen, T.I., R. Johnsen, and L.J. Vatten, *Socio-economic and lifestyle factors associated with the risk of prostate cancer*. *Br J Cancer*, 2000. **82**(7): p. 1358-63.
23. Shafique, K., R. Oliphant, and D.S. Morrison, *The impact of socio-economic circumstances on overall and grade-specific prostate cancer incidence: a population-based study*. *Br J Cancer*, 2012. **107**(3): p. 575-82.
24. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
25. Fitzmaurice, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*. *JAMA Oncol*, 2016.
26. Barnes, B. and K. Kraywinkel, *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2017.
27. Potosky, A.L., et al., *The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer*. *Jama*, 1995. **273**(7): p. 548-52.
28. Dickinson, J., et al., *Trends in prostate cancer incidence and mortality in Canada during the era of prostate-specific antigen screening*. *CMAJ Open*, 2016. **4**(1): p. E73-9.
29. Bouchardy, C., et al., *Recent trends in prostate cancer mortality show a continuous decrease in several countries*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(2): p. 421-9.
30. Levi, F., et al., *Leveling of prostate cancer mortality in Western Europe*. *Prostate*, 2004. **60**(1): p. 46-52.
31. Koch-Institut, R. *Erster „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland“ vorgestellt (Gemeinsame Pressemitteilung von Bundesministerium für Gesundheit und Robert Koch-Institut)*. 2016 29.11.2016; Available from: http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2016/17_2_016.html.
32. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
33. Busch, C., *Radical prostatectomy versus watchful waiting in localized prostate cancer: The Scandinavian prostate cancer group-4 randomized trial*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**: p. 1144-54.
34. Roehl, K.A., et al., *Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results*. *J Urol*, 2004. **172**(3): p. 910-4.
35. Schroder, F.H., et al., *Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(11): p. 981-90.
36. Sandblom, G., et al., *Randomised prostate cancer screening trial: 20 year follow-up*. *Bmj*, 2011. **342**: p. d1539.
37. Hara, M., et al., *Some physico-chemical characteristics of"-seminoprotein", an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII*. *Nihon hōigaku zasshi= The Japanese journal of legal medicine*, 1971. **25**(4): p. 322.

38. Papsidero, L.D., et al., *A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients*. Cancer research, 1980. **40**(7): p. 2428-2432.
39. Lilja, H., et al., *Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen*. J Clin Invest, 1987. **80**(2): p. 281-5.
40. Stenman, U.H., *Prostate-specific antigen, clinical use and staging: an overview*. British Journal of Urology, 1997. **79**(S1): p. 53-60.
41. Cooner, W.H., et al., *Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen*. J Urol, 1990. **143**(6): p. 1146-52; discussion 1152-4.
42. Vickers, A.J., et al., *Strategy for detection of prostate cancer based on relation between prostate specific antigen at age 40-55 and long term risk of metastasis: case-control study*. Bmj, 2013. **346**: p. f2023.
43. Higashihara, E., et al., *Significance of serum free prostate specific antigen in the screening of prostate cancer*. J Urol, 1996. **156**(6): p. 1964-8.
44. Polascik, T.J., J.E. Oesterling, and A.W. Partin, *Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going*. J Urol, 1999. **162**(2): p. 293-306.
45. Ilic, D., et al., *Screening for prostate cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2013(1): p. Cd004720.
46. Sobin, L. and C. Wittekind, *International Union Against Cancer: TNM: classification of malignant tumours 6th edition*. 2002, New York: Wiley-Liss.
47. D'Amico, A.V., et al., *Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer*. Jama, 1998. **280**(11): p. 969-74.
48. Mottet, N., et al., *EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent*. European Urology, 2017. **71**(4): p. 618-629.
49. Gleason, D.F., *Classification of prostatic carcinomas*. Cancer Chemother Rep, 1966. **50**(3): p. 125-8.
50. Gleason-Score, D., *Gleason-Score: Status 2016*.
51. Heidenreich, A., et al., *EAU guidelines on prostate cancer*. European urology, 2008. **53**(1): p. 68-80.
52. Epstein, J.I., et al., *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(9): p. 1228-42.
53. Krebsgesellschaft, D. and A. Deutsche Krebshilfe, *Leitlinienprogramm Onkologie. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 3.1, 2014 AWMF Registernummer: 034/022OL*. 2016.
54. Hoogendam, A., F. Buntinx, and H.C. de Vet, *The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis*. Fam Pract, 1999. **16**(6): p. 621-6.
55. Takenaka, A., et al., *A prospective randomized comparison of diagnostic efficacy between transperineal and transrectal 12-core prostate biopsy*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2008. **11**(2): p. 134-8.

56. Eichler, K., et al., *Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review*. J Urol, 2006. **175**(5): p. 1605-12.
57. Lawrentschuk, N. and N. Fleshner, *The role of magnetic resonance imaging in targeting prostate cancer in patients with previous negative biopsies and elevated prostate-specific antigen levels*. BJU Int, 2009. **103**(6): p. 730-3.
58. Futterer, J.J., et al., *Staging prostate cancer with dynamic contrast-enhanced endorectal MR imaging prior to radical prostatectomy: experienced versus less experienced readers*. Radiology, 2005. **237**(2): p. 541-9.
59. Cheikh, A.B., et al., *Evaluation of T2-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI in localizing prostate cancer before repeat biopsy*. Eur Radiol, 2009. **19**(3): p. 770-8.
60. Engehausen, D.G., et al., *Magnetic resonance image-guided biopsies with a high detection rate of prostate cancer*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 975971.
61. Park, B.K., et al., *Prospective evaluation of 3-T MRI performed before initial transrectal ultrasound-guided prostate biopsy in patients with high prostate-specific antigen and no previous biopsy*. AJR Am J Roentgenol, 2011. **197**(5): p. W876-81.
62. Haffner, J., et al., *Role of magnetic resonance imaging before initial biopsy: comparison of magnetic resonance imaging-targeted and systematic biopsy for significant prostate cancer detection*. BJU Int, 2011. **108**(8 Pt 2): p. E171-8.
63. Bul, M., et al., *Outcomes of initially expectantly managed patients with low or intermediate risk screen-detected localized prostate cancer*. BJU Int, 2012. **110**(11): p. 1672-7.
64. Godtman, R.A., et al., *Outcome following active surveillance of men with screen-detected prostate cancer. Results from the Goteborg randomised population-based prostate cancer screening trial*. Eur Urol, 2013. **63**(1): p. 101-7.
65. Czeloth, K. and P. Albers, *„Active surveillance “des lokalisierten Prostatakarzinoms*. Der Onkologe, 2007. **13**(8): p. 691-700.
66. Bill-Axelsson, A., et al., *Radical Prostatectomy Versus Watchful Waiting in Localized Prostate Cancer: the Scandinavian Prostate Cancer Group-4 Randomized Trial*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(16): p. 1144-54.
67. Reymond, N., B.B. d'Agua, and A.J. Ridley, *Crossing the endothelial barrier during metastasis*. Nature Reviews Cancer, 2013. **13**(12): p. 858-870.
68. Hynes, R.O., *Integrins: a family of cell surface receptors*. Cell, 1987. **48**(4): p. 549-54.
69. Hood, J.D. and D.A. Cheresh, *Role of integrins in cell invasion and migration*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(2): p. 91.
70. Desgrosellier, J.S. and D.A. Cheresh, *Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities*. Nature Reviews Cancer, 2010. **10**(1): p. 9.
71. Yoshida, C. and M. Takeichi, *Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation*. Cell, 1982. **28**(2): p. 217-24.
72. Gumbiner, B.M., *Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(8): p. 622-34.

73. Ivanov, A.I. and N.G. Naydenov, *Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies*. Int Rev Cell Mol Biol, 2013. **303**: p. 27-99.
74. Halbleib, J.M. and W.J. Nelson, *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*. Genes Dev, 2006. **20**(23): p. 3199-214.
75. David, J.M. and A.K. Rajasekaran, *Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments*. Cancer Res, 2012. **72**(12): p. 2917-23.
76. Daniel, J.M. and A.B. Reynolds, *The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(9): p. 4819-24.
77. McCrea, P.D., C.W. Turck, and B. Gumbiner, *A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1359-61.
78. Reymond, N., B.B. d'Agua, and A.J. Ridley, *Crossing the endothelial barrier during metastasis*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(12): p. 858-70.
79. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
80. Van Aken, E., et al., *Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer*. Virchows Arch, 2001. **439**(6): p. 725-51.
81. Le Bras, G.F., K.J. Taubenslag, and C.D. Andl, *The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(4): p. 365-73.
82. Weber, S. and P. Saftig, *Ectodomain shedding and ADAMs in development*. Development, 2012. **139**(20): p. 3693-709.
83. Damsky, C.H., et al., *Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue*. Cell, 1983. **34**(2): p. 455-66.
84. Wheelock, M.J., et al., *Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion*. J Cell Biochem, 1987. **34**(3): p. 187-202.
85. Maretzky, T., et al., *ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(26): p. 9182-7.
86. De Wever, O., et al., *Soluble cadherins as cancer biomarkers*. Clin Exp Metastasis, 2007. **24**(8): p. 685-97.
87. Steinhilber, U., et al., *Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4972-80.
88. Rios-Doria, J., et al., *The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 1372-9.
89. Ferber, E.C., et al., *A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 12691-700.
90. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(12): p. 767-79.
91. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(3): p. 178-96.
92. Hu, Q.P., et al., *Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer*. Int J Cancer, 2016. **138**(12): p. 2804-12.

93. Lao, C., et al., *Economic evaluation of prostate cancer screening: a systematic review*. *Future Oncology*, 2015. **11**(3): p. 467-477.
94. Kuefer, R., et al., *Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(11): p. 2018-23.
95. Chan, A.O., et al., *Soluble E-cadherin is an independent pretherapeutic factor for long-term survival in gastric cancer*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(12): p. 2288-93.
96. Iacopino, F., et al., *Soluble E-cadherin and IL-6 serum levels in patients affected by prostate cancer before and after prostatectomy*. *Oncol Rep*, 2012. **28**(1): p. 370-4.
97. Parrish, A.R., et al., *Chemically induced oxidative stress disrupts the E-cadherin/catenin cell adhesion complex*. *Toxicol Sci*, 1999. **51**(1): p. 80-6.
98. Najy, A.J., K.C. Day, and M.L. Day, *The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(26): p. 18393-401.
99. Patil, P.U., et al., *Carcinoma cells induce lumen filling and EMT in epithelial cells through soluble E-cadherin-mediated activation of EGFR*. *J Cell Sci*, 2015. **128**(23): p. 4366-79.
100. Yasmeen, A., T.A. Bismar, and A.-E. Al Moustafa, *ErbB receptors and epithelial-cadherin–catenin complex in human carcinomas*. *Future Oncology*, 2006. **2**(6): p. 765-781.
101. Brouxhon, S.M., et al., *Soluble E-cadherin: A critical oncogene modulating receptor tyrosine kinases, MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling*. *Oncogene*, 2014. **33**(2).
102. Pollak, M., *Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(12): p. 915-28.
103. McCulloch, D.R., et al., *Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP*. *Clinical cancer research*, 2004. **10**(1): p. 314-323.
104. Kim, N.-G., et al., *E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. **108**(29): p. 11930-11935.
105. Pan, D., *The hippo signaling pathway in development and cancer*. *Developmental cell*, 2010. **19**(4): p. 491-505.
106. Melis, L., et al., *Senescence marker killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) contributes to TNF-alpha production by interaction with its soluble E-cadherin ligand in chronically inflamed joints*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(6): p. 1223-31.
107. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. *Invest Urol*, 1979. **17**(1): p. 16-23.
108. Tai, S., et al., *PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma*. *Prostate*, 2011. **71**(15): p. 1668-79.
109. Sobel, R. and M. Sadar, *Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines—part 1*. *The Journal of urology*, 2005. **173**(2): p. 342-359.
110. Stone, K.R., et al., *Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)*. *International journal of cancer*, 1978. **21**(3): p. 274-281.

111. Alimirah, F., et al., *DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation*. FEBS Lett, 2006. **580**(9): p. 2294-300.
112. Horoszewicz, J.S., et al., *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. Cancer Res, 1983. **43**(4): p. 1809-18.
113. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
114. Igawa, M., et al., *High levels of nm23 expression are related to cell proliferation in human prostate cancer*. Cancer Res, 1994. **54**(5): p. 1313-8.
115. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 9-34.
116. Wang, X.M., et al., *A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release*. Human immunology, 1993. **37**(4): p. 264-270.
117. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
118. Pittard, A., et al., *Soluble E-cadherin concentrations in patients with systemic inflammatory response syndrome and multiorgan dysfunction syndrome*. British journal of anaesthesia, 1996. **76**(5): p. 629-631.
119. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. cell, 2002. **110**(6): p. 673-687.
120. Ahmed, M.I., et al., *Evaluation of some tissue and serum biomarkers in prostatic carcinoma among Egyptian males*. Clinical biochemistry, 1999. **32**(6): p. 439-445.
121. Brouxhon, S.M., et al., *Soluble-E-cadherin activates HER and IAP family members in HER2+ and TNBC human breast cancers*. Molecular carcinogenesis, 2014. **53**(11): p. 893-906.
122. Webber, M.M., D. Bello, and S. Quader, *Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines*. The Prostate, 1997. **30**(1): p. 58-64.
123. Tsaur, I., et al. *sE-cadherin is upregulated in serum of patients with renal cell carcinoma and promotes tumor cell dissemination in vitro*. in *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2019. Elsevier.
124. Brodaczewska, K.K., et al., *Choosing the right cell line for renal cell cancer research*. Molecular cancer, 2016. **15**(1): p. 1-15.
125. Inge, L.J., et al., *Soluble E-cadherin promotes cell survival by activating epidermal growth factor receptor*. Exp Cell Res, 2011. **317**(6): p. 838-48.
126. Amin, D.N., et al., *Resiliency and vulnerability in the HER2-HER3 tumorigenic driver*. Sci Transl Med, 2010. **2**(16): p. 16ra7.
127. Schlessinger, J., *Signal transduction by allosteric receptor oligomerization*. Trends in biochemical sciences, 1988. **13**(11): p. 443-447.
128. Fedor-Chaiken, M., et al., *E-cadherin binding modulates EGF receptor activation*. Cell Commun Adhes, 2003. **10**(2): p. 105-18.
129. Brouxhon, S.M., et al., *Soluble-E-cadherin activates HER and IAP family members in HER2+ and TNBC human breast cancers*. Mol Carcinog, 2014. **53**(11): p. 893-906.

130. Di Lorenzo, G., et al., *Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2002. **8**(11): p. 3438-3444.
131. Carrión-Salip, D., et al., *Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands*. *International journal of oncology*, 2012. **41**(3): p. 1128-1138.
132. Huang, W.-C. and M.-C. Hung, *Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance*. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2009. **108**(3): p. 180-194.
133. Meredith, J.E. and M.A. Schwartz, *Integrins, adhesion and apoptosis*. *Trends in cell biology*, 1997. **7**(4): p. 146-150.
134. Brabletz, T., et al., *Migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression*. *Nature Reviews Cancer*, 2005. **5**(9): p. 744-749.
135. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. *The Journal of clinical investigation*, 2009. **119**(6): p. 1429-1437.
136. Israels, E. and L. Israels, *The cell cycle*. *Stem cells*, 2001. **19**(1): p. 88-91.
137. Kohrman, A.Q. and D.Q. Matus, *Divide or conquer: cell cycle regulation of invasive behavior*. *Trends in cell biology*, 2017. **27**(1): p. 12-25.
138. Matus, D., *Cell cycle regulation of invasive behavior*. *Mechanisms of Development*, 2017(145): p. S101.
139. Matus, D.Q., et al., *Invasive Cell Fate Requires G1 Cell-Cycle Arrest and Histone Deacetylase-Mediated Changes in Gene Expression*. *Dev Cell*, 2015. **35**(2): p. 162-74.
140. Yano, S., et al., *Invading cancer cells are predominantly in G0/G1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time Fucci imaging*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(6): p. 953-960.
141. Vega, S., et al., *Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death*. *Genes & development*, 2004. **18**(10): p. 1131-1143.
142. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 2008, Garland science.
143. Woodhouse, E.C., R.F. Chuaqui, and L.A. Liotta, *General mechanisms of metastasis*. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 1997. **80**(S8): p. 1529-1537.
144. Birchmeier, W. and J. Behrens, *Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1198**(1): p. 11-26.
145. Zuo, J.H., et al., *Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin*. *Journal of cellular biochemistry*, 2011. **112**(9): p. 2508-2517.
146. Roussos, E.T., J.S. Condeelis, and A. Patsialou, *Chemotaxis in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2011. **11**(8): p. 573.
147. Johnson, S.K., et al., *Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin*. *Cancer*, 2007. **109**(9): p. 1811-20.
148. Chunthapong, J., et al., *Dual roles of E-cadherin in prostate cancer invasion*. *Journal of cellular biochemistry*, 2004. **91**(4): p. 649-661.
149. Teng, X., et al., *Modulation of RTK by sE cad: a putative mechanism for oncogenicity in oropharyngeal SCCs*. *Oral diseases*, 2015. **21**(2): p. 185-194.

150. Davies, G., W.G. Jiang, and M.D. Mason, *Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells: a key mechanism in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and in vitro invasion*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(10): p. 3289-97.
151. Symowicz, J., et al., *Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells*. *Cancer research*, 2007. **67**(5): p. 2030-2039.
152. Clezardin, P., *Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1998. **54**(6): p. 541-548.
153. Goel, H.L., et al., *Integrins in prostate cancer progression*. *Endocr Relat Cancer*, 2008. **15**(3): p. 657-64.
154. Fornaro, M., T. Manes, and L.R. Languino, *Integrins and prostate cancer metastases*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2001. **20**(3): p. 321-331.
155. Edlund, M., S.Y. Sung, and L.W. Chung, *Modulation of prostate cancer growth in bone microenvironments*. *Journal of cellular biochemistry*, 2004. **91**(4): p. 686-705.
156. O'toole, T.E., et al., *Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction*. *The Journal of cell biology*, 1994. **124**(6): p. 1047-1059.
157. Morini, M., et al., *The $\alpha 3\beta 1$ integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (mmp-9) activity*. *International journal of cancer*, 2000. **87**(3): p. 336-342.
158. Somanath, P.R., et al., *Akt1 signaling regulates integrin activation, matrix recognition, and fibronectin assembly*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(31): p. 22964-22976.
159. Kurozumi, A., et al., *Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer*. *Cancer Sci*, 2016. **107**(1): p. 84-94.
160. Wu, C. and S. Dedhar, *Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes*. *The Journal of cell biology*, 2001. **155**(4): p. 505-510.
161. Hannigan, G.E., et al., *Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new $\beta 1$ -integrin-linked protein kinase*. *Nature*, 1996. **379**(6560): p. 91-96.
162. Tremblay, L., et al., *Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma*. *International Journal of Cancer*, 1996. **68**(2): p. 164-171.
163. Casar, B., et al., *In vivo cleaved CDCP1 promotes early tumor dissemination via complexing with activated $\beta 1$ integrin and induction of FAK/PI3K/Akt motility signaling*. *Oncogene*, 2014. **33**(2): p. 255-268.
164. Uyama, N., et al., *Fascin, a novel marker of human hepatic stellate cells, may regulate their proliferation, migration, and collagen gene expression through the FAK-PI3K-Akt pathway*. *Laboratory investigation*, 2012. **92**(1): p. 57-71.
165. Xia, H., et al., *Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a $\beta 1$ integrin viability signaling pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(31): p. 33024-33034.

8 Publikation

Tsaur, I., Thomas, A., Juengel, E., Maxeiner, S., Grein, T., Le, Q. C., Muschta, V., Rutz J., Chun F. K. H. & Blaheta, R. A. (2021). Deciphering the Molecular Machinery—Influence of sE-Cadherin on Tumorigenic Traits of Prostate Cancer Cells. *Biology*, 10(10), 1007.

9 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Bedeutung von sE-Cadherin für die Progression des Prostatakarzinoms in vitro

in der Klinik für Urologie, Zentrum der Chirurgie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Roman Blaheta ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Tsaur, I., Thomas, A., Juengel, E., Maxeiner, S., Grein, T., Le, Q. C., Muschta, V., Rutz J., Chun F. K. H. & Blaheta, R. A. (2021). Deciphering the Molecular Machinery—Influence of sE-Cadherin on Tumorigenic Traits of Prostate Cancer Cells. *Biology*, 10(10), 1007.

Heidelberg, 12.07. 2022

(Ort, Datum)

(Unterschrift)